

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biofyziky a fyzikálnej chémie

DIPLOMOVÁ PRÁCA
Stanovení steviových glykosidů metodou HPLC
Vedúci diplomovej práce: Ing. MARTIN DRASTÍK, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2017

Bc. MARCELA HOLLÁ

POĎAKOVANIE

Ďakujem vedúcemu práce Ing. Martinovi Drastíkovi, PhD. za trpezlivosť, cenné rady, odborné vedenie a pomoc pri vypracovávaní diplomovej práce. Poďakovanie tiež patrí aj mojej rodine a blízkym, ktorí boli pre mňa oporou po celú dobu.

„Prehlasujem, že diplomovú prácu som vypracovala samostatne a je mojím pôvodným autorským dielom. Všetky literárne a iné zdroje z ktorých som pri písaní práce čerpala, sú uvedené v zozname literatúry a v práci riadne citované. Zároveň prehlasujem, že práca nebola použitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové 15.05.2017

.....

Marcela Hollá

OBSAH

1. ABSTRAKT.....	7
2. ABSTRACT.....	8
3. ÚVOD.....	9
4. Teoretická časť.....	11
4.1 Stévia sladká (Stevia rebaudiana Bertoni)	11
4.1.1 Vzhľad.....	13
4.1.2 História.....	13
4.2 Glykozidy steviolu	14
4.2.1 Chemické zloženie	14
4.2.2 Stéviozid.....	16
4.2.3 Rebaudiozid A.....	17
4.2.4 Medicínske a alimentárne použitie glykozidov S. rebaudiana Bertoni	17
4.2.5 Bezpečnosť stéviových glykozidov.....	19
4.2.6 Extrakcia stéviových glykozidov	20
4.3 Metódy stanovenia glykozidov steviolu.....	23
4.3.1 HPLC-UV, CAD, ELS	23
4.3.2 HPLC s elektrochemickou detekciou- PAD.....	25
4.3.3 Metódy HPLC-MS.....	25
4.3.4 2D-LC-MS	26
4.3.5 UHPLC-MS	26
4.3.6 Kapilárna elektroforéza	27
4.4 Podobné metódy stanovenia stéviových glykozidov	28
4.4.1 Reverzné fázy.....	28
4.4.2 HILIC	29
4.5 Povrchovo porézne častice.....	31
4.6 Hydrofilná interakčná chromatografia	35
4.6.1 Výhody a nevýhody separačnej metódy HILIC	35
4.6.2 Stacionárne fázy	36
4.6.3 Výber mobilnej fázy.....	38

4.6.4	Aditíva mobilnej fázy.....	39
4.6.5	Separčný mechanizmus	40
5.	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	46
5.1	Chemikálie	46
5.2	Prístroje	46
5.3	Pomôcky.....	46
5.4	Vzorky.....	47
5.5	Príprava roztokov	47
5.5.1	Zásobné štandardné roztoky.....	47
5.5.2	Pracovné štandardné roztoky	47
5.5.3	Mobilné fázy – príprava	48
5.6	Vzorky sladidiel a ich predanalytická úprava	49
5.6.1	Stevia, sladidlo so steviolglykozidmi VALOSUN – vzorka č. 1	49
5.6.2	SlaDIA, Sukralóza + Stevia, SWISS Pharmaceutical Investment – vzorka č. 2.	49
5.6.3	Stevia, tekuté sladidlo SOLIA – vzorka č. 3	49
5.6.4	Extrakt z listov sušenej stévie- vzorka č. 4	50
5.7	Optimalizácia podmienok separácie stéviových glykozidov – RP-HPLC	51
5.8	Optimalizácia podmienok separácie stéviových glykozidov - HILIC	57
5.8.1	Série analýz s mobilnou fázou zloženou z ACN a vody	58
5.8.2	Série analýz s mobilnou fázou zloženou z ACN a pufru octanu amónneho s kyselinou octovou.....	60
5.8.3	Série analýz s mobilnou fázou zloženou z ACN a pufru mravčanu amónneho s kyselinou mravčou.....	64
5.9	Validácia	75
5.9.1	Linearita	75
5.9.2	Robustnosť	77
5.9.3	Selektivita.....	86
5.9.4	Test vhodnosti systému	86
6.	VÝSLEDKY	93
6.1	Vzorka č. 1: Stevia, sladidlo so steviolglykozidmi VALOSUN	93
6.2	Vzorka č. 2: SlaDIA, Sukralóza + Stevia, SWISS Pharmaceutical Investment.....	96
6.3	Vzorka č. 3: Stevia, tekuté sladidlo SOLIA	98
6.4	Vzorka č. 4: Sušené listy stévie, SOLIA	100

6.5	Výsledky – zhodnotenie.....	103
7.	DISKUSIA	104
8.	ZÁVER.....	109
9.	POUŽITÉ SKRATKY	111
10.	ZOZNAM TABULIEK.....	113
11.	ZOZNAM OBRÁZKOV.....	115
12.	ZOZNAM GRAFOV	116
13.	POUŽITÁ LETERATÚRA.....	118

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikálnej chémie

Kandidát: Marcela Hollá

Vedúci diplomovej práce: Ing. Martin Drastík, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Stanovení steviových glykosidů metodou HPLC

Vyvinuli a validovali sme metódu HPLC na súčasné stanovenie hlavných stéviových glykozidov stéviozidu a rebaudiozidu A v potravinových doplnkoch. Separácia prebieha v móde hydrofilnej interakčenej chromatografie na kolóne s povrchovo poréznymi časticami. Metódu sme aplikovali na analýzu sladidiel s obsahom stéviových glykozidov Valosun, SlaDIA, Solia a na analýzu extraktu zo sušených listov stévie. Separácia prebiehala na kolóne Kinetex 2,6u HILIC 100Å (100×2,1 mm; 2,6 μm) Phenomenex, s izokratickou elúciou mobilnou fázou so zložením acetonitril/0,05 M pufo mravčanu amónneho okysleného kyselinou mravčou na pH=3, v pomere 90:10, rýchlosťou prietoku mobilnej fázy 0,7 ml/min, teplotou kolóny 30 °C, tlakom 19,8 MPa, UV detekciou pri 203 nm a objemom nástreku 1 μl. Výsledky analýz sme porovnali s obsahom stéviových glykozidov deklarovaným výrobcom. Vynínutá metóda umožňuje rýchlu analýzu potravinových doplnkov a rastlinných extraktov s obsahom stéviových glykozidov.

Kľúčové slová: stéviové glykozidy, stéviozid, rebaudiozid A, *Stevia rebaudiana* Bertoni, vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, hydrofilná interakčná chromatografia, povrchovo porézne častice.

2. ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: Marcela Hollá

Supervisor: Ing. Martin Drastík, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Determination of steviol glycosides by HPLC

A new HPLC method was developed and validated for simultaneous determination of major steviol glycosides stevioside and rebaudioside A in food supplements. Separation took place in hydrophilic interaction chromatography mode on column with core-shell particles. The method was applied on analysis of steviol glycosides in products Valosun, SlaDIA, Solia and extract from dried stevia leaves. Isocratic separation was performed using Kinetex 2,6u HILIC 100A, (100 x 2,1 mm; 2,6 μm), Phenomenex analytical column with mobile phase consisted of acetonitrile/0,05 M ammonium formate adjusted with formic acid to pH=3 in ratio 90:10, with flow rate 0,7 ml/min, column temperature set at 30 °C, pressure 19,8 MPa, UV detection at 203 nm and injection volume 1 μl . We compared the results of the analyzes with content of stevioside glycosides declared by the manufacturer. The new developed method allows rapid analysis of food supplements and plant extract containing steviol glycosides.

Key words: steviol glycosides, stevioside, rebaudioside A, *Stevia rebaudiana* Bertoni, high performance liquid chromatography, hydrophilic interaction chromatography, core-shell particles.

3. ÚVOD

Stevia rebaudiana Bertoni je vďaka svojej sladkej chuti lístkov unikátnym druhom rastliny. Jej sladivú schopnosť v najväčšej miere využívajú krajiny Ázie, ktoré sú zároveň jej najväčším producentom, napriek tomu, že stévia sa v daných zemepisných šírkach prirodzene nevyskytuje.

Komerčne sa stévia využíva v podobe extraktu stéviových glykozidov v kryštalickej forme. V listoch stévie sa nachádza najmenej deväť rôznych stéviových glykozidov, avšak najdôležitejšie sú stéviozid a rebaudiozid A, ktoré sú najviac zastúpené. Chuťové vlastnosti stéviových glykozidov sa od tradičných sladidiel využívaných v domácnosti odlišujú sladivou schopnosťou, ktorá je približne tristokrát vyššia, ale aj chuťovými vlastnosťami, ktoré nemusia každému vyhovovať. Typická je práve horkastá pachť stéviozidu.

Najčastejšie sa stéviové glykozidy získavajú extrakciou listov stévie horúcou vodou. Medzi ďalšie spôsoby extrakcie patrí napríklad superkritická fluidná extrakcia, vysokotlaková extrakcia rozpúšťadlom, Soxhletova extrakcia, či extrakcia pomocou mikrovln.

V posledných rokoch rastie záujem verejnosti o stéviové sladidlá, prípadne o výrobky ochutené stéviovými glykozidmi, namiesto klasických sladidiel. Dôvodov je viacej. Stéviové sladidlá predstavujú nekalorický typ sladidla, ktoré je vhodné pre diabetikov a ľudí trpiacich fenylketonúriou, zároveň nepodporujú tvorbu zubných kazov. Stéviové glykozidy poskytujú aj ďalšie zdravotné benefity pre diabetikov, obéznych ľudí, majú schopnosť znižovať krvný tlak, pôsobiť antioxidantne a množstvo ďalších účinkov. Listy stévie obsahujú aj množstvo nutričných látok, ako napr. vitamín A, C, esenciálne aminokyseliny a minerálne látky.

Napriek tomu, že stéviové glykozidy spočiatku čelili problémom s bezpečnosťou ich konzumácie, novšie štúdie vyvracajú ich možné negatívne pôsobenie na zdravie človeka.

Keďže záujem o využívanie stéviových glykozidov neustále rastie, sú potrebné metódy na ich identifikáciu a sledovanie obsahu. Na tieto účely sa najčastejšie využívajú metódy HPLC, ktorých bolo vyvinutých už množstvo. Jednotlivé metódy sa líšia predovšetkým módom separácie (reverzné fázy, HILIC), použitím pufrov v mobilných fázach a spôsobom detekcie.

V našej práci sa zameriavame na tvorbu a validáciu novej, jednoduchej a rýchlej HPLC metódy na stanovenie stéviozidu a rebaudiozidu A v komerčných sladidlách a v extrakte z listov stévie. Pri tvorbe metódy využívame dva typy kolón s povrchovo poréznymi časticami. Prvá skúšaná kolóna pracuje v móde reverzných fáz, ktorá však neposkytovala potrebné parametre separácie glykozidov. Druhá skúšaná kolóna pracuje

v móde HILIC a umožňuje dosiahnúť potrebné parametre separácie stéviových glykozidov.

Súčasťou práce je aj overenie využitia metódy v praxi a na analýze zakúpených bežne dostupných sladidiel s obsahom stéviových glykozidov VALOSUN, SlaDIA, SOLIA a na extrakte zo sušených listov stévie. Zakúpené sladidlá sa nachádzajú v tabletkovej aj v kvapalnej forme. Extrakt zo stéviových listov je pripravený extrakciou horúcou vodou a následne SPE extrakciou.

V závere práce sa venujeme zhodnoteniu nameraných výsledkov zo zakúpených vzoriek, prídane porovnaniu výsledkov meraní s deklarovými hodnotami obsahu stéviových glykozidov od výrobcov.

4. TEORETICKÁ ČASŤ

4.1 Stévia sladká (*Stevia rebaudiana* Bertoni)

Rastlina je známa aj ako stévia cukrová, sladká tráva, medové lístky alebo stévia listová (obrázok 1). *S. rebaudiana* sa často označuje aj ako sladká bylina Paraguaja. Využíva sa predovšetkým ako sladidlo, ale má aj liečivé účinky [1]. Sladivá schopnosť stévie je približne 300 krát väčšia v porovnaní so sacharózou [2].

Stevia rebaudiana Bertoni je unikátnym druhom obsahujúcim glykozidy steviolu (SVgly), ktoré sú zodpovedné za sladkú chuť lístkov [3,4]. Podľa novších zistení, listy *Stévie rebaudiana* Bertoni obsahujú viac než dvadsať rôznych SVgly [5]. Nové kultivary, ako *Stevia rebaudiana* Morita, ich obsahujú dokonca ešte viac, až tridsať [6]. Avšak zatiaľ sa úplne nepreukázalo, či sa všetkých približne tridsať doposiaľ nájdených SVgly nachádza v listoch stévie prirodzene, alebo ide o artefakty, ktoré sa vytvárajú pri extrakcii a izolácii SVgly z listov. [7].



Obrázok 1 *Stevia rebaudiana* Bertoni [8]

Stévia je viacročná rastlina, ktorá pochádza zo subtropických a tropických oblastí Južnej a Strednej Ameriky (obrázok 2). Existuje viac ako dvesto druhov bylín a kríkov stévie, ktoré taxonomicky patria do kmeňa *Eupatoriae* a čeľade astrovité (*Asteraceae*) [9]. Najviac druhov sa nachádza v oblasti Mexika a Brazílie. Jednotlivé

druhy rodu stévia rastú na celom rade stanovíšť. Od horských oblastí, brehov riek až po suché údolia, pričom preferujú bahnité pôdy a veľa slnka [9,10].



Obrázok 2 Miesta Južnej Ameriky, kde *S. rebaudiana* rastie spontánne [9]

S. rebaudiana sa kultivuje najmenej na troch kontinentoch (obrázok 3) a ako sladidlo sa vo veľkom množstve využíva najmä v krajinách ako Čína, Japonsko, Kórea, Brazília a Paraguaj, ako náhrada za sacharózu či už v nápojoch a jedlách, alebo ako sladidlo v domácnosti [9,11].



Obrázok 3 Oblasti sveta, v ktorých sa *S. rebaudiana* pestuje mimo svojich prirodzených podmienok [9]

4.1.1 Vzhľad

Stevia rebaudiana Bertoni dorastá do výšky 50 až 100 cm [10]. Má drobné sýtozelené listy kopijovitého tvaru, ktoré sú na stonke usporiadané protistojne. Kvety stévie majú bielu farbu a vytvárajú koncové okolíky (obrázok 1) [12]. Jednotlivé druhy majú podobnú morfológiu kvetu, zloženého z piatich malých, tubulárnych kvetov s početnými chlčkami na vnútornom povrchu. Rast a kvitnutie závisia od množstva slnečného žiarenia, fotoperiód, teploty a dostupnosti vody. V jej prirodzenom prostredí v oblasti Paraguaja kvitne od januára do marca, zatiaľ čo v severnejšie položených oblastiach až v období od septembra do decembra. Rastlina má dobre vyvinutý koreňový systém, stonka je vzpriamená a drevnatá, v dolnej časti sa nachádzajú drobné vlásky [9].

Listy stévie sa strihajú v období kvitnutia, kedy obsahujú najväčšie množstvo SVgly. Listy sa ďalej postupne sušia a spracúvajú [10].

4.1.2 História

Rastlinu ako prví využívali kmene Guaranínov v Paraguaji a Brazílii. Využívali ju na sladenie maté a pre jej liečivé účinky [8].

Komerčný objav stévie sa pripisuje švédskemu botanikovi Moisés Santiago Bertoni v roku 1899, keď v Paraguaji vykonával prieskum flóry a zaznamenal príjemnú sladkú chuť stévie, podobnú sacharóze. Podľa svojho objaviteľa získala aj meno, *Stevia rebaudiana* Bertoni. Až po roku 1930 boli chemici schopní izolovať zložky zodpovedné za sladkú chuť, čím sa začala cesta možnej komerčnej extrakcie najviac zastúpených SVgly, ako náhrady za sacharózu [1,8].

V 20. storočí sa vo veľkom množstve využívali umelé sladidlá ako cyklamát a sacharín, ktoré sú dlhodobo podozrivé z možného karcinogénneho účinku [13, 14, 15]. Preto sa v 70. rokoch japonská firma Morita Kagaku Kogyo Co., Ltd začala zaujímať o využitie stévie, ako náhrady za iné cukry v nápojoch a potravinárskom priemysle. V dnešnej dobe je podiel stévie na trhu cukrov v Japonsku až 40 %. Japonsko spolu s Kóreou predstavujú najväčší trh so stéviou, avšak najväčším pestovateľom stévie je Čína, ktorá až 80 % svojej produkcie exportuje do zahraničia [12,16].

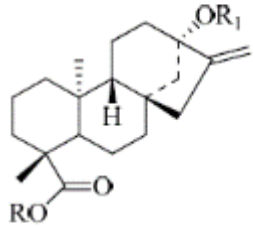
Do roku 1995 bola stévia v USA používaná len v kozmetickom priemysle. Mohla za to zavádzajúca štúdia profesora Mauro Alvareza z Brazílie z roku 1988, ktorý pripisoval stévii antikoncepčné vlastnosti, až neplodnosť u mužov a žien [17]. Neskôr prebehli ďalšie štúdie, ktoré dokázali, že stévia nemá vplyv na reprodukciu a plodnosť, je bezpečným sladidlom vhodným aj pre diabetikov a ľudí trpiacich fenylketonúriou [18]. V apríli 2010 Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA, European Food Safety Authority) vyhlásil SVgly za bezpečné. Platí to pre zmesi SVgly, ktoré obsahujú najmenej 95 % stéviozidu (ST) a/alebo rebaudiozidu A (Reb A). Od novembra 2011 boli SVgly Európskou úniou uznané ako potravinové aditívum s označením E960 [11].

Podľa Spoločného výboru expertov pre potravinárske aditíva (JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO, World Health Organization) a Organizácie spojených národov pre výživu a poľnohospodárstvo (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) je akceptovateľný denný príjem SVgly vyjadrený ako ekvivalent 4 mg steviolu na kg telesnej hmotnosti [19]. To znamená, že akceptovateľný denný príjem pre SVgly je podľa JECFA 4 mg/kg telesnej váhy/deň [20].

4.2 Glykozidy steviolu

Množstvo SVgly v listoch sa pohybuje medzi 10 % až 30 % ich suchej váhy v závislosti na genotype, fenologickej etape a podmienkach pri pestovaní. Ich množstvo sa zvyšuje postupne až do fázy pučania a kvitnutia [21,22]. Listy *S. rebaudiana* Bertoni obsahujú najmenej deväť rôznych SVgly (obrázok 4). Hlavnými SVgly sú ST a Reb A, ktoré tvoria viac ako 90 % [11]. Ďalšie sú steviolmonozid, steviolbiosid, Reb B, C, D, E, F a dulkozid A, ktoré sú prítomné len v malom množstve [4,23,24].

ST je asi 110 až 270 krát sladší než sacharóza, avšak na konci má horkastú pachuť. Reb A je asi 140 až 400 krát sladší než sacharóza a jeho senzorické vlastnosti sú oveľa priaznivejšie. Po extrakcii majú podobu bielej kryštalickej látky [11].



Name	R	R ₁
Rebaudioside A	β-Glc	β-Glc[β-Glc(3>1)]-β-Glc(2>1)
Rebaudioside B	H	β-Glc[β-Glc(3>1)]-β-Glc(2>1)
Rebaudioside C	β-Glc	β-Glc[β-Glc(3>1)]-α-Rha(2>1)
Rebaudioside D	β-Glc-β-Glc(2>1)	β-Glc[β-Glc(3>1)]-β-Glc(2>1)
Rebaudioside E	β-Glc-β-Glc(2>1)	β-Glc-β-Glc(2>1)
Rebaudioside F	β-Glc	β-Glc[β-Glc(3>1)]-β-Xyl(2>1)
Steviolbioside	H	β-Glc-β-Glc(2>1)
Stevioside	β-Glc	β-Glc-β-Glc(2>1)
Rubusoside	β-Glc	β-Glc
Steviolmonoside	H	β-Glc

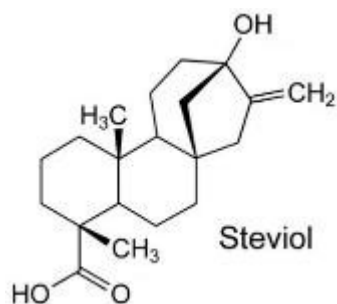
(300-500)

Obrázok 4 Substituenty steviolu nachádzajúce sa v extrakte *S. rebaudiana* [9]

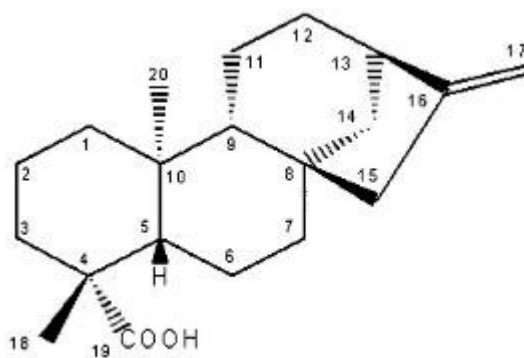
Stévia je bohatá na metabolity ako β-karotén, tiamín, tokoferol, vitamín K, vitamín C, niacín, éterické oleje, triesloviny, saponíny, austroinulín, riboflavín, roznamité terpeny a flavonoidy, z ktorých vyplýva medicínske využitie rastlín [3,25].

4.2.1 Chemické zloženie

SVgly sú sekundárne metabolity s charakterom tetracyklických diterpénov. Rôznorodosť SVgly vyplýva z existencie rozličných glykoziltransferáz, ktoré katalyzujú ich vznik a ovplyvňujú organoleptické vlastnosti svojich produktov. Základnú kostru SVgly vytvára steviol (obrázok 5) [25,26].



Obrázok 5 Steviol, základná štruktúra SVgly [27]

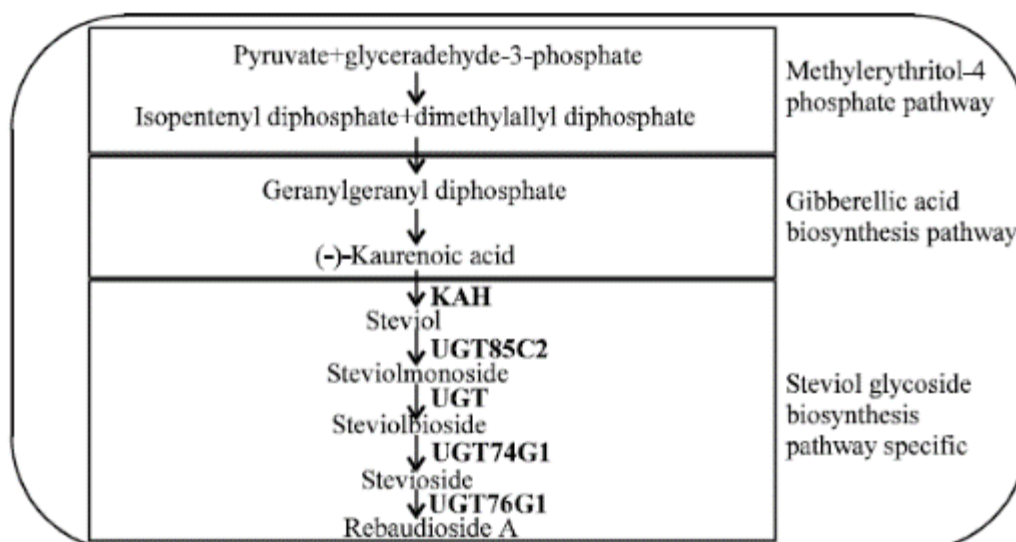


Obrázok 6 Kyselina ent-kaurenová [28]

Biosyntéza SVgly má 17 krokov, ale až posledných 5 krokov je špecifických, ktoré sú katalyzované najmenej tromi génmi UDP-glykoziltransferáz [29].

Geranylgeranyl-difosfát (GGDP) sa premieňa na kyselinu 13-hydroxy-ent-kaurenovú (obrázok 6) pomocou enzýmov: copalyl difosfát syntáza (CPPS), ent-kaurenová syntáza (KS), ent-kaurenová oxidáza (KO). Následne sa kyselina 13-hydroxy-ent-kaurenová pomocou hydroxylázy kyseliny ent-kaurenovej (KAH) premieňa na steviol [30,31].

Rozličné SVgly sa následne tvoria glykoziláciou steviolu pomocou špecifických glykoziltransferáz (UGTs) (obrázok 7) [4,11]. Gén UGT85C2 je zodpovedný za adíciu glukózy na C13 uhlík steviolu, za vzniku steviolmonozidu. Gén UGT74G1 za adíciu glykozilu na steviolbiozid za vzniku ST a gén UGT76G1, ktorý kóduje kľúčový enzým, prenáša zvyšok glukózy na molekulu ST za vzniku Reb A [29].

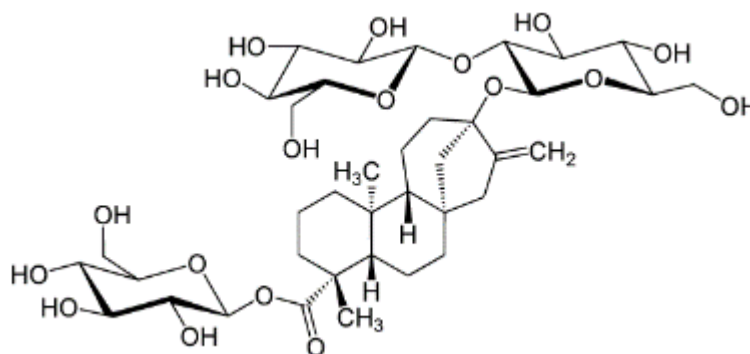


Obrázok 7 Biosyntéza stéviových glykozidov [31]

4.2.2 Stéviozid

Stéviozid (obrázok 8) je biely, hygroskopický kryštalický prášok. Je rozpustný vo vode a taktiež v methanole a propylen glykole. Pri konzumácii väčšieho množstva sa na konci objavuje horká pachuť. Enzymatickou hydrolyzou ST vzniknú 3 móly glukózy a 1 mól steviolu. Svoju sladkú chuť si zachováva aj po jednej hodine varu. V silne zásaditom prostredí (pH viac ako 10) poklesla sladivosť asi o 50 %, naopak, v roztoku kyseliny mliečnej si zachoval svoju sladivosť aj po dlhšej dobe. To znamená že procesy, ktoré využíva potravinársky priemysel, nespôsobia jeho degradáciu [32].

ST neprispieva k tvorbe zubného kazu, je vhodný pre diabetikov a pre osoby s fenyktonuriou [18]. Toxikologické štúdie zistili, že nemá karcinogénne, mutagénne ani teratogénne účinky [13,14,15].

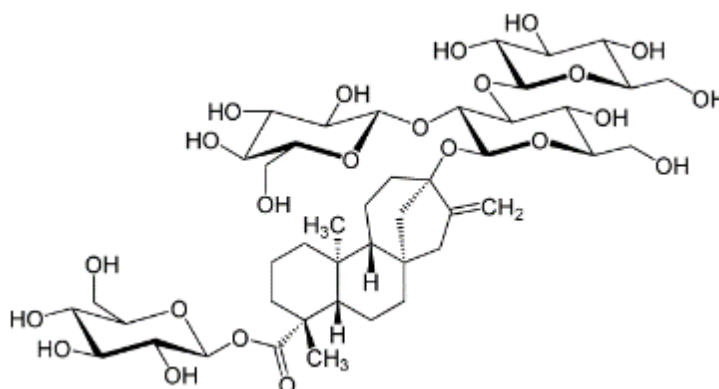


Obrázok 8 Steviozid, štruktúrny vzorec [33]

4.2.3 Rebaudiozid A

Na rozdiel od ST, Reb A nemá horkastú pachuť. Proces filtrácie a purifikácie stéviového extraktu ovplyvňuje kvalitu a charakteristiku chuti. Koncentráty, ktoré obsahujú až 99% Reb A sú až 500 krát sladšie než sacharóza [34].

Štruktúra Reb A (obrázok 9) obsahuje štyri molekuly glukózy. Centrálna glukóza glukózového tripletu je napojená cez hydroxylovú skupinu na hlavnú štruktúru steviolu. Štvrtá molekula glukózy je napojená na karboxylovú skupinu, čím vzniká esterová väzba [35].



Obrázok 9 Rebaudiozid A, štruktúrny vzorec [35]

4.2.4 Medicínske a alimentárne použitie glykozidov *S. rebaudiana* Bertoni

V závislosti na obsahu SVgly rozoznávame tri typy produktov zo *S. rebaudiana*: bežné produkty, ktoré pozostávajú hlavne zo ST; Reva A produkty, ktoré obsahujú hlavne Reb A; a produkty s viacerými zložkami extrakcie [9].

Výhodou SVgly je, že nie sú skvasiteľné, majú vysokú tepelnú stabilitu a sú odolné voči hydrolyze kyselinami [9]. Ich tepelná stabilita je do 120 °C pri inkubácii počas jednej hodiny. SVgly degradujú až pri teplote nad 140 °C. Vodný roztok SVgly ostáva stabilný pri teplote 80 °C v rozmedzí pH 2 až 10. Obsah SVgly spolu s vodou rozpustnými vitamínmi v roztoku sa nemení ani pri inkubácii dlhšej než štyri hodiny pri 80 °C. Ku interakciám SVgly nedochádzalo ani po štyroch mesiacoch inkubácie vodného roztoku pri izbovej teplote. V extrémnejších podmienkach, napríklad pri pH=1 sa znižuje koncentrácia ST. Protektívne pôsobí kyselina askorbová, ktorá zabraňuje degradácii ST [36].

Ďalšie štúdie zistili, že okrem sladkej chuti, SVgly a ich príbuzné zložky spolu s izosteviolom (metabolická zložka steviozidu), môžu ponúknuť aj ďalšie terapeutické výhody (tabuľka 1) [9].

SVgly sa od seba navzájom odlišujú v glykozidických zložkách. Po požití nepodliehajú metabolickým premenám, z toho dôvodu nedochádza k uvoľneniu kalórií a preto sa považujú za nekalorické sladidlo [3,26]. Túto vlastnosť využíva množstvo jej terapeutických aplikácií, predovšetkým pri liečbe porúch metabolizmu cukrov, ako je diabetes mellitus II. typu, pretože nedochádza ku zvýšeniu glykémie a zároveň sa zlepšuje citlivosť tkanív na inzulín [9,26], a tiež pri liečbe obezity [3]. Avšak, tento antidiabetický efekt je možné prisudzovať iba ST. Napriek tomu, že ST a Reb A majú veľmi podobnú štruktúru, Reb A nepôsobí antidiabeticky (ovplyvňovaním inzulínovej senzitivity) [37]. Medzi ďalšie farmakologické účinky patrí schopnosť znižovať krvný tlak, antioxidantné a protinádorové účinky [3,38]. SVgly pôsobia proti hnačkám, diuretiky a podporujú funkciu žalúdka a obličiek. Navyše, majú protivírusový a imunomodulačný účinok. Na rozdiel od sacharózy nedochádza ani ku tvorbe zubných kazov [4,9].

Za antioxidantné vlastnosti zodpovedá prítomnosť fenolov, ktoré sa z jej listov dajú extrahovať. Ich množstvo je až 91 mg/g, preto sa predpokladá, že hlavne tieto látky sú zodpovedné za antihyperglykemické pôsobenie stévie [39]. Túto teóriu podporuje aj fakt, že listy stévie majú veľkú schopnosť podieľať sa na odstraňovaní voľných radikálov a brániť tak peroxidácii lipidov. Tieto vlastnosti sa dajú využiť na zabránenie progresii diabetických komplikácií, kedy dochádza ku poškodeniu tkanív práve peroxidáciou lipidov, ako následok hyperglykémie, ktorá vo zvýšenej miere produkuje reaktívne druhy kyslíka v tkanivách [21].

Samotná rastlina je bohatá na sacharidy, až 62 %, 11 % bielkovín a 16 % vlákniny v jej suchej váhe. [9]. Podrobnejšie sú to organické zlúčeniny, ako napríklad diterpény, triterpény, betakatorén, stigmaterol, tanín, éterické oleje, esenciálne aminokyseliny, riboflavín, rutín, tiamín, vitamín A a C. Z minerálnych látok sú to napr. vápnik, draslík, horčík, sodík, fosfor, mangán, meď, nikel, siera a zinok [10].

Tabuľka 1 Medicínske využitie jednotlivých druhov stévie, modifikované podľa [9]

Druh	Medicínske použitie
<i>S. balansae</i> Hieron	Črevné problémy
<i>S. cardiatica</i> Perkins	Kardiologické problémy
<i>S. connata</i> Lag.	Žalúdočné problémy
<i>S. elatior</i> H. B. K	Hojivý účinok, dermatologické problémy
<i>S. eupatoria</i> (Spreng.) Willd	Obličkové problémy
<i>S. glandulosa</i> Hook & Arn.	Antipyretický účinok, nachladnutie
<i>S. lucida</i> Lag.	Protizápalový, hojivý účinok, nádcha

Druh	Medicínske použitie
S. macbridei B. L. Rob	Gynekologické problémy
S. nepetifolia H. B. K	Gynekologické problémy
S. pilosa Lag.	Antipyretický účinok, črevné a obličkové problémy
S. plummense A. Gray	Hojivý účinok
S. puberula Hook.	Žalúdočné problémy
S. rebaudiana Bertoni	Gynekologické problémy, antidiabetický účinok
S. rhombifolia Kunth	Žalúdočné problémy
S. salicifolia Cav.	Antireumatický úč., žalúdočné probl., nachladnutie
S. serrata Cav.	Účinok proti kašľu a hojivý
S. subpubescens Lag.	Gynekologické a žalúdočné problémy
S. trifida Lag.	Žalúdočné a črevné problémy

4.2.5 Bezpečnosť stéviových glykozidov

Už v roku 2000 Geuns a kol. preukázali, že SVgly neovplyvňujú plodnosť a reprodukčné schopnosti cicavcov a ako sladidlo sú dokonca bezpečné pre diabetikov aj ľudí trpiacich fenyketonúriou [18].

O bezpečnosti používania SVgly ako potravinových aditív sa diskutovalo naďalej, predovšetkým z toho dôvodu, že tvorba mutagénnych metabolitov, ako steviolu zo SVgly, v pečeni a intestinálnou flórou nebola dostatočne objasnená [40]. Steviol by bol v prítomnosti metabolických aktivátorov vysoko mutagénny. Koncentrácia steviolu 2,5 mg/ml by mala približne účinnok, ako 80 µmol benzoapyrénu [32].

Ďalšie štúdie poskytli dôkazy o schopnosti ST znižovať hladinu glykémie u pacientov s diebetom II. typu a schopnosť znižovať krvný tlak u pacientov s miernou hypertenziou [41,42].

V roku 2007 Geuns preukázal, že steviol, ktorý má mutagénne účinky a vytvára sa zo SVgly v ľudskom tele, sa napriek tomu nehromadí a SVgly u zdravých ľudí ani pri dennej dávke 750 mg neovplyvňujú glykémiu a krvný tlak [43].

4.2.6 Extrakcia stéviových glykozidov

V súčasnosti sa pre potreby komerčnej extrakcie SVgly používa niekoľko moderných techník, ktoré boli optimalizované z hľadiska teploty, dĺžky procesu, stability a kvantity extrahovaných molekúl. Na druhej strane, konvenčné metódy ako Soxhletova extrakcia, vodná destilácia, horúca a studená macerácia sú menej výhodné nie len z extrakčného, ale aj z ekonomického hľadiska [44,45,46].

Tabuľka 2 Prehľad a porovnanie metód extrakcie SVgly zo sušených listov *S. rebaudiana*, modifikované podľa [9]

Extrakčná metóda	Problémy/ výhody/ nevýhody
Vodná extrakcia	Optimalizácia teploty, pH, tlaku, dĺžky procesu [44]
Lúhovanie vo vode	Čas, pracnosť [45]
Lúhovanie v etanole	Rýchlejšie než lúhovanie vo vode, lepšia opakovateľnosť [45]
Superkritická fluidná extrakcia (SFE, supercritical fluid extraction)	Nízka rozpustnosť polárneho ST, nutnosť korozívneho rozpúšťadla, optimalizácia tlaku a teploty [45]
Vysokotlaková extrakcia rozpúšťadlom (PFE, pressurized fluid extraction)	Nižšia spotreba rozpúšťadla, lepší prenos analytov do rozpúšťadla a vyššia sila rozpúšťadla, obmedzenie tepelnou stabilitou analytov [45]
Vysokotlaková extrakcia horúcou vodou/ subkritická vodná extrakcia	Extrakcia nepolárnych látok vodou, ekologická, ekonomická, časovo nenáročná [45]
Extrakcia pomocou mikrovĺn	Optimalizácia objemu rozpúšťadla [46]
Soxhletova extrakcia	Optimalizácia rozpúšťadla, jeho objemu a dĺžky procesu [46]
Studená macerácia	Optimalizácia dĺžky procesu, výberu rozpúšťadla a jeho objemu [46]

Extrakcia pomocou mikrovĺn sa využíva aj v kombinácii s rozpúšťadlami používanými pri SFE a/alebo s rozpúšťadlami používanými pri extrakcii za vysokého tlaku, za účelom skrátenia času extrakcie. Navyše, pri extrakcii pomocou mikrovĺn sa bežne používa 10 až 30 ml rozpúšťadla na gram rastlinnej vzorky, čo je omnoho menej v porovnaní s konvenčnými metódami [46].

SVgly sú rozpustné vo vode, ktorá je zo všetkých polárnych rozpúšťadiel nejefektívnejšia, pretože vďaka svojej dielektrickej konštante dokáže najlepšie absorbovať energiu mikrovln. Tú následne prenáša do okolitého prostredia, čoho dôsledkom je exsudácia SVgly z buniek listov stévie v roztoku. Pri extrakcii pod tlakom sa môže využívať rovnako metanol aj voda. Metanol je najvýhodnejším rozpúšťadlom pri teplotách okolo 110 až 160 °C [45]. Ďalším dôležitým aspektom je čas potrebný na extrakciu. Môže to byť 16 až 24 hodín, pre Soxhletovu alebo len niekoľko minút pri extrakcii pomocou mikrovln [46].

V prípade, že ako rozpúšťadlo sa používa voda, najväčší výťažok poskytne extrakcia s využitím mikrovln a najmenší macerácia prášku listov stévie za studena [46].

Extrakcia SVgly podľa výrobcu z Paraguaja

Táto metóda patrí medzi najpoužívanejšiu konvenčnú metódu extrakcie horúcou vodou [36]. Listy stévie sa pripravujú sušením pri 50 °C v teplovzdušnej rúre po dobu 24 hodín. Následne sa rozomelú na jemný prášok, z ktorého sa extrahujú SVgly [47].

Pozostáva z troch základných stupňov. Prvým stupňom je príprava vodného extraktu SVgly, a to zmiešaním drvených listov stévie s horúcou vodou (78 °C), v pomere 1 g listov/14 ml vody, po dobu 20 až 30 minút. Následne sa extrakt prefiltruje tak, aby sa získalo čo najväčšie množstvo výťažku. Extrakt sa nechá ochladiť na laboratórnu teplotu a buď sa centrifuguje (5334 g, 26 minút) alebo sa rozptýlené častice nechajú voľne usadiť na dne. Takýto extrakt obsahuje okrem SVgly aj pigmenty a iné vo vode rozpustné komponenty [48].

V druhom stupni sa pripraví organický extrakt za pomoci butanolu alebo zmesi izobutanolu a menej polárneho rozpúšťadla ako je napr. benzén, chloroform alebo hexán [48].

V tretej fáze sa získavajú už samotné SVgly. Organická fáza z druhej fázy procesu sa koncentruje dovtedy, kým sa nevytvorí tuhá hmota, ktorá sa potom rozpustí v horúcom metanole. Pri jej chladnutí sa vytvárajú kryštály SVgly, ktoré sa odseparujú, premyjú studeným metanolom a následne znova nechajú kryštalizovať v metanole alebo vo vode, čím sa dosiahne ich vysoká čistota (97–98 %) [48].

Extrakcia SVgly podľa výrobcu z Japonska

Podľa tohto postupu obsahuje výsledný produkt asi 80–88 % SVgly. Proces zahŕňa zber, sušenie a následne drvenie listov stévie. Nasleduje extrakcia 2–3 krát s vodou o teplote 50–60 °C. Flokulácia za pomoci hydroxidu vápenatého a síranu hlinitého, filtrácia, a adsorpcia SVgly z roztoku na sorbent. Z prostredia sorbentu sa SVgly uvoľnia alkoholom, ktorý sa následne destiluje. Nasleduje výmena iónov, zakoncentrovanie vodného roztoku odparovaním za zníženého tlaku, mikrofiltrácia, sterilizácia a sušenie sprejovaním [48].

Iní autori uvádzajú aj možnosť použitia studenej vody ako extrakčného média namiesto horúcej vody. Čas extrakcie v studenej vode (5 °C) je v tomto prípade 2 hodiny, a výhodou takého spôsobu je, že do roztoku prechádza menej nežiadúcich zložiek, ktoré by sa inak v horúcej vode rozpustili a ich odstránenie by bolo náročnejšie. Tento spôsob extrakcie má výťažnosť približne 11 %, z toho 7 % ST a 4 % Reb A [49].

Ako ďalšie obľúbené konvenčné extrakčné rozpúšťadlo sa často využíva aj alkohol, predovšetkým etanol [50]. V tomto prípade sa zmieša 100 g stéviových listov so 1000 ml ethanolu a vody a extrahujú sa pomocou Soxhletovej extrakcie v dvoch cykloch po 500 ml, približne 100 minút. Extrakt sa následne koncentruje v rotačnej odparovačke pri 70 °C vo vákuu a nakoniec sa lyofilizuje [51].

Extrakcia SVgly sa môže uskutočniť aj pomocou iónovymennej extrakcie, kde dochádza ku selektívnej absorpcii s X a A zeolitmi. Zeolity vykazujú účinnosť bárnatých a vápenatých iónov v NaX a NaA zeolitoch počas iónovymennej fázy [52]

Pomocou superkritickej fluidnej extrakcie prebieha proces dvojstupňovo. Najprv extrakcia oxidom uhličitým pri 200 baroch a 30 °C, následne extrakcia pomocou oxidu uhličitého a vody [50,53].

Úspešne sa využíva aj enzymatická extrakcia s pektinázou, celulázou a hemicelulázou. Tento spôsob extrakcie je dokonca účinnejší než konvenčné metódy, ktoré využívajú extrakciu rozpúšťadlom. Najvyšší výťažok ST sa zaznamenal pri použití hemicelulázy, pri 60 °C ktorá pôsobila po dobu jednej hodiny [54]. Iná štúdia uvádza aj využitie chitosanu ako vložkovacieho činidla na prečistenie vodného extraktu zo stéviových listov [55].

Iní autori dokázali, že postupy s využitím ultrazvuku alebo energie mikrovln, môžu zlepšiť proces extrakcie a jej výťažok. Vhodnou voľbou môže byť použitie ultrazvuku, pretože táto technika spôsobuje lepší prienik rozpúšťadla do matrixu buniek, zmenu ich štruktúry a tým pádom aj lepší prenos hmoty z buniek listov stévie do roztoku [56,57].

Ďalšou možnou extrakčnou metódou je využitie mikrovln. V dôsledku pohybu molekúl dochádza ku ich vzájomnému treniu a zvyšuje sa tak teplota rastlinného materiálu. Výhodou tejto metódy je, že dochádza ku skráteniu času potrebného na extrakciu v porovnaní s konvenčnými metódami [38,58].

Izolované SVgly sa purifikujú rôznymi metódami zahŕňajúcimi kolónovú chromatografiu a metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC, high performance liquid chromatography). Izolované zložky sa nakoniec analyzujú a charakterizujú použitím analytických metód ako UV, technika FTIR (fourier transform infrared spectroscopy), nukleárnou magnetickou rezonanciou (NMR, nuclear magnetic resonance spectroscopy) a hmotnostnou spektrometriou (MS, mass spectrometry) [9].

4.3 Metódy stanovenia glykozidov steviolu

Zvýšený záujem o využívanie sladidiel z glykozidov stévie vyžadoval tvorbu separačných metód na charakteristiku a identifikáciu zložiek obsiahnutých v rastline a zložiek zodpovedných za charakteristickú sladkú chuť [59].

Stanovenie SVgly je náročné hneď z viacerých dôvodov. Jednotlivé SVgly sú celkom podobné, odlišujú sa len malými zmenami v spôsobe glykozilácie. Napríklad Reb B, ktorý predstavuje nečistotu, vnikajúcu do extraktu pri jeho spracovaní, sa líši od Reb A len absenciou zvyšku glukózy na R1 pozícii steviolu. Tieto štruktúrne podobnosti spôsobujú, že chromatografická separácia je náročnejšia. Štruktúra SVgly s množstvom -OH skupín hovorí o ich vysokej polarite a hydrofilných vlastnostiach. Hodnota rozdeľovacieho koeficientu medzi vodou a oktanolom ($\log P$) je $-3,12$ a hodnoty nižšie než 1 sú typické pre polárne zlúčeniny [19]. Náročná môže byť aj citlivosť detekcie SVgly, pretože UV spektrum absorbujú len slabo a ich typické absorpčné maximum nachádzajúce sa pri 210 nm je nešpecifické [60].

Metódou voľby na analýzu SVgly sa stali aplikácie HPLC [61]. Medzi najčastejšie využívané stacionárne fázy na separáciu SVgly patria NH_2 [62,63,64,65], ktoré vykazujú vysokú selektivitu pre všetky SVgly s časom analýzy od 7 do 30 minút. Avšak majú nízku reprodukovateľnosť, dlhší čas ekvibrácie a sú náchylné na vyplavovanie viazaných stacionárnych fáz, čo znemožňuje ich použitie s hmotnostnou detekciou [61].

Ďalej sa využívajú kolóny so stacionárnymi fázami ako C18 [66,67,68], amidové C16 [65] a HILIC kolóny (hydrophilic interaction liquid chromatography, hydrofilná interakčná kvapalinová chromatografia) [19]. Kolóny s reverznými fázami (RP, reversed phase) vykazujú nízku separačnú schopnosť pri delení ST a Reb A [61]. Tento problém sa dá odstrániť gradientovou elúciou [68] alebo zapojením dvoch kolón za sebou [59].

Detekcia sa najčastejšie prevádza pomocou UV [64,66,68], MS [59,61,69,70,71], zriedkavejšie pomocou pulznej ampérometrie [72] a fluorescenčného detektora [73]. Separácia SVgly sa môže uskutočniť aj pomocou kapilárnej elektroforézy (CE, capillary electrophoresis) [74] a micelárnej CE. Ďalšími metódami, ktoré sa využívajú na analýzu, sú plynová chromatografia (GC, gass chromatography) [59], vysokoúčinná chromatografia na tenkej vrstve (HPTLC, high performance thin-layer chromatography) [7], kolorimetria, enzymatická analýza, blízka červená spektroskopia (NIR, near-infrared spectroscopy), kvapková protiprúdna chromatografia (DCC, droplet counter-current chromatography) [59].

4.3.1 HPLC-UV, CAD, ELS

JECFA publikovala v roku 2004 monografiu pre stanovenie SVgly metódou HPLC. Separácia prebieha na kolóne Supelcosil LC-NH₂, alebo na podobnej kolóne

s dĺžkou 15 až 30 cm a vnútorným priemerom 3,9 až 4,6 mm. MF pozostáva z ACN/voda v pomere 80:20, okyslená kyselinou fosforečnou na hodnotu pH=3. Objem nástreku je 5– 10 µl, teplota kolóny 40 °C a vlnová dĺžka UV detekcie je nastavená na 210 nm. Metóda je špecifická pre rýchlosť prietoku MF do 2 ml/min. Rýchlosť prietoku MF je zvolená tak, aby bol retenčný čas ST približne 10 minút. Avšak, pomerne vysoký prietok mobilnej fázy počas celej analýzy, ktorá trvá 25 minút, spôsobuje jej vysokú spotrebu, a to 25– 50 ml [60,75,76]. Identifikácia prebieha zónovou metódou pomocou relatívnych retenčných časov SVgly ku retenčnému času Reb A [77].

Úpravou chromatografických podmienok pôvodnej metódy JECFA, pre analýzu siedmich SVgly, vznikla rýchlejšia a spoľahlivejšia metóda na stanovenie deviatich SVgly. Na rozdiel od zónovej metódy využíva izokratickú elúciu s UV detekciou a kolónou s oktadecylsylanovými skupinami Capcell Pak C18 MGII (4,6×250 mm, 5 µm), namiesto pôvodnej kolóny a amínovými skupinami. Teplota kolóny je 40 °C a elúcia prebieha 40 minút s mobilnou fázou v pomere 32:68 pre acetonitril/pufor fosforečnanu sodného (10 mM, pH=2,6) a prietokom 1 ml/min. Každý SVgly je samostatne identifikovaný pomocou jednotlivých referenčných roztokov. Štandard pre kvantifikáciu samostatného ST bol nahradený štandardom kombinujúcim ST aj Reb A pre ich súčasnú kvantifikáciu. V roku 2010 túto prepracovanú metódu prevzala JECFA [77].

Sakamaki a kol. použili metódu RP-HPLC s UV detekciou na simultánne stanovenie ST a Reb A pomocou kolóny Develosil RP Aqueous-AR-5 (250×4,6 mm), s mobilnou fázou s objemovým pomerom 90/5/5 pre 0,02 M kyselinu fosforečnú, ACN1 a metanol. Detekcia prebiehala pri 210 nm [79].

Jaworska a kol. použili Acclaim Mixed-Mode Wax-1, Dionex kolónu v zmiešanom móde s reverznými fázami a lineárnym gradientovým programom na stanovenie steviolu a siedmich SVgly. MF pozostávala z deionizovanej vody upravenej na pH=3 pomocou kyseliny fosforečnej a z ACN. Na stanovenie ST, RebA a iných SVgly využili UV detekciu [78].

Na zlepšenie kvantifikácie SVgly pri UV detekcii, sa môže použiť detekcia nabitého aerosólu (CAD, charged aerosol detection). Separácia glykozidov prebieha na kolóne Thermo Scientific Acclaim Trinity P1, s MF v pomere 81:19 pre ACN/mravčan amónny s hodnotou pH=3. Táto metóda využíva mód HILIC ktorý umožňuje separáciu viacerých SVgly. S použitím prchavej MF sa môže analýza detekovať detektorom nabitého aerosólu, čím sa zároveň zvýši flexibilita detekcie SVgly so slabým absorpčným spektrom. Ďalšou výhodou je aj menšia spotreba MF (3–9 ml/ vzorka) pri použití kolóny s priemerom 2,1 mm, v porovnaní s metódou publikovanou JECFA [60].

Ďalšou detekčnou metódou, ktorá by zlepšila kvantifikáciu SVgly je detektor rozptylu svetla (ELS, evaporative light scattering detector) v kombinácii s UV detekciou. SVgly sú separované na kolóne Thermo Scientific Acclaim Mixed-Mode WAX-1 v móde HILIC, MF je 80:20 ACN/mravčan amónny s hodnotou pH=3,0. Použitím prchavej MF

je ELS detekcia uskutočniteľná a zároveň sa zvyšuje flexibilita metódy detekcie SVgly, ktoré majú slabé UV absorpčné spektrum. Navyše pri použití kolóny s priemerom 2,1 mm sa redukuje spotreba roztokov na 12,5 ml na vzorku, z pôvodných 25–50 ml na vzorku s metódou JECFA [76].

4.3.2 HPLC s elektrochemickou detekciou- PAD

Smith a kolektív vytvorili metódu na stanovenie ST z listov stévie. Metóda spája HPLC separáciu s pulznou ampérometrickou detekciou (PAD, pulsed amperometry detection). MF so zložením 80:20 pre ACN/voda má prietok 1 ml/min na kolónu LiChrosorb NH₂ (5 μm, 250 mm×4 mm), ktorá je termostatovaná na 50 °C. Eluent následne prechádza UV detektorom nastaveným na 210 nm a potom sa zmiešava s 0,1 mol/l hydroxidom sodným (prietok 5 ml/min) tak, aby mal výsledný roztok hodnotu pH>12, potrebnú pre elektrochemický detektor. Roztok ďalej prechádza cez teflonovú reakčnú celú, kde sú SVgly detekované pomocou PAD. Detekcia pomocou PAD má vyššiu selektivitu v porovnaní s UV detekciou pri 210 nm. Táto metóda je vhodná predovšetkým na stanovenie malých množstiev ST v potravinách [72].

4.3.3 Metódy HPLC-MS

HPLC v kombinácii s MS detekciou predstavuje jednoduchú a efektívnu analytickú metódu na stanovovanie ST a niektorých ďalších SVgly, avšak nie všetkých. Je to z dôvodu ich podobnej retencie, čo by spôsobilo, že ich píky by sa vzájomne prekrývali a tiež z dôvodu rovnakej hodnoty m/z niektorých SVgly [59].

Koyama a kol. vytvorili metódu na súčasné stanovovanie deviatich rôznych sladidiel (acesulfam K, sacharóza, sacharín, cyklamát, aspartam, dulcin, glycyrrhizín, ST, Reb A) v potravinách. Stanovenie prebieha pomocou metódy HPLC s ionizáciou elektrosprejom (ESI, electro spray ionization) a MS detekciou. HPLC separácia prebieha na kolóne ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2,1×150 mm). MF obsahuje 5 mM dibutylamoniaku kyseliny octovej a ACN/voda v pomere 80:20. Hmotnostné spektrum sa získa v móde negatívne nabitých iónov a režime selektívneho záznamu jedného alebo viacerých iónov (SIM, selective ion monitoring) [69].

Zimmermann a kol. vytvorili HPLC-MS analytickú metódu na separáciu a stanovovanie SVgly s využitím HILIC módu na kolóne Kinetex s core-shell časticami (150 mm×2,1 mm, 2,6 μm). MF je zložená z mravčanu amónneho (5 mM, pH=3) vo vode a ACN v pomere 5:95. Kolóna je termostatovaná na 40 °C s konštantným prietokom 0,66 ml/min. Detekcia prebieha detektorom s diódovým poľom, ktorý skenuje vlnové dĺžky 190 až 400 nm. MS detekcia prebieha pomocou trojitého kvadrupólu s ionizáciou ESI a v negatívnom SIM móde so skenovaním (m/z): 641,7; 787,8; 308,8; 949,8; 965,8. Teplota iónového bloku je 150 °C a desolvatačná telota je nastavená na 400 °C. Napätie

na kapiláre je 2 kV a na kónuse 28 kV. Vďaka tandemovému usporiadaniu MS detektora je možné rozdeliť aj izoméry SVgly. Analýza všetkých SVgly prebieha do 8 minút, avšak pre kvantitatívnu analýzu je vhodnejšie zvoliť gradientovú elúciu. Táto metóda nie je vhodná na stanovenie aglykovaného steviolu, pretože jeho elúcia z kolóny nastáva takmer v mŕtvom čase [61].

Woelwer-Rieck a kol. vytvorili jednoduchú HPLC-MS metódu na stanovenie hlavných SVgly z listov stévie a z potravín, ktorá potrebuje len minimálne množstvo organických rozpúšťadiel a vďaka extrakcii na tuhú fázu (SPE, solid phase extraction) skracuje čas analýzy. Separácia prebieha na kolóne Luna HILIC (250 mm×4,6 mm, 5 μm) a predkolóny (4×3 mm). MF pozostáva z ACN a vody v pomere 85:15 s prietokom 1 ml/min, teplota kolóny je 36 °C. Detekcia prebieha pomocou UV detektora pri 210 nm. Na overenie výsledkov UV detekcie sa použije MS detekcia s ESI ionizáciou v negatívnom móde s iónovou pascou. Desolvatačná teplota je nastavená na 350 °C. Skenované (m/z)⁻ sú: 317, 479, 641, 803 a 965. Objem nastrekovanej vzorky je 10 μl. Dlhší retenčný čas ST a Reb A je v tomto prípade výhodou, pretože zvyšuje robustnosť metódy [71].

4.3.4 2D-LC-MS

Kolektív Jaroslava Póla vytvoril metódu dvojdimenzionálnej kvapalinovej chromatografie (2D-LC, two dimensional liquid chromatography), ktorá ponúka vysokú separačnú účinnosť, pretože spája dve kolóny s odlišným separačným mechanizmom. Analyzovaná vzorka v tomto prípade prechádza oboma kolónami. Vytvorená metóda predstavuje kombináciu 2D-LC a MS detekcie s ESI ionizáciou. Kombinácia C18 kolóny ako prvej dimenzie a NH₂ kolóny ako druhej dimenzie umožňuje úplné oddelenie všetkých SVgly. Mobilná fáza má zloženie 1:1 pre voda/ACN. Ku retencii látok dochádza pravdepodobne zmiešaným mechanizmom rozdeľovania a adsorpcie. Tretiu dimenziu predstavuje MS detekcia s analyzátorom doby telu (TOF, time of flight), ktorý pracuje v negatívnom móde a detekuje (m/z)⁻ v rozmedzí 150–1400. Napriek tomu, že 2D-LC rozdelí všetkých deväť SVgly, prietokový detektor nedokáže rozoznať, ktorý z dvoch píkov s m/z 965 patrí Reb A a Reb E [59].

4.3.5 UHPLC-MS

Gardana a kol. vyvinuli UHPLC-MS metódu s ESI ionizáciou MS detekciou na analýzu SVgly v potravinových doplnkoch a listoch stévie. Identita SVgly sa predbežne stanovila porovnaním ich UV spektier, stanovením molekulovej hmotnosti, MS/MS fragmentačnou štúdiou alebo pomocou chromatografie so štandardmi. Rutinná analýza prebieha v selektívneho záznamu reakcie (SIR, single ion recording), kde sa monitorujú negatívne nabité chlórne adukty SVgly [70].

SVgly sa extrahujú pomocou metanolu, extrakt sa následne prečistí pomocou SPE kolónky. Separácia SVgly prebeha na UHPLC HSS C18 kolóne (150 mm×2,1 mm, 1,8 μm) pri 80 °C a prietokom MF 0,5 ml/min. Separácia má gradientový charakter, rozpúšťadlom A je 2 mmol/l mravčan amónny s pH=6,5, rozpúšťadlom B je 0,1% dichlórmetán v ACN. Gradient je nasledovný: 40 % B po dobu 1,5 minúty, zo 40 % na 65 % B za 10 sekúnd a následne 65 % B po dobu 30 sekúnd, zo 65 % na 85 % B za 10 sekúnd a následne 85 % po dobu 1,5 minúty. Na zvýšenie senzitivity sa do MF pridávajú Cl⁻ vo forme dichlórmetánu. Autori uvádzajú, že daná metóda sa môže využívať na rutinnú analýzu pri kontrole kvality stéviových listov a produktov z nich zhotovených. Analýza SVgly prebieha v móde SIR monitorovaním m/z⁻ iónu zodpovedajúceho [M+Cl³⁵]⁻ a [M+Cl³⁷]⁻. Konkrétne sa monitoruje (m/z)⁻ 551 a 553 pre monoglykozidy steviolu, (m/z)⁻ 677 a 679 pre steviolbiozid, (m/z)⁻ 823 a 825 pre dulkozid A, (m/z)⁻ 839 a 841 pre ST, (m/z)⁻ 985 a 987 pre Reb C, (m/z)⁻ 1001 a 1003 pre Reb A. Napätie na kapiláre je nastavené na 3 kV, zatiaľ čo napätie na vstupnom kuželi je špecifické pre každý SVgly. Teplota iónového bloku je 130 °C a desolvatačná teplota je nastavená na 380 °C [70].

4.3.6 Kapilárna elektroforéza

Prvé pokusy o analýzu SVgly využívali práve CE. Separčný elektrolyt obsahoval tetrabóran sodný s prídavkom organického rozpúšťadla a separácia prebiehala kapilárnou zónovou elektroforézou (CZE, capillary zone electrophoresis). Pridaním dodecylsulfátu sodného (SDS, sodium dodecyl sulphate) do tetrabóranu sodného, prebieha separácia micelárnou elektrokinetickou chromatografiou (MEKC, micellar electrokinetic chromatography). Novšie štúdie využívajú prídavok beta-cyklodextrínu do fosfátového pufru na stanovenie ST a Reb A pomocou CE. Detekcia SVgly bez ich predchádzajúcej derivatizácie prebieha pri CE najčastejšie pomocou UV, zatiaľ čo CZE extraktu zo stéviových listov využíva častejšie citlivú MS detekciu. Citlivosť stanovení CE je nízka, preto sa využíva len na stanovenie koncentrovaných extraktov stévie a nie na stanovenie SVgly z potravín [74].

Pre analýzu ST a Reb A v potravinách a nápojoch sa využíva kombinácia CE a citlivého bezkontaktného kondukčného detektora (C⁴D, contactless conductivity detector). V porovnaní s HPLC má CE niekoľko výhod, ako je kratšia doba analýzy, jednoduchá príprava vzorky, ktorá spočíva len v jej rozpustení a miniaturizácia celého procesu s minimálnou spotrebou reagensov [74].

Separácia SVgly prebieha v roztoku základného elektrolytu pozostávajúceho z H₃BO₃/LiOH s koncentráciou 170 mM a pri pH=9. Lítium je vybrané z dôvodu nízkej konduktivity jeho iónov. Do základného elektrolytu sa pridáva 0,5% INST, neutrálny vodou rozpustný polymér, ktorý vytvára na vnútornom povrchu kapiláry film

a spomaľuje elektroosmotický tok, čo má za následok lepšie oddelenie SVgly. Separácia prebieha na kapiláre s vnútorným priemerom 10 μm a separačnou dĺžkou 31,5 cm. V takomto usporiadaní je migračný čas Reb A približne 5,7 minúty a pre ST 5,9 minúty. Na rozdiel od UV detekcie, kedy SVgly slabo absorbujú toto žiarenie, sa na zvýšenie citlivosti využije C^4D . Citlivosť tejto detekcie závisí od konduktivity základného elektrolytu v kapiláre a nie od dĺžky optickej dráhy ako pri UV detekcii (kapilára s priemerom 10 μm). Táto metóda nevyžaduje ani derivatizáciu vzorky [74].

4.4 Podobné metódy stanovenia stéviových glykozidov

V tejto kapitole sa venujeme publikovaným metódam stanovenia SVgly, ktoré používajú na analýzu podobné typy chromatografických kolón (povrchovo porézne častice), separačných módov (RP a HILIC) a podmienok analýzy (zloženie MF), ako nami vytváraná metóda. Prípadne, sú to metódy, ktoré využívajú pri príprave vzorky SPE extrakciu SVgly.

4.4.1 Reverzné fázy

Firma Supelco demonštratívne publikovala metódu stanovenia SVgly z extraktu listov stévie, s využitím ich kolóny Ascentis Express RP-Amide (150 \times 2,1 mm; 2,7 μm) s povrchovo poréznymi časticami. Stanovovali RebA, ST, steviolbiozid, dulkozid A a steviol. Na separáciu SVgly z extraktu využili gradientivú elúciu. MF typu A pozostáva 10 mM mravčanu amónneho rozpusteného vo vode, MF typu B pozostáva z 10 mM mravčanu amónneho rozpusteného v zmesi ACN/ H_2O v pomere 95:5. Chromatografická kolóna sa termostatuje na 35 $^\circ\text{C}$, prietok MF je 0,2 ml/min a objem nástreku vzorky je 1 μl . Analýza prebiehala na prístroji Agilent 1200SL Rapid Resolution a na detektore Agilent 6210 TOF, ESI (+). Profil gradientu:

minúta	% A	% B	prietok
0.00	100	0	0.2
10.00	100	0	0.2
40.00	0	100	0.2
45.00	0	100	0.2
45.01	100	0	0.4
57.00	100	0	0.2
60.00	100	0	0.2

Retenčný čas ST je 23,63 minúty a RebA 23,016 minúty [80].

Ursula Woelwer-Rieck a kolektív publikovali RP-HPLC metódu na stanovenie hlavných SVgly, ST a RebA. Metóda stanovuje obsah SVgly v listoch stévie získaných kombináciou vodnej extrakcie a následne SPE extrakcie. Metóda bola vytvorená na

systeme Varian s detektorom diódového poľa nastaveného na vlnovú dĺžku 210 nm a následnou MS detekciou a ESI v negatívnom móde. K rozdeľovaniu STgly použili analytickú kolónu Luna NH₂ 100 A (250×4,6 mm; 5 μm) Phenomenex, termostatovanú na 36 °C. Zloženie MF bolo CAN/H₂O v pomere 75:25 s prietokom 1 ml/min a objemom nástreku vzorky 20 μl. Retenčný čas ST je 5,4 minúty a RebA 6,6 minúty [71].

Dominik Bergs a kolektív publikovali RP-HPLC metódu na stanovenie deviatich SVgly. Separácia SVgly prebieha na analytickej kolóne Purospher STAR RP-18 Hibar endkapovaná (250×4,6 mm; 3 μm) Merck. Kolóna je termostatovaná na 50°C. MF je zložená z vysokočistej vody okyslenej na hodnotu pH=2,75 s HCl a z ACN v pomere 65:35. Jedná sa o izokratickú metódu s prietokom 1 ml/min a s UV detekciou pri 210 nm. Objem nástreju vzorky je 10 μl. Celá analýza trvá menej ako 15 minút. Retenčný čas ST je 6,05 minúty a RebA je 5,72 minúty [81]

4.4.2 HILIC

Jurková a Olšovská publikovali metódu na stanovenie RebA v limonádach, ochutených pivách a nápojoch na báze piva. Separácia prebiehala na HPLC prístroji Dionix Ultimate 3000, Thermo Scientific so zapojenou kolónou na báze HILIC, Acclaim Mixed-Mode WAX 1 (2,1×50 mm; 5 μm) Thermo Scientific. MF pozostáva z ACN a 10 mM mravčanu amónneho s hodnotou pH=3 v pomere 80:20. Separácia prebieha v izokratickom režime. Prietok MF je 0,5 ml/min, teplota kolóny je nastavená na 40 °C a nástrek vzorky má objem 5 μl. RebA je detekovaný pri 210 nm UV detekciou. Retenčný čas RebA je za daných podmienok 9,75 minúty [19].

Deanna Hurum a Jeffrey Rohrer publikovali metódu pre stanovenie dulkozidu A, ST, RebA, steviolbiozidu a ReBB v komerčných sladidlách. Separácia prebieha v móde HILIC a detekcia sa uskutočňuje s DAD detektorom pri 210 nm. Stanovenie prebieha na kolóne Acclaim Trinity P1, Thermo Scientific (2,1×100 mm; 3 μm). MF pozostáva z ACN a 10 mM mravčanu amónneho s hodnotou pH=3, v pomere 81:19. Prietok MF je 0,3 ml/min, teplota kolóny je nastavená na 20 °C a objem nástreku vzorky je 5 μl. Za daných podmienok je retenčný čas ST 3,52 minúty a RebA 4,42 minúty [60].

Deanna Hurum a Jeffrey Rohrer publikovali metódu pre stanovenie SVgly v komerčných sladidlách. Sladidlá sú detekované pomocou UV detekcie pri 210 nm a ELS detekciou. Separácia SVgly prebieha na kolóne Acclaim Mixed-Mode WAX-1 (2,1×150 mm; 5 μm). MF pozostáva z ACN a 10 mM mravčanu amónneho s hodnotou pH=3, v pomere 80:20. Prietok MF je 0,5 ml/min, teplota kolóny je 40 °C a nástrek vzorky má objem 5 μl. Retenčný čas ST je 7,81 minúty a RebA je 11,08 minúty [76].

Benno F. Zimmermann a Ursula Woelwer-Rieck testovali separačnú schopnosť piatich rôznych HILIC kolón za izokratických podmienok. Detekcia SVgly prebiehala MS detekciou. Testované kolóny a ich optimálne podmienky na stanovenie SVgly:

- Nucleodur HILIC (125×2 mm; 3 μm), zwitterióny, Macherey-Nagel. Prietok 3,2 ml/min, MF z 10 mM mravčanu amónneho:ACN v pomere 14:86. Retenčný čas ST je 2,66 min a RebA 5,01 min.
- Luna HILIC (150×3 mm; 3 μm), doily, Phenomenex. Prietok 0,68 ml/min, MF z 5 mM mravčanu amónneho:ACN v pomere 11:89. Retenčný čas ST je 4,09 min a RebA 6,91 min.
- Kinetex HILIC (150×2,1 mm; 2,6 μm), čistá silika, core-shell častice, Phenomenex. Prietok 0,66 ml/min, MF z 5 mM mravčanu amónneho:ACN v pomere 7,5:92,5. Retenčný čas ST je 3,03 min a RebA 6,06 min.
- TSKgel Amide-80 (150×2 mm; 3 μm), karbamoyl, Tosoh. Prietok 0,45 ml/min, MF z 5 mM mravčanu amónneho:ACN v pomere 17,5:82,5. Retenčný čas ST je 3,55 min a RebA 6,17 min.
- Acquity UPLC BEH HILIC (100×2,1 mm; 1,7 μm), polyetoxysilan, Waters.

Teplota kolóny bola 40 °C a objem nástreku 1 μl a diódový detector bol nastavený na 190–400 nm. Jedine Acquity UPLC BEH HILIC nebola vhodná na separáciu SVgly, pretože eluovali v mŕtvom retenčnom čase. Na rozdiel od koncentrácie pufru, hodnota pH nevlývala na retenciu SVgly pri žiadnej z testovaných kolón [61].

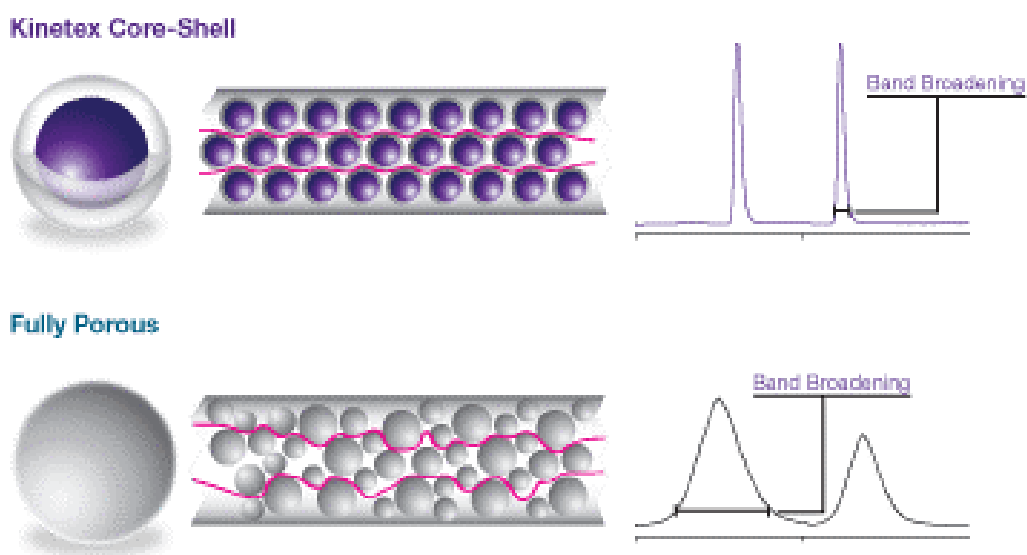
4.5 Povrchovo porézne častice

V našej diplomovej práci používame na stanovenie SVgly kolónu s povrchovo poréznyimi časticami (Core-Shell, Fused-Core), práve preto je jedna kapitola venovaná ich použitiu, špecifikám, výhodám a nevýhodám.

Základnou charakteristikou kolón s povrchovo poréznyimi časticami je úzka distribúcia veľkosti častíc. Nové spôsoby výroby povrchovo poréznych častíc s pevným jadrom umožňujú produkciu takmer rovnako veľkých častíc, čo má za následok, že vyplňajú priestor homogénnejšie a majú medzi sebou len veľmi úzke medzery. Takáto distribúcia častíc umožňuje použitie frit s vyššou porozitou, čím sa predchádza upchatiu kolón [80].

Povrchovo porézne častice sú charakteristické svojou štruktúrou, ktorá pozostáva z pevného, neporézneho silikagélového jadra a jeho homogénne porovaného a odolného obalu. Častice sa vyrábajú so sol-gélu s využitím štruktúrnych nanotechnológií. Špecifická morfológia častíc zabraňuje rozširovaniu zón (obrázok 10) a tým zaisťuje extrémne vysokú účinnosť, na rozdiel od plne poréznych častíc [82].

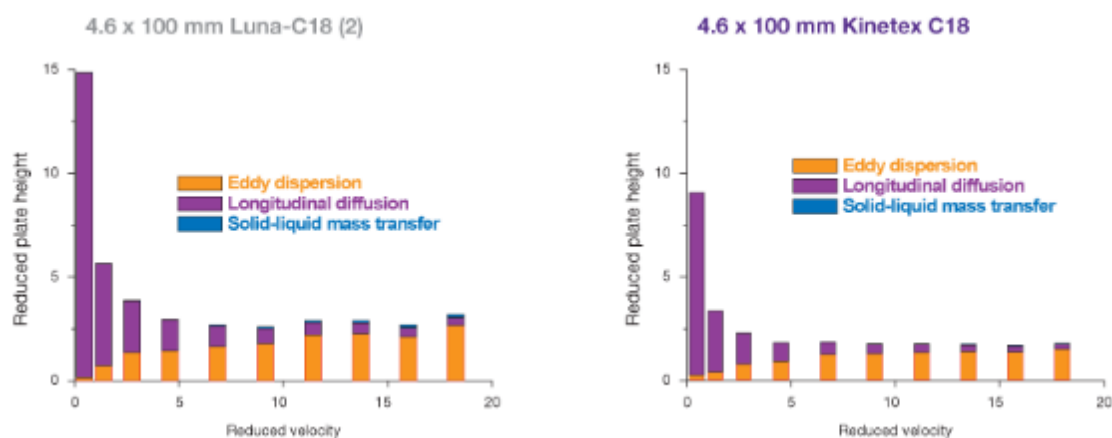
Ďalšou charakteristickou vlastnosťou, je vysoká konzistencia plnenia kolón. Keďže člen A van Deemterovej krivky, ktorý predstavuje vírivú difúziu MF, je ovplyvňovaný práve nehomogénnym plnením kolóny, povrchovo porézne častice so svojou pravidelnou veľkosťou, vysokou homogenitou rozloženia v kolóne a veľmi úzkymi priestormi medzi časticami, minimalizujú difúziu analytu v kolóne. Taktiež je dôležité, že vírivú difúziu neovplyvňuje rýchlosť prúdenia MF [80].



Obrázok 10 Rozširovanie elučnej zóny v kolóne s plne poréznyimi a povrchovo poréznyimi časticami [82]

Rozširovanie elučných zón je popísané tromi členmi Van Deemterovej teórie: A- vírivá difúzia MF, B- pozdĺžna difúzia analytu, C- odpor voči prenosu hmoty. Aby sa

zvýšila účinnosť separácie, je potrebné minimalizovať rozširovanie zón, čo umožňuje práve štruktúra povrchovo poréznych častíc (obrázok 11). Výsledkom je lepšie rozlíšenie, citlivosť a lepšie parametre píkov [82].



Obrázok 11 Porovnanie vplyvu členov Van Deemterovej teórie na separáciu s plne porézными (v ľavo) a povrchovo porézными (v pravo) časticami [82]

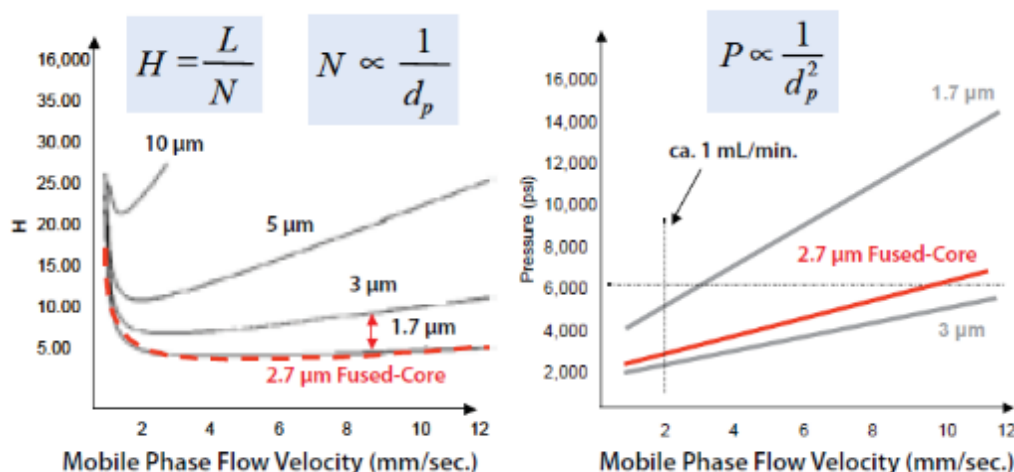
Tým, že difúzia analytu môže prebiehať len vo vymedzenej poréznej časti na povrchu častice, na rozdiel od plne poréznych častíc, sa skracuje dĺžka úseku difúzie analytu v poréznej časti. Minimalizuje sa tým odpor voči prenosu hmoty, člen C van Deemterovej krivky, a povrchovo porézne častice tak umožňujú získanie ostrejších píkov. Zároveň, kratší úsek difúzie umožňuje použitie vyšších prietokov MF bez rozšírenia píkov a straty účinnosti kolóny (obrázok 12) [80].

Tabuľka 3 Porovnanie často používaných dĺžok kolón s niekoľkými typmi častíc a ich typickým počtom teoretických priehradok, modifikované podľa [80]

Veľkosť častíc (µm)	Dĺžka kolóny (mm)	Efektivita (N/mm)	Počet teoretických priehradok (N)
5	150	100	15000
5	100	100	10000
5	50	100	5000
3	100	150	15000
3	50	150	7500
3	30	150	4500
2,7 Fused-Core	100	250	25000
2,7 Fused-Core	50	250	12500
2,7 Fused-Core	30	250	7500
2,7 Fused-Core	20	250	5000

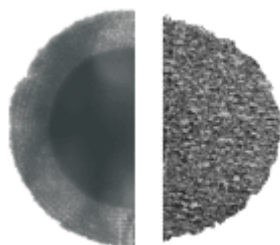
Z tabuľky 3 vyplýva, že rovnaký počet teoretických priehradok so zapojením kratšej kolóny môžeme dosiahnuť práve zmenšením častíc. Zároveň tým môžeme dosiahnuť vyššiu rýchlosť analýz za izokratických podmienok. Rýchlosť HPLC separácie môžeme upravovať aj zapojením kratších kolón s menšími časticami a vyšším prietokom. Avšak, so zvyšujúcim sa prietokom sa stráca potrebné rozlíšenie v dôsledku straty efektivity k čomu dochádza aj u obľúbených 3 µm častíc [80].

V mieste, kde začína van Deemterova krivka prudko klesať, so znižovaním veľkosti častíc alebo so zmenou na Fused-Core častice, obe veličiny H (výška teoretickej priehradky) a N (počet teoretických priehradok) ostávajú konštantné aj pri vyšších prietokoch. Práve táto plochá van Deemterova krivka umožňuje kombinovať vyššie prietoky s kratšími kolónami, čím získame rýchlejšie separácie aj bez výraznej straty rozlíšenia (obrázok 12) [80].

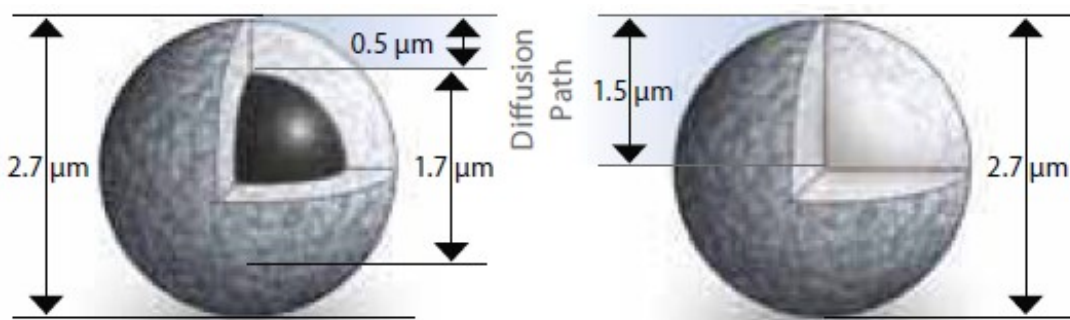


Obrázok 12 Porovnanie vplyvu prietoku mobilnej fázy na účinnosť kolón s rôznymi časticami a na zvyšovanie spätného tlaku [80]

Merania v našej diplomovej práci prebiehajú na kolóne Ascentis Express RP-Amide, ktorá je založená na časticách s technológiou Fused-Core. Tento typ kolóny je vhodný pre technológiu UHPLC. Fused-Core častice obsahujú na svojom povrchu tenkú 0,5 µm poréznu vrstvu silikagélu a pevné neporézne silikagélové jadro s priemerom 2,7 µm (obrázok13 a obrázok 14) [80].



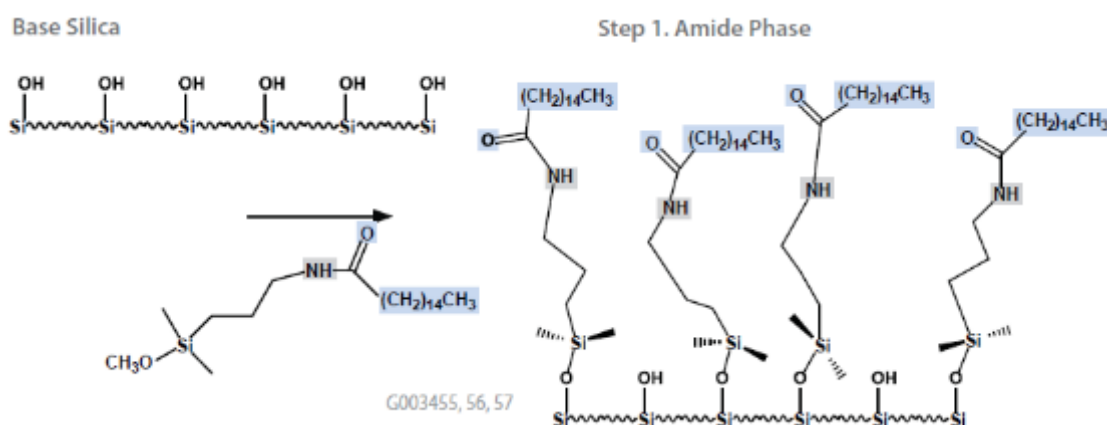
Obrázok 13 Mikroskopický pohľad na prierez povrchovo poréznej (v ľavo) a plne poréznej častice (v pravo) [82]



Obrázok 14 Porovnanie štruktúry povrchovo (v ľavo) a plne poréznych častíc (v pravo) [80]

Kolóna Ascentis Express RP-Amide je vhodnou alternatívou k C18 reverzným fázam a ich selektivite. Poskytuje lepšiu tvar píkov bázických látok a je kompatibilná aj so 100% vodnými MF. Kolóna má zvýšenú selektivitu pre polárne zložky, predovšetkým tie, ktoré sa správajú ako donor vodíkovej väzby. Fenoly, karboxylové kyseliny, amíny a alkoholy majú zvýšenú retenciu v porovnaní s neutrálnymi alebo polárnymi látkami [80].

Naviazanie stacionárnej fázy v kolóne Ascentis Express RP-Amide prebieha v jednom kroku (obrázok 15). Na rozdiel od naviazania amidu cez viac medzistupňov, neostávajú voľné ligandy pre amino skupiny a zlepšuje sa reprodukovateľnosť meraní [80].



Obrázok 15 Proces tvorby stacionárnej fázy naviazaním amidu na povrch silikagélu v jednom kroku [80]

4.6 Hydrofilná interakčná chromatografia

Označenie HILIC ako prvý navrhol v roku 1990 Alpert. HILIC predstavuje jednu z techník chromatografie, ktorá umožňuje predovšetkým separáciu malých, hydrofilných, polárnych a nabitých analytov, na rozdiel od hydrofóbných a nepolárnych analytov. Analyty interagujú s hydrofilnou, polárnou stacionárnou fázou. Elúcia je zabezpečená relatívne hydrofóbnou binárnou MF, ktorá obsahuje vyšší podiel menej polárneho rozpúšťadla s nižšou elučnou silou (napr. ACN) a nižší podiel rozpúšťadla s vysokou elučnou schopnosťou (napr. voda). Obsah vodnej zložky v MF je najčastejšie 5 až 40 %, prípadne môže byť vodná zložka obohatená o pufor. So zvyšovaním vodnej zložky v MF sa skracuje retenčný čas analytov a naopak, zvyšovaním menej polárnej zložky MF sa retenčný čas analytov predlžuje [83].

Z historických dôvodov sa uvádza, že HILIC predstavuje komplikovanejšiu variantu HPLC separácie na normálnych fázach (NP-HPLC, normal phase HPLC). Tak isto využíva tradičné polárne stacionárne fázy (SF), ako sú silikagélové, ktoré môžu mať naviazané amino alebo kyanidové skupiny [83,84,85,86]. Avšak, MF, ktorá sa využíva, je skôr podobná módu RP-HPLC [87,88,89]. Navyiac, podobne ako iónovo výmenná chromatografia, aj mód HILIC umožňuje separáciu nabitých zložiek [90]. V porovnaní s RP-HPLC, sa gradientová elúcia začína organickým rozpúšťadlom s nižšou polaritou, a polárne analyty eluujú až s MF so zvýšeným obsahom vodnej zložky [91].

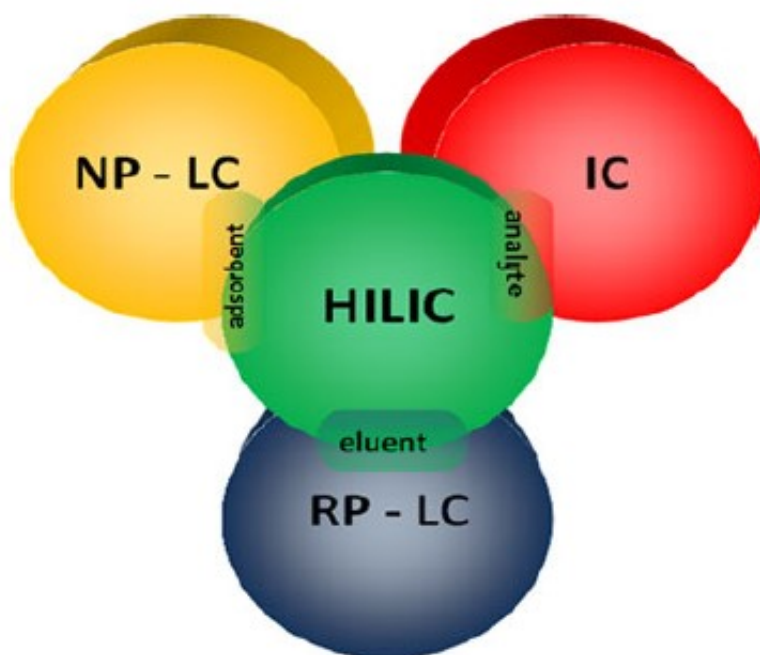
4.6.1 Výhody a nevýhody separačnej metódy HILIC

- Vysoký podiel organickej zložky v MF umožňuje spojenie s ionizáciou ESI a MS detekciou [91],
- extrakty získané na SPE kolónkach s C18 SF sú eluované rozpúšťadlom s vysokým obsahom organickej zložky, čo umožňuje ich priamy nástrek do systému HPLC [83],
- nižšia viskozita MF, vďaka vysokému podielu organickej zložky ako napr. ACN, umožňuje použitie vyšších prietokov, aj bez prudkého poklesu účinnosti [83],
- nižšia viskozita MF umožňuje zapojenie dlhších kolón, až s dvojnásobnou dĺžkou v porovnaní s RP-HPLC, zatiaľ čo spätný tlak ostáva približne na rovnakej hodnote [89],
- na rozdiel od RP-HPLC, základné látky poskytujú lepší tvar píkov bez chvostovania [89],
- metóda HILIC je vhodná na analýzu zložiek z komplexných vzoriek, ktoré v RP-HPLC eluujú blízko mŕtveho retenčného času [91],
- polárne vzorky sú vďaka vodnej MF v HILIC veľmi dobre rozpustné, na rozdiel od ich slabšej rozpustnosti pri separácii na NP-HPLC [91],

- separácia HILIC nevyžaduje žiadne finančne náročné iónopárové reagenty [91],
- potenciálnym nedostatkom HILIC kolón môže byť ich preťaženie, ktoré sa prejavuje frontovaním pík v dôsledku interakcií analytu so SF, avšak na rozdiel od RP-HPLC je preťaženie ionizovanými bázickými zložkami menej závažné [89,92].

HILIC predstavuje metódu voľby pre nenabité vysoko hydrofilné a amfifilné analyty, ktoré sú príliš polárne na to, aby boli v systéme s RP zadržované, a zároveň nemajú dostatočný náboj na efektívnu elektrostatickú retenciu pri iónovymennej chromatografii. Separácie HILIC predstavujú riešenie predtým obtiažnych separácií, ako napríklad separácie malých organických kyselín, bázických liečiv a množstva ďalších neutrálnych a nabitých zložiek [90]. Úspešne sa využíva napríklad na analýzu sacharidov [93,94], peptidov [84,95,96] a polárnych liečiv [87,97].

Obrázok 16 HILIC kombinuje charakteristiky reverzných fáz, normálnych fáz a iónovymennej chromatografie [90]



4.6.2 Stacionárne fázy

Na HILIC separácie sa môže využívať akýkoľvek polárny chromatografický povrch. Typické HILIC SF pozostávajú z čistého silikagélu alebo jeho modifikácií s polárnymi funkčnými skupinami. Tak isto sa môžu využívať polárne SF na báze polymérov alebo hybridných materiálov, ktoré umožňujú použitie širšieho pracovného rozsahu pH [90].

Kolóny so SF v podobe čistého silikagélu sú výhodou pri MS detekcii, pretože neobsahujú naviazané žiadne polárne ligandy, ktoré by sa mohli uvoľňovať a spôsobovať „krvácenie kolóny“, ktoré by ovplyvňovalo pozadie detektora [88].

SF využívané na separáciu HILIC môžeme rozdeliť do troch hlavných skupín: **neutrálne** – bez elektrostatických interakcií (diol, amid, cyklodextrín), **nabité** – silné elektrostatické interakcie (silikagél, aminopropyl silikagél), **zwitterióny** – slabé elektrostatické interakcie (sulfobetain) [89].

Najväčšiu skupinu predstavujú kolóny založené na silikagéloch. Analyty s nabitými bázičnými skupinami vykazujú silnejšiu retenciu v dôsledku ich silne hydrofilnej povahy. SF na báze silikagélu môžu túto retenciu zosilovať interakciami ionizovaných silanolových skupín s ionizovanými bázami, ktoré sú v MF čiastočne alebo úplne protonované [83]. Naopak, silne kyslé analyty sa budú so silanolovými skupinami odpudzovať, čím sa zníži ich retencia. Tento proces vieme upravením zloženia MF ovplyvniť [92].

Súčasnú stacionárnu fázu pôsobia často na princípe zmiešaných typov interakcií. Výrobcovia predávajú tradičné HILIC kolóny ale aj ich sofistikovanejšie verzie. Štruktúrne variácie HILIC stacionárnych fáz sú rôznorodejšie než stacionárne fázy využívané pre RP-HPLC. Napriek tomu, že množstvo rôznych typov stacionárnych fáz pre HILIC rastie, stále sa žiadna nedá označiť za tak univerzálnu, ako je napr. C18 pre RP-HPLC. Jednotlivé typy separačných materiálov pre HILIC sa líšia retenčnými charakteristikami a separačným procesom [92].

Silikagély typu A sú kyslé, pretože sú znečistené prímiesou určitých kovov, ktoré aktivujú povrchové silanolové skupiny a vytvárajú komplexy s niektorými chelatujuúcimi látkami. To spôsobuje silnú retenciu a tvorbu asymetrických pík [92].

Silikagély typu B sú len málo kontaminované kovmi a sú stabilnejšie pri vyšších hodnotách pH. Silikagély typu B poskytujú vo všeobecnosti lepšie separačné účinky pre bázičné zložky. Je to spôsobené tým, že sú vysoko čistené a obsahujú menej kyslých sol-gel častíc [92].

Silikagély typu C s hydrozilovaným povrchom pokrytým nepolárnymi Si-H skupinami namiesto silanolových skupín, majú až 95 % pôvodných silanolových skupín odstránených. Tým je povrch silikagélu typu C menej polárny v porovnaní s typmi A a B [98].

Diolové, amino a amidové viazané skupiny využívané v HILIC sa podobne ako viazané fázy využívané v RP-HPLC pripravujú chemickou modifikáciou silikagelového povrchu [84,99].

Chemicky viazané diolové skupiny poskytujú vysokú polaritu vďaka schopnosti viazať vodík, no zároveň neobsahujú okrem reziduálnych silanolových skupín iné ionizovateľné skupiny, čo ich robí vhodnými aj pre HILIC separácie. Amino skupiny viazané na silikagelový povrch sa často využívajú na HILIC separácie. Zatiaľ čo bázičné

analyty sú vo všeobecnosti veľmi dobre zadržiavané na povrchu silikagélu tvorbou vodíkových väzieb a ióno-výmennými reakciami so silanolovými skupinami, kyslé analyty majú vyššiu afinitu k silikagélovým SF s viazanými amino skupinami, čo však môže niekedy spôsobovať ich ireverzibilnú absorpciu [84].

Chemicky viazané fázy s inými vlastnosťami ako sú napr. polyetylénglykol alebo alkyly s naviazaným amidom alebo karbamátovými skupinami sa všeobecne spájajú s RP-HPLC aplikáciami s MF bohatými na vodnú zložku. Na druhej strane, keď je obsah organického rozpúšťadla vysoký, retencia mnohých zložiek sa zvyšuje so zvyšujúcou sa koncentráciou ACN, čo je typické práve pre NP-HPLC [83,99,100,]. SF so silikagélom modifikovaným cyklodextrínom sa využívajú na chirálne separácie v móde HILIC [101].

HILIC separácie využívajú aj zwitteriónové sulfoalkylbetaínové SF. Aktívna vrstva, ktorá sa nachádza vo vnútri pórov silikagélu prípadne polymérneho podkladu, obsahuje silne kyslé skupiny sulfónových kyselín aj silne bázické kvartérne amóniové skupiny oddelené krátkym alkylom. V tomto prípade sa očakávajú iónovymenné interakcie zwitteriónových SF. Viazané sulfoalkylbetaínové skupiny na seba pomocou vodíkových väzieb silne absorbujú vodu, čím dochádza k tvorbe vodnej vrstvy, ktorá sa stáva súčasťou SF a silne vplýva na retenčný mechanizmus [88].

Už dlhú dobu je známa aj možnosť separácie neutrálnych látok na iónomeničoch za podmienok HILIC separácie. Kationová aj aniónová iónovymena pomocou styréndivinylnbenzénových náplní umožňuje retenciu len niektorých polárnych zložiek, ich retencia sa zvyšuje so zvyšujúcim sa podielom etanolu v MF a pre ostatné látky platí opačný účinok [102,103,104]. V dôsledku prítomnosti iónovymenných skupín, je retencia ovplyvňovaná zmiešaným módom HILIC/iónovymena, čo môže mať vplyv na špecifickú selektivitu. Zmiešaný mechanizmus aniónovej/ kationovej výmeny/ HILIC, ktorý sa vyskytuje na slabých iónomeničoch s malými pórmi na báze silikagélu je vhodný na analýzu a purifikáciu zložiek prírodného pôvodu [97].

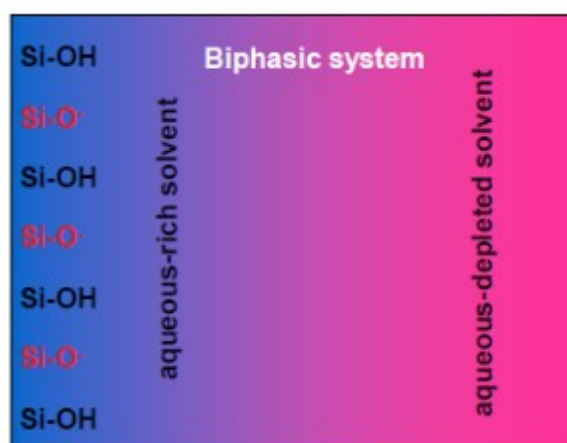
4.6.3 Výber mobilnej fázy

Typická MF pre HILIC pozostáva z vodou miešateľného polárneho organického rozpúšťadla ako je napr. ACN a malého množstva vody [83]. Namiesto ACN sa môže využiť aj iné aprotické rozpúšťadlo, ktoré je miešateľné s vodou, napr. tetrahydrofurán či dioxan. Použité môžu byť taktiež alkoholy, avšak na to, aby sa dosiahol rovnaký stupeň retencie ako pri kombinácii aprotického rozpúšťadla s vodou, sú potrebné ich vyššie koncentrácie [89].

Na výber správneho organického modifikátoru MF je vhodné použiť eluotropický rád. Eluotropický rád je poradie rozpúšťadiel so stúpajúcou elučnou silou:

**acetón < izopropanol ~ propanol < ACN < etanol < dioxán < dimetylformamid ~
metanol < voda [90]**

HILIC separácie sa vykonávajú rovnako izokratickou elúciou s vysokým obsahom organického rozpúšťadla ako aj gradientovou elúciou, ktorá začína vysokým obsahom organického rozpúšťadla a končí s vysokým podielom vodnej zložky [16]. Všeobecne sa predpokladá, že pri HILIC separáciách dochádza na povrchu polárnej SF k tvorbe ďalšej vrstvy bohatej na vodu, čo spôsobuje, že MF je tak ochudobnená o vodnú zložku (obrázok 17). Takýto systém pripomína mechanizmus extrakcie kvapalina-kvapalina (LLE, liquid-liquid extraction) a analyt sa distribuuje medzi tieto dve rozdielne vrstvy [83,105]



Obrázok 17 Adsorpcia vody na povrch polárnej stacionárnej fázy a vznik mobilnej fázy ochudobnenej o vodnú zložku [106]

Vzorky, ktoré sú dávkované, by sa mali nachádzať v prostredí používanej MF alebo rozpúšťadla s nižšou elučnou silou, čím sa predíde strate účinnosti. Alternatívou pre vzorky, ktoré sú v prostredí s vysokým obsahom organického rozpúšťadla len málo rozpustné, je ich používanie v čo najmenších objemoch tak, aby bol vplyv vodného rozpúšťadla čo najmenší [107].

4.6.4 Aditíva mobilnej fázy

Iónové aditíva ako je octan amónny alebo mravčan amónny sa využívajú na kontrolu pH a iónovej sily MF. Pri HILIC separáciách môžu tieto látky ovplyvňovať polaritu analytu a vplývať tak na retenciu. Pre ionizované analyty musí byť pH nastavené tak, aby zaistilo prítomnosť len jednej ionizovanej formy. Pokiaľ retenciu ovplyvňuje iónovýmena, zvýšením koncentrácie pufru sa znižuje retencia. Opačný prípad môže nastať ak zvýšením koncentrácie pufru dochádza ku ovplyvneniu solvácie a zároveň neprebíha iónovýmena. Ak nie sú splnené tieto podmienky, dochádza k tvorbe asymetrických pík, chvostovaniu a zlej opakovateľnosti. Na separáciu neutrálnych

analytov nie je prítomnosť pufru potrebná. Použitie iných solí, ktoré sú rozpustné v prostredí s vysokým obsahom organického rozpúšťadla môže byť pre potrebu zvýšenia polarít MF a za účelom dosiahnutia elúcie, avšak tieto soli nie sú prchavé a neumožňujú spojenie s MS detekciou [83,108].

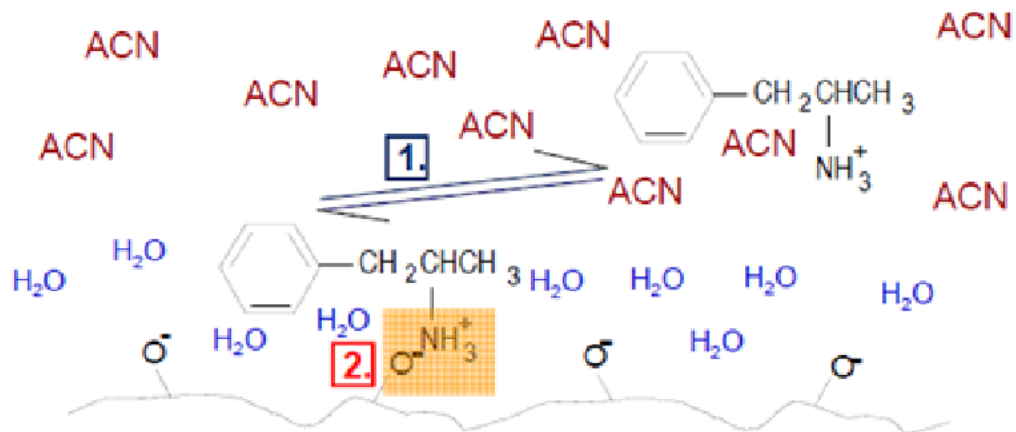
Hodnoty pH MF sa po prídavku kyseliny mravčej a octovej v roztokoch s vyšším obsahom organických látok zvyšujú, pretože ich disociácia je potlačená. Výsledkom je, že iónová sila roztokov je potlačená, čo sa môže prejaviť pri analýze ionizovaných zložiek nevhodným tvarom pík a problémami s preťažením kolóny [92]. V takýchto prípadoch sa preferuje voľba octanu amónneho alebo mravčanu amónneho, ktoré sú rozpustné aj pri vyšších koncentráciách ACN, udržiavajú vhodnú iónovú silu MF a sú kompatibilné aj s MS detekciou. Pre zlepšenie retencie analytov, ktoré sú zadržované len slabšie sa časť vodnej zložky môže nahradiť alkoholmi ako napr. metanol, ktorý je slabším elučným činidlom [107].

4.6.5 Separačný mechanizmus

Rôzne vedecké skupiny sa ešte stále nezhodujú v jednoznačnom retenčnom mechanizme, teórii ktorá ho popisuje a možnosti jej predikcie [109,110].

Existujú tri možné spôsoby modelácie separačného mechanizmu HILIC. Prvým je rozdeľovanie analytu medzi SF a MF [68,69], druhým je adsorpcia analytu na povrch adsorbentu [111,112], tretí predpokladá prednostnú adsorpciu modifikátora organickej MF na povrch adsorbentu a následné rozdeľovanie analytu v tejto adsorbovanej vrstve [113].

Alpert predpokladá, že mechanizmus separácie je závislý na tvorbe stagnantnej vodnej vrstvy, ktorá je imobilizovaná na povrchu SF [83]. K adsorpcii vody dochádza prednostne na polárnych centrách SF, čím vzniká difúzna vrstva s klesajúcim gradientom koncentrácie vody smerom do MF. Následne dochádza k rozdielnej distribúcii molekúl analytov medzi MF bohatú na ACN a vodnú vrstvu adsorbovanú na povrchu hydrofilnej SF (obrázok 18) [83,89].

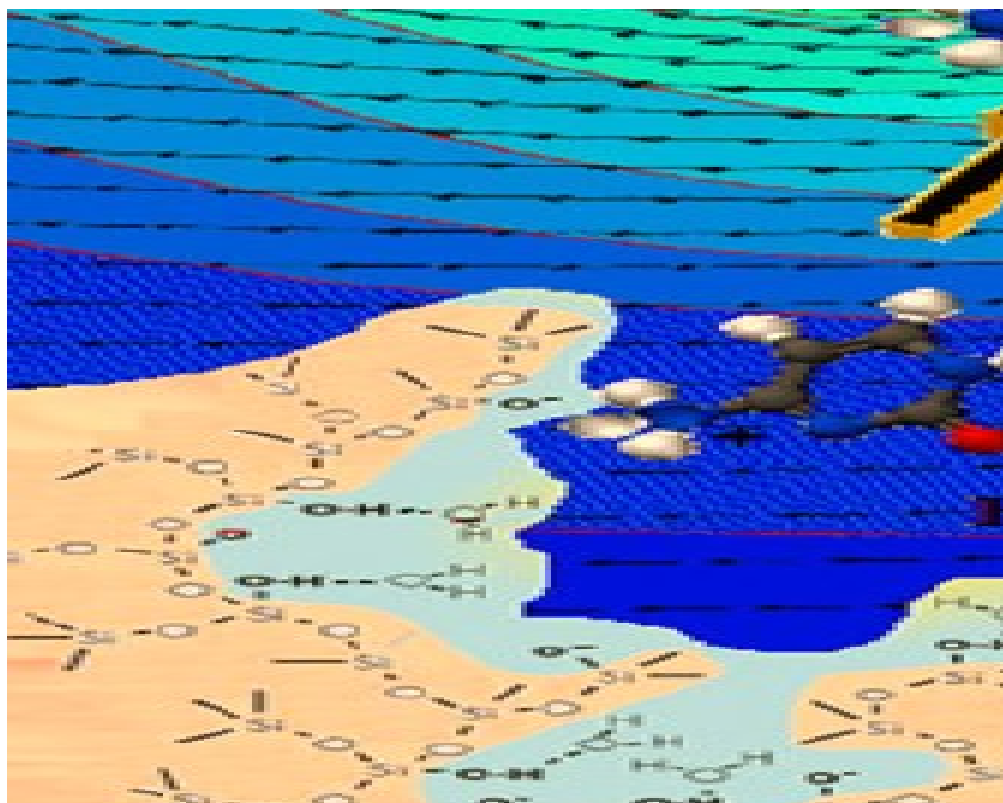


1. Rozdeľovanie v adsorbovanej vodnej vrstve
2. Iónová výmena so silanolmi

Obrázok 18 Schéma separačného mechanizmu HILIC [120]

Na rozdiel od separácie na NP-HPLC, kde adsorpcia zložiek prebieha priamo na SF, pri HILIC separácii zložky adsorbujú na hydrofilnú vrstvu vody imobilizovanú na povrchu SF [114].

Retenčný fenomén v HPLC závisí naraz od niekoľkých typov intermolekulárnych reakcií. Jednak medzi rozpustenými zložkami a SF, medzi rozpustenými zložkami a MF, a medzi SF a MF navzájom [90].



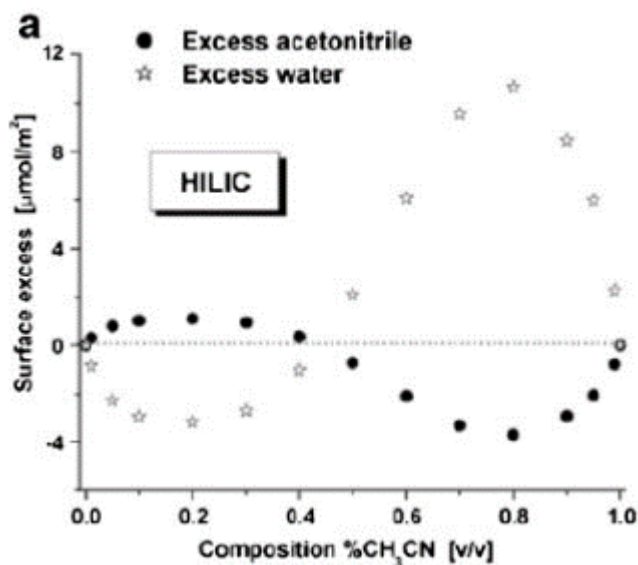
Obrázok 19 Schéma separačného mechanizmu a tvorba imobilizovanej vodnej vrstvy s gradientom [90]

Predpokladá sa, že mechanizmus separácie je komplexný, pretože, interakcie sú sprostredkované pomocou reakcií dipól-dopól a vodíkovými väzbami [83].

Čím je analyt hydrofilnejší, tým viac je rozdeľovacia rovnováha posunutá v prospech imobilizovanej vodnej vrstvy na povrchu SF a preto je analyt systémom viac zadržávaný. Inými slovami, separácia prebieha na základe polarita analytov a ich stavu solvatácie. V dôsledku prednostnej solvatácie povrchu SF je veľmi pravdepodobné, že sa vytvára koncentračný gradient rozpúšťadla v smere od povrchu SF do prostredia s MF (obrázok 19) [115,116,117,118,119].

Zvýšením koncentrácie ACN v MF sa zvyšuje sila interakcie vodnej zložky s povrchom polárnej SF. To znamená, že reziduálne silanolové skupiny nemôžu reagovať s ACN, pretože sú na ne adsorbované molekuly vody [118,119].

Obrázok 20 znázorňuje najvyšší prebytok absorpcie ACN na povrch HILIC adsorbentu, ktorý sa nachádzal v MF s obsahom vody 80 %. To zároveň súhlasí s predošlým tvrdením prednostnej adsorpcie ACN na siloxanové mostíky. Naopak, najmenšia adsorpcia ACN na povrch SF sa nachádza v MF s obsahom vodnej zložky 20 %, čo spôsobuje prednostnú adsorpciu vody na voľne prístupné silanolové skupiny ($\equiv\text{Si-OH}$) a bráni tak ich reakcii s ACN [121]. Adsorpcia vody na povrch polárnej SF sa zvyšuje s jej znižujúcim sa obsahom v MF [119].



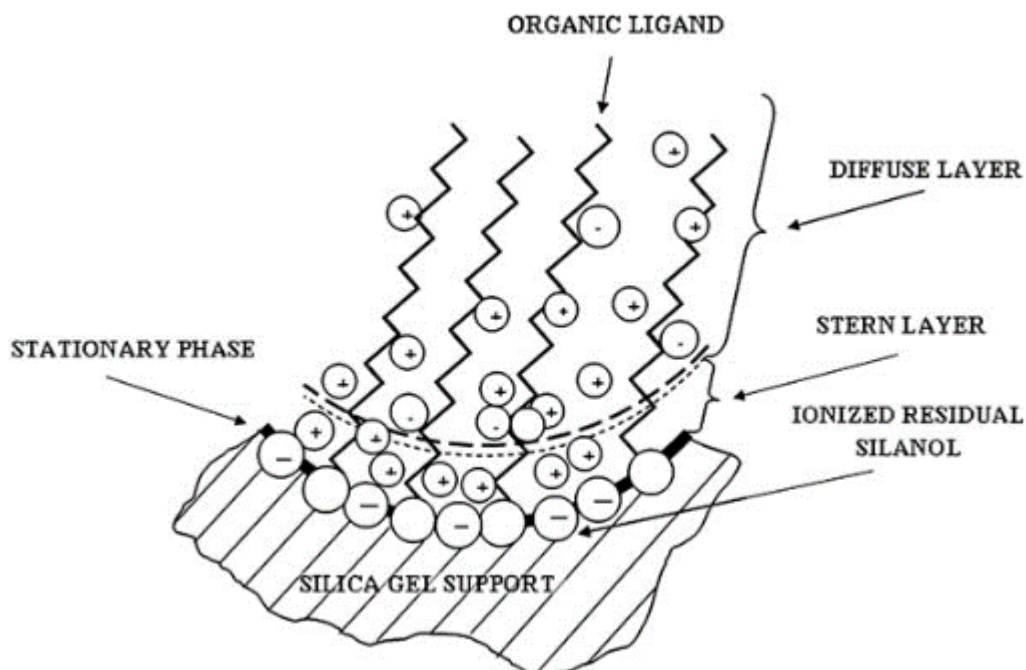
Obrázok 20 Tvorba prebytku MF na povrchu stacionárnej fázy a jeho zloženie; [121]

Ak je koncentrácia vody v MF menej ako 20 %, dochádza k jej adsorpcii na povrch SF a tvorbe multivrstvy, naopak, percentuálny obsah vody v elute sa zníži. Iná štúdia preukázala, že v prítomnosti 75–90 % objemu ACN (10–25 % H₂O) v MF, je 4 až 13 % objemu všetkých pórov silikagélovej SF je vyplnených vodnou vrstvou [119]. Adsorpcia rozpúšťadla riadená týmito špecifickými interakciami môže mať veľký vplyv na selektivitu separácie HILIC systémov [117].

Napriek tomu, že schopnosť hydrofilných SF zadržiavať vodu na svojom povrchu pri kontakte so zmesou organických rozpúšťadiel a vody je známa, teória HILIC rozdeľovania je založená len na nepriamych dôkazoch. Mechanizmus HILIC predstavuje viac ako len jednoduché rozdeľovanie. Zahŕňa donorové interakcie vodíka medzi neutrálnymi a polárnymi látkami a tiež slabý elektrostatický mechanizmus za podmienok s vysokým obsahom organického rozpúšťadla potrebného na retenciu. To znamená, že mechanizmus HILIC je odlišný od iónovymennej chromatografie. Preto niektoré štúdie smerujú k úvahe nad multimodálnym mechanizmom separácie HILIC [83,89]. Alpert predpokladá, že k rozdeľovaniu do imobilizovanej vstvy prispievajú dipól-dipól interakcie a vodíkové väzby. Hovorí aj o tom, že nabité bázické skupiny v roztoku vedú k zvýšenej hydrofilite a retencii, čo znamená, že aj týmto prispievajú k mechanizmu separácie [16]. Podobne aj Yoshida hovorí, že k retencii na HILIC fázach dochádza v dôsledku tvorby vodíkových väzieb a dipól-dipól interakcií [95].

Keďže elučné znaky HILIC sú podobné s NP-HPLC, predpokladalo sa, že aj mechanizmus separácie musí byť podobný. Tvorba vodíkových väzieb hlavne v MF s malým obsahom vodnej zložky, pravdepodobne tiež prispieva k retenčnému mechanizmu HILIC [122].

Na druhej strane, elektrostatické interakcie môžu hrať tiež dôležitú úlohu v HILIC, v dôsledku prítomnosti ionizovaných skupín, ktoré sa zámerne stali súčasťou SF alebo ako nezámerne vzniknuté náboje napríklad na reziduálnych disociovaných silanolových skupinách [108]. Tieto reziduálne silanolové skupiny na povrchu silikagélu sú čiastočne ionizované a nemôžu byť odstránené alebo blokované v dôsledku sterickeho pôsobenia naviazaných ligandov. Reziduálne silanoly môžu ovplyvniť separáciu polárnych analytov, predovšetkým bázických zložiek alebo biopolymérov, z dôvodu silných polárnych interakcií medzi bázickými skupinami a ionizovanými reziduálnymi silanolmi. Molekuly vody adsorbované na povrchu silikagelových SF potláčajú ionizáciu povrchových silanolov, čo vedie k tvorbe negatívneho náboja na povrchu silikagélu. Táto vrstva s negatívnym nábojom na povrchu silikagélu vytvára v kontakte s MF negatívne elektrické pole. Pozitívne náboje z MF priťahované týmto poľom vytvárajú druhú vrstvu elektrickej dvojvrstvy (obrázok 21) [123].



Obrázok 21 Model elektrickej dvojvrstvy na povrchu stacionárnej fázy s naviazaným ligandom [90]

Očakáva sa, že interakcie zásaditých aj kyslých analytov so SF sú založené na hydrofilných interakciách a elektrostatických silách. Avšak, záverečným mechanizmom separácie pri elučnom procese je pravdepodobne kombinácia rozdeľovania, elektrostatických interakcií a tvorby vodíkových väzieb so SF [83,89].

Rozsah v ktorom každý z menovaných mechanizmov prevláda závisí od typu použitej SF, voľby pufovacieho systému (typ soli, koncentrácia, pH), množstva a typu organického rozpúšťadla [100].

Typické pre HILIC je, že so zvyšovaním vodnej zložky v MF sa znižuje retencia, preto sa využívajú MF s vysokým obsahom polárneho organického rozpúšťadla. Zvyšovaním prídavku organického rozpúšťadla v čiastočne vodnej MF, vo všeobecnosti vedie k zníženiu relatívnej statickej permitivity zmiešanej MF. Čo je vlastne prípad ACN ktorý sa v HILIC často využíva. Nízka relatívna statická permitivita je sprevádzaná poklesom iónovej stabilizácie, čo sa prejaví zvýšením hodnôt pKa solutov (rozpúšťaných zložiek) [108,124]. Pri objeme ACN 60 % sa začnú vytvárať silné odchýlky v dôsledku homo- a heterokonjugácií, čo je spôsobené tým, že množstvo vody potrebné pre tvorbu vodíkových väzieb s tlmivými zložkami a rozpustenými látkami klesá [108].

Prítomnosť pufovacích solí v MF pôsobí na elektrostatické interakcie rušivo, čím môže dôjsť k minimalizovaniu ich pôsobenia [108,125]. Tento istý mechanizmus rušenia elektrostatických síl môžeme využiť na zníženie retencie analytov a zlepšenie ich elúcie [83]. Avšak, v niektorých prípadoch, vyššia koncentrácia solí môže viesť k presunu viac solvatovaných iónov soli do adsorbovanej vrstvy na povrchu SF, čím sa ešte viac zvýši množstvo vody v tejto vrstve, a preto sa zvýši aj retencia [108,125,126]. Dôsledkom toho

je hydratácia a teda k hrubnutiu vodnej vrstvy na povrchu SF [91]. Ďalšou hypotézou je, že elektrostatický odpor medzi SF a analytmi je pri použití MF s vyššou koncentráciou solí oslabený [93].

Ďalší faktor, ktorý ovplyvňuje retenčnú charakteristiku metódy HILIC je pH pufru. To, či je hodnota pH nad alebo pod hodnotou pKa analytu, určuje jeho výsledný náboj a vplyv na jeho hydrofilitu a teda aj interakcie so SF [89,105].

Vplyv teploty kolóny na separáciu HILIC je skôr menší než v porovnaní s RP-HPLC, ale závisí to aj od povahy zadržovaných molekúl [127]. V RP-HPLC sa retencia so stúpajúcou teplotou znižuje, pričom je čiastočne ovplyvnená aj entalpiou. V HILIC je retencia ovplyvnená pravdepodobne entropiou, ktorá vplýva na rozdielnu solváciu zložiek vzorky v SF a MF [128].

5. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Chemikálie

Acetonitril pre HPLC, 99,9%, Sigma-Aldrich, Francúzsko
Deionizovaná voda, Milliq
Hydrogén fosforečnan sodný, 99,9%, Sigma-Aldrich, UK
Kyselina citrónová, 99,9%, Sigma-Aldrich, Nemecko
Kyselina mravčia, 98%, Lach-Ner, Česká republika
Kyselina octová, 99,8%, LACHEMA, Česká republika
Metanol pre HPLC, 99,9%, Sigma-Aldrich, Francúzsko
Mravčan amónny, 99%, Sigma-Aldrich, India
Octan amónny, 98%, Sigma-Aldrich, Japonsko
Rebaudiozid A, pre HPLC, 96%, Sigma-Aldrich, Nemecko
Steviozid, Sigma-Aldrich, Nemecko

5.2 Prístroje

HPLC systém Shimadzu, Japonsko

- Autosampler SIL-20A HT
- Komunikačný modul CBM-20A
- Odplyňovač GT-154
- Počítačový software CLARITY
- Spektrofotometrický detektor SPD-20A
- Termostatovaný kolonový priestor CTO-10AC VP
- Vysokotlakové čerpadlo LC-20AD

Analytické váhy, Sartorius, Nemecko

Kolóna Ascentis Express RP-Amide, 100×3 mm; 2,7 µm, Supelco, USA

Kolóna Kinetex 2,6u HILIC 100A, 100×2,1 mm; 2,6 µm, Phenomenex

Spektrofotometer, Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer, USA

Ultrazvukový kúpeľ Sonorex, BANDELIN, Nemecko

Vákuové čerpadlo, Vacc-space, Chromservis, Česká republika

WTW 720 pH meter inoLab 720, Gemini, Holandsko

5.3 Pomôcky

Bežné laboratórne sklo

Filtračný papier

Mikropipety 10–100 µl, 100–1000 µl, 1–5 ml LABMATE+, HTL Lab Solutions, Poľsko

Nylónový membránový filter, póry 0,22 µm, Membrane solutions. USA

SPE kolónky Discovery DSC-18Lt, 3 ml, 100 mg, Supelco, USA

Striekačkový filter

Trecia miska s tlčíkom

5.4 Vzorky

Stevia, sladidlo so steviolglykozidmi, VALOSUN a.s., Brno

SlaDIA, Sukralóza + Stevia, SWISS Pharmaceutical Investment, Praha

Stevia, tekuté sladidlo, SOLIA, spol. s.r.o., Praha

Sušené listy stévie, SOLIA, spol. s.r.o., Paraha, www.cajovydum.cz, Paraguay

5.5 Príprava roztokov

5.5.1 Zásobné štandardné roztoky

Zásobný štandardný roztok stéviozidu 20 mg/ml

Zásobný štandardný roztok sme si pripravili na koncentráciu 20 mg/ml do odmerných baniek s objemom 25 ml (500 mg ST). Presná navážka ST bola 0,4997 g. Navážka sa kvantitatívne preniesla do odmernej banky, rozpustila a doplnila deionizovanou vodou po rysku.

Zásobný štandardný roztok rebaudiozidu A 20 mg/ml

Zásobný štandardný roztok sme pripravili na koncentráciu 20 mg/ml do odmerných baniek s objemom 25 ml (500 mg RebA). Presná navážka RebA bola 0,5009 g. Navážka sa kvantitatívne preniesla do odmernej banky, rozpustila a doplnila sa deionizovanou vodou po rysku.

Pre potreby určenia retenčných časov ST a RebA, sa zo zásobných štandardných roztokov ST a RebA pripravili zriedené, pracovné štandardné roztoky priamo do vialiek pre autosampler.

5.5.2 Pracovné štandardné roztoky

Pracovný štandardný roztok stéviozidu 2 mg/ml

Pripravený z jeho zásobného štandardného roztoku (20 mg/ml) do vialky. Pipetovanie: 100 µl štandardu + 900 µl MF (ACN:H₂O 80:20).

Pracovný štandardný roztok rebaudiozidu A 2 mg/ml

Pripravený z jeho zásobného štandardného roztoku (20 mg/ml) do vialky.
Pipetovanie: 100 µl štandardu + 900 µl MF (ACN:H₂O 80:20).

Kombinovaný pracovný štandardný roztok ST a RebA 2 mg/ml

Pripravené z ich zásobných štandardných roztokov (20 mg/ml) do vialky.
Pipetovanie: 100 µl ST zásobného štandardu + 100 µl RebA zásobného štandardu + 800 µl MF (ACN:H₂O 80:20).

Pracovný štandardný roztok stéviozidu 0,2 mg/ml

Pripravený z jeho zásobného štandardného roztoku (20 mg/ml) do vialky.
Pipetovanie: 10 µl ST zásobného štandardu + 990 µl MF (ACN:H₂O 80:20).

Pracovný štandardný roztok RebA 0,2 mg/ml

Pripravené z jeho zásobného štandardného roztoku (20 mg/ml) do vialky.
Pipetovanie: 10 µl RebA zásobného štandardu + 990 µl MF (ACN:H₂O 80:20).

Kombinovaný pracovný štandardný roztok ST a RebA 0,2 mg/ml

Pripravený z ich zásobných roztokov (20 mg/ml) do vialky. Pipetovanie: 10 µl ST zásobného štandardu + 10 µl RebA zásobného štandardu + 980 µl MF (ACN:H₂O 80:20).

5.5.3 Mobilné fázy – príprava

Všetky štandardné roztoky sa mimo doby analýzy uchovávali v chladničke pri teplote 4 °C. Aby sa predišlo odparovaniu rozpúšťadiel, uzávery vialiek a odmerných baniek boli obalené parafínovou páskou.

Pri vytváraní novej metódy sme vyskúšali niekoľko typov MF v závislosti od toho, či sme pracovali v móde RP alebo HILIC. Ich zloženie sa podľa potreby plynule menilo tak, aby sa našla tá najvhodnejšia kombinácia rozpúšťadiel alebo rozpúšťadiel s obsahom pufrov.

MF, ktoré pozostávali len z kombinácie samotných rozpúšťadiel sa pripravovali naplnením ich zásobných fliaš a odplynením v ultrazvukovom kúpeli po dobu 45 minút. Takýmto spôsobom sa pripravovali zásobné fľaše s deionizovanou vodou, MeOH a ACN.

Pufrované MF sme pripravovali dvoma spôsobmi. Prvý spôsob pozostával najprv z prípravy pufru o požadovanej iónovej koncentrácii a pH a jeho následné zmiešanie s iným rozpúšťadlom (metanol, ACN) v požadovanom pomere (pufr : rozpúšťadlo). Takto pripravená pufrovaná MF sa prefiltrovala cez nylónový membránový filter s veľkosťou pórov 0,22 µm pomocou podtlaku vytvoreného vákuovým čerpadlom. Prefiltrovaný pufr zbavený prípadných zbytkov nerozpustených kryštálov a iných

nečistôt sa odplyňoval v ultrazvukovom kúpeli 30 minút. Výhoda prvého spôsobu prípravy pufrovanej MF spočíva v dôkladnejšom premiešaní zložiek (pufor a rozpúšťadlo) na rozdiel od ich zmiešavania v zmiešavači HPLC prístroja.

Druhý spôsob spočíval v samostatnej príprave pufru o požadovanej iónovej koncentrácii a pH. Po nastavení pH pufru pomocou pH metra sa pufor prefiltraval cez nylónový membránový filter s veľkosťou pórov 0,22 μm pomocou podtlaku. Prefiltrovaný pufor sa odplyňoval v ultrazvukovom kúpeli 30 minút. Výhodou takéhoto spôsobu prípravy je jeho menšia pracnosť. Vzniknutý pufor sa totiž môže miešať v rôznych pomeroch s iným používaným rozpúšťadlom, tiež odplyneným, priamo v zmiešavači HPLC prístroja. Takýto spôsob prípravy MF je vhodný vtedy, keď ešte nepoznáme jej definitívne optimálne zloženie a neustále potrebujeme meniť pomery jej zložiek.

5.6 Vzorky sladidiel a ich predanalytická úprava

5.6.1 Stevia, sladidlo so steviolglykozidmi VALOSUN – vzorka č. 1

Roztok sladidla 1 sme pripravili rozpustným jednej tabletky v 10 ml odmernej banke naplnenej po rysku s 80:20 H₂O:ACN. Vyšší obsah vody bol zvolený z dôvodu tvorby zrazeniny v prostredí s 90% obsahom ACN. Dokonalé rozpustenie tabletky sme dosiahli vložением banky do ultrazvukového kúpeľa. Následne sme zmiešali 0,3 ml roztoku sladidla s 2,7 ml ACN, čím sme dosiahli, že vzorka sa nachádza v prostredí s rovnakým zložením ako MF (90:10 pre ACN:H₂O), takúto zmes sme prefiltrovali cez striekačkový filter priamo do vialky.

5.6.2 SlaDIA, Sukralóza + Stevia, SWISS Pharmaceutical Investment – vzorka č. 2

Roztok sladidla 2 sme pripravili rozpustným jednej tabletky v 10 ml odmernej banke naplnenej po rysku s MF 90:10 ACN:H₂O. Dokonalé rozpustenie tabletky sme dosiahli vložением banky do ultrazvukového kúpeľa. Následne sme roztok vzorky prefiltrovali striekačkovým filtrom priamo do vialky.

5.6.3 Stevia, tekuté sladidlo SOLIA – vzorka č. 3

Roztok tekutého sladidla 3 sme pripravili rozpustným 1 ml kvapalného sladidla v 10 ml odmernej banke naplnenej po rysku s 80:20 H₂O:ACN. V tomto prípade bol zvolený vyšší obsah vody z dôvodu obsahu glycerínu v kvapalnom sladidle, ktorý sa v prostredí s 90% ACN nemiešal a vytváral fázové rozhranie. Následne sme zmiešali

0,3 ml roztoku sladidla s 2,7 ml ACN a takúto zmes prefiltrovali cez striekačkový filter priamo do vialky.

5.6.4 Extrakt z listov sušenej stévie – vzorka č. 4

Postup extrakcie SVgly zo vzorky sušených listov *Stevia rebaudiana* Bertoni sme prevzali z publikovanej práce od Ursuly Woelwer-Rieck [38]. Metóda je založená na extrakcii prášku z listov pomocou horúcej vody a následnom prečistení získaného extraktu pomocou SPE.

Listy stévie sa v trecej miske s tľčikom rozdrvili na prášok. Navážka 1,02 g prášku z listov stévie sa zmiešala v kadičke s 20 ml deionizovanej vody. Spolu s magnetickým miešadlom sa obsah 30 minút varil na platničke. Z dôvodu príliš veľkých strát vody odparovaním, sa počas varenia niekoľko krát dolievali malé množstvá vody. Výsledná zmes sa nakoniec prefiltrovala cez filtračný papier pod zníženým tlakom tak, aby sme z tuhého materiálu získali čo najviac vodného extraktu.

V ďalšom kroku sa previedla SPE extrakcia prefiltrovaného roztoku za účelom odstránenia balastných látok a lepšieho zakoncentrovania SVgly. SPE kolónky DSC-18Lt 3 ml, sa umiestnili do stojanu pre SPE a ten sa následne vložil do sklenenej nádoby pre SPE s manometrom pre meranie vákua. Nádoba sa uzatvorila vekom s regulovateľnými ventilmi. Po zapnutí zdroja vákua sa vykonali jednotlivé kroky:

1. kondicionácia kolónky
 - 3 ml MeOH
 - 3 ml voda
2. nanosenie vzorky 1 ml
3. elúcia balastných látok
 - 3 ml vody
 - 5 ml ACN:H₂O (2:8)
 - 3 minúty sušenie prúdiacim vzduchom
4. elúcia analytov
 - 2 ml ACN.H₂O (8:2)

Roztok s analytmi sa pri elúcii zachytával do vialiek. Zo zachyteného roztoku sa pripravili dva typy vzoriek, a to 1. s pôvodnou koncentráciou extrahovaných SVgly a 2. ktorá bol zriedená 10x deionizovanou vodou.

5.7 Optimalizácia podmienok separácie stéviových glykozidov – RP-HPLC

Pôvodným zámerom našej práce, bolo vytvoriť metódu HPLC separácie SVgly s využitím chromatografickej kolóny s RP, konkrétne s kolónou Ascentis Express RP-Amide, 100×3 mm; 2,7 μm, Supelco s povrchovo poréznymi časticami. Pri tomto zapojení sa skúšali MF s rôznymi pomermi ACN s vodou, MeOH s vodou a kombináciu hydrogénfosforečnanového pufru s kyselinou citrónovou s MeOH, s rôznou iónovou silou a hodnotami pH pufru. Elučné poradie SVgly sa zachováva aj pri zmenách MF, prvý eluuje ST a druhý RebA.

Pri používaní MF pozostávajúcich z ACN a H₂O a MeOH a H₂O v rôznych pomeroch sme nedosiahli vhodné podmienky na to, aby bol ST a RebA oddelený. Ku oddeleniu SVgly dochádzalo až použitím MF s obsahom pufru hydrogénfosforečnanu sodného s kyselinou citrónovou a MeOH. Avšak parametre píkav SVgly po rozdelení neboli vyhovujúce a preto sa neskôr pristúpilo k zmene typu kolóny.

Prvý typ MF ktorý sme testovali pozostával z ACN a vody v rôznych pomeroch (tabuľka 4). Vo všeobecnosti platilo, že so znižovaním obsahu ACN sa retenčné časy predlžovali. Na analýzu sme využívali pracovné štandardy ST a RebA. Rozdiely v ich retenčných časoch boli len minimálne, čo neumožňovalo ani ich čiastočné rozdelenie. Pri pomere MF 20:80 ACN:H₂O (S04) sa retenčné časy neúmerne predĺžili a ani po 25 minútach nenastala elúcia ST.

Tabuľka 4 Použité mobilné fázy s obsahom ACN a H₂O

séria	pomer ACN/H ₂ O	t _r ST	t _r RebA
S01	80/20	0,85	0,82
S02	60/40	0,82	0,84
S03	40/60	0,9	0,86
S04	20/80	–	–
S05	35/65	1,06	0,98
S06	30/70	1,85	1,75

Kombinácia MF z vody a ACN nepostačovala na rozdelenie SVgly, preto sme v ďalších analýzach pokračovali s kombináciou vody a MeOH (tabuľka 5).

Pri pomere 30:70 MeOH:H₂O glykozidy neeluovali ani po 20 minútach, elúcia nastala až po zmene zloženia MF na 60:40 MeOH:H₂O. Znova platí, že so znižujúcim sa podielom MeOH sa retenčné časy predlžujú. Ani s predlžujúcim sa retenčným časom nedochádza ku väčším rozdielom v retenčných časoch ST a RebA, čo znamená že ani tento typ MF nepostačuje na ich rozdelenie zo zmesi.

Tabuľka 5 Použité mobilné fázy s obsahom MeOH a H₂O

séria	Pomer MeOH/H ₂ O	t _r ST	t _r RebA
S07	30/70	–	–
S08	60/40	3,45	3,43
S09	55/45	5,98	6,03
S10	50/50	11,31	11,69

Ďalšou možnosťou, ako ovplyvniť retenciu SVgly je použitie pufru. Na základe dostupných chemikálií sme sa rozhodli pre použitie hydrogénfosforečnanového pufru s kyselinou citrónovou. Pufor sme pripravovali rozpustením hydrogénfosforečnanu sodného v deionizovanej vode a následným okyslením kyselinou citrónovou na požadovanú hodnotu pH. Vyskúšali sme niekoľko kombinácií rôznych koncentrácií roztoku hydrogénfosforečnanu sodného vo vode, niekoľko koncentrácií kyseliny citrónovej a ich zmesi s rôznymi hodnotami pH (tabuľka 6).

Na základe výsledkov meraní S09 sme v S11 vyskúšali pomer MeOH:pufor 45:55 a v S12 pomer 55:45. Prítomnosť pufru výrazne zmenila retenciu SVgly, ktoré ani po jednej hodine neeluovali. Túto skutočnosť neovplyvnila ani zmena hodnoty z pH=3 (S11) na pH=6 (S12).

Následne sme zvolili postup prípravy MF s postupne stúpajúcou koncentráciou pufru z hodnôt 0,002 M pre Na₂HPO₄ a 0,001 M pre kys. citrónovú až na 0,1 M pre Na₂HPO₄ a 0,05 M pre kys. citrónovú (tabuľka 6, 7, 8, 9). V každej koncentračnej rade sme odskúšali aj rôzne hodnoty pH puforov.

Používané MF sa pripravovali formou zásobných roztokov pufov a zásobných roztokov MeOH. K ich zmiešavaniu dochádzalo až v zmiešavači HPLC, práve preto bolo potrebné ešte pred ich použitím overiť, či pri zmiešaní nedochádza k tvorbe zrazeniny, ktorá by spôsobila upchatie kolóny a jej znehodnotenie. Problematické boli predovšetkým mobilné fázy, ktoré obsahovali koncentrovanejší pufor.

Pri koncentráciách pufru 0,002 M/0,001 M a 0,004 M/0,002 M sme neuskutočnili analýzy pri hodnote pH=3, túto hodnotu pH pri daných koncentráciách Na₂HPO₄ a kys. citrónovej nebolo možné dosiahnuť.

Ako vidieť aj podľa retenčných časov v tabuľke 6, k deleniu SVgly dochádzalo až pri použití pufru s koncentraciami 0,1/0,05 M (od S35). Charakteristikou použitia MF s koncentrovanejším pufrom, bol zvýšený šum základnej línie. Následne sme pokračovali s analýzami s inou hodnotou pH. Najlepšie sa javili analýzy prevádzané pri hodnote pH 3 (od S42). Čo už tabuľka nezobrazuje, sú ďalšie zmeny, ktoré sme vykonávali za účelom optimalizácie podmienok delenia s MF 0,1/0,05 M a pH=3, predovšetkým voľba prietoku MF, objemu nástreku, teploty kolóny a tiež vlnovej dĺžky detekcie.

Tabuľka 6 Hľadanie optimálneho zloženia mobilnej fázy 1

séria	Na ₂ HPO ₄ /kys. cit. [M]	pH	MF MeOH/pufor	t _r ST	t _r RebA	komb. št. ST/RebA	
S11	0,2/0,1 M	3	45/55	–	–	–	–
S12	0,2/0,1 M	6	55/45	–	–	–	–
S13	0,002/0,001	7	80/20	1,29	1,26	–	–
S14	0,002/0,001	7	70/30	1,76	1,69	–	–
S15	0,002/0,001	7	60/40	3,46	3,46	–	–
S16	0,002/0,001	7	50/50	11,39	11,72	–	–
S17	0,002/0,001	5	70/30	1,74	1,71	–	–
S18	0,002/0,001	5	60/40	3,44	3,45	–	–
S19	0,002/0,001	5	50/50	11,27	11,63	–	–
S20	0,004/0,002	5	70/30	1,71	1,69	–	–
S21	0,004/0,002	5	60/40	3,4	3,39	–	–
S22	0,02/0,01	7	80/20	1,25	1,23	–	–
S23	0,02/0,01	7	70/30	1,69	1,68	–	–
S24	0,02/0,01	7	60/40	3,37	3,32	–	–
S25	0,02/0,01	7	50/50	10,97	11,22	–	–
S26	0,02/0,01	5	80/20	1,29	1,27	–	–
S27	0,02/0,01	5	70/30	1,75	1,71	–	–
S28	0,02/0,01	5	60/40	3,58	3,57	–	–
S29	0,02/0,01	5	50/50	11,78	12,16	–	–
S30	0,02/0,01	3	80/20	1,3	1,28	–	–
S31	0,02/0,01	3	70/30	1,75	1,76	–	–
S32	0,02/0,01	3	60/40	3,58	3,55	–	–
S33	0,02/0,01	3	50/50	11,73	12,11	–	–
S34	0,02/0,01	3	45/55	25,75	26,97	25,44	26,82
S35	0,1/0,05	7	60/40	3,4	3,27	–	–
S36	0,1/0,05	7	50/50	10,76	10,93	–	–
S37	0,1/0,05	7	45/55	23,25	24,27	23,29	24,25
S38	0,1/0,05	5	70/30	1,71	1,72	–	–
S39	0,1/0,05	5	60/40	3,40	3,41	–	–
S40	0,1/0,05	5	50/50	–	–	–	–
S41	0,1/0,05	5	55/45	5,89	5,93	–	–
S42	0,1/0,05	3	60/40	3,47	3,38	–	–
S43	0,1/0,05	3	60/40	3,39	–	–	–
S44	0,1/0,05	3	60/40	3,48	–	–	–
S45	0,1/0,05	3	60/40	3,14/3,50	–	–	–
S46	0,1/0,05	3	80/20	1,28	1,29	–	–
S47	0,1/0,05	3	70/30	1,65	–	–	–

Tabuľka 7 Hľadanie optimálneho zloženia mobilnej fázy 2

séria	Na ₂ HPO ₄ / kys. cit. [M]	pH	MF MeOH/pufor	t _r ST	t _r RebA	t _r ST - MeOH	t _r RebA- MeOH	ST/RebA MeOH
S48	0,1/0,05	3	60/40	3,18 3,5	3,19 3,51	2,73 3,43	3,43	2,74/3,41
S49	0,1/0,05	3	60/40	–	–	2,71/3,39	3,4	2,69/3,39
S50	0,1/0,05	2,6	60/40	–	–	2,38/3,38	3,41	3,34/3,38
S51	0,1/0,05	2,6	45/55	–	–	3,66/6,10	6,12	3,67/6,07
S52	0,1/0,05	3	45/55	–	–	4,38/6,17	6,18	4,30/6,14

Tabuľka 8 Hľadanie optimálneho zloženia mobilnej fázy 3

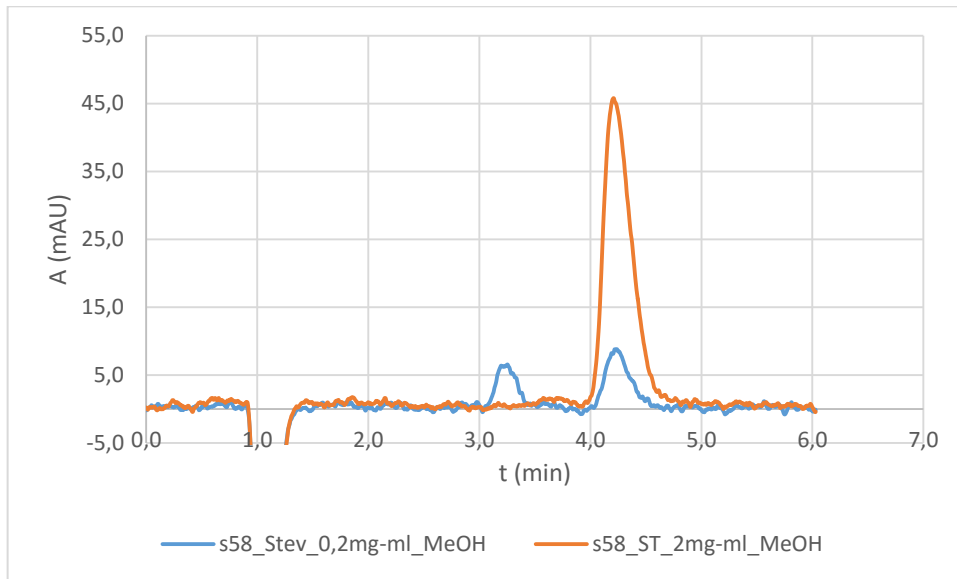
séri a	Na ₂ HPO ₄ / kys. cit. [M]	pH	MF MeOH/pufor	t _r ST - MeOH	ST/RebA MeOH	SL 1	SL2	SL3
S53	0,1/0,05	3	60/40	2,8/3,53	–	2,86/ 3,5	–	2,72/3,5 2
S54	0,1/0,05	3	60/40	2,83/3,5	–	3,54	3,48	3,53
S55	0,1/0,05	3	60/40	2,52/2,8	–	2,81	2,81	2,83
S56	0,1/0,05	3	55/45	3,58/4,5	3,57/4,51	4,57	4,52	4,5
S57	0,1/0,05	3	55/45	3,03/3,8	3,02/3,84	3,86	3,81	3,86

Tabuľka 9 Hľadanie optimálneho zloženia mobilnej fázy 4

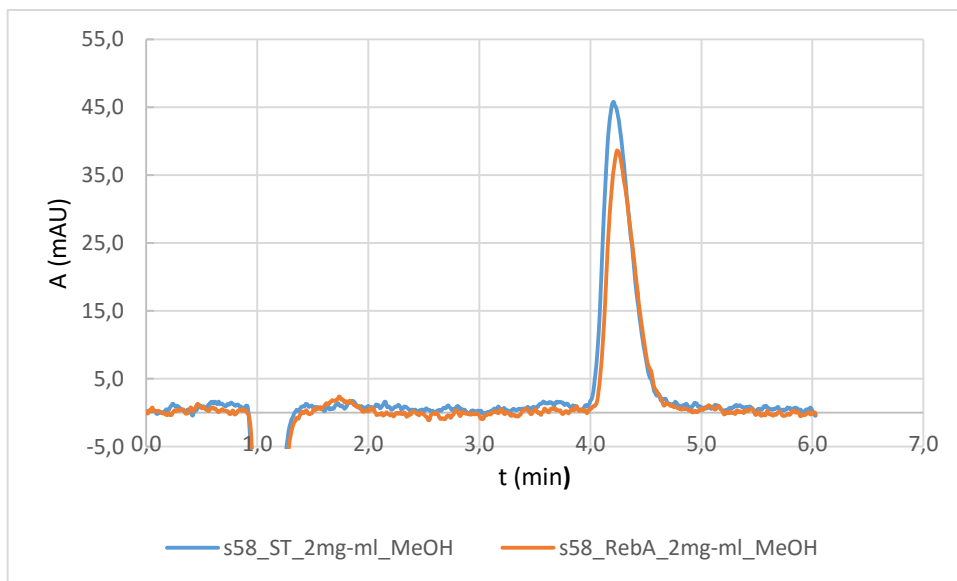
séria	Na ₂ HPO ₄ / kys. cit. [M]	pH	MF	ST	ST/RebA	ST 2 mg	RebA 2 mg	SL1/SL2/SL3	VZ
S58	0,1/0,05	3	58/42	3,25/4,24	3,21/4,22	4,2	4,2	4,2	4,2

V S58 (tabuľka 9) sme pripravovali nové zásobné štandardné roztoky s koncentráciou 20 mg/ml a z nich pracovné štandardy 2 mg/ml. Práve v tejto sérii sme si prvýkrát všimli, že v novom pracovnom štandarde ST 2 mg/ml sa už neobjavujú dva píky (retenčné časy 3,25 a 4,24), ale len jeden (retenčný čas 4,2) a to v čase ktorý sme pripisovali RebA. To nás viedlo k predpokladu, že pôvodný zásobný roztok ST obsahoval nečistotu, ktorú sme klamne interpretovali ako ST. V skutočnosti ostal ST a RebA nerozdelený (t_r = 4,2min) (graf 1, 2, 3).

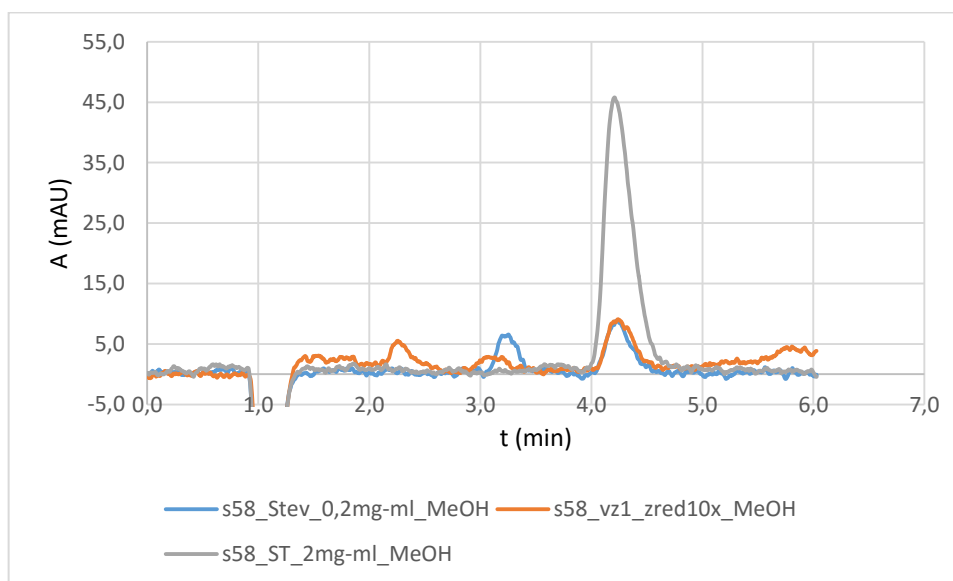
Graf 1 Porovnanie delenia pôvodného pracovného štandardu (modrá) a novo pripraveného koncentrovanejšieho pracovného štandardu (oranžová) bez delenia



Graf 2 Chromatogram nového pracovného štandardu ST a pracovného štandardu RebA bez rozdelenia



Graf 3 Porovnanie delenia a retenčných časov extraktu zo stévie (zelená), pôvodného (modrá) a nového (oranžová) pracovného štandardu stéviozidu

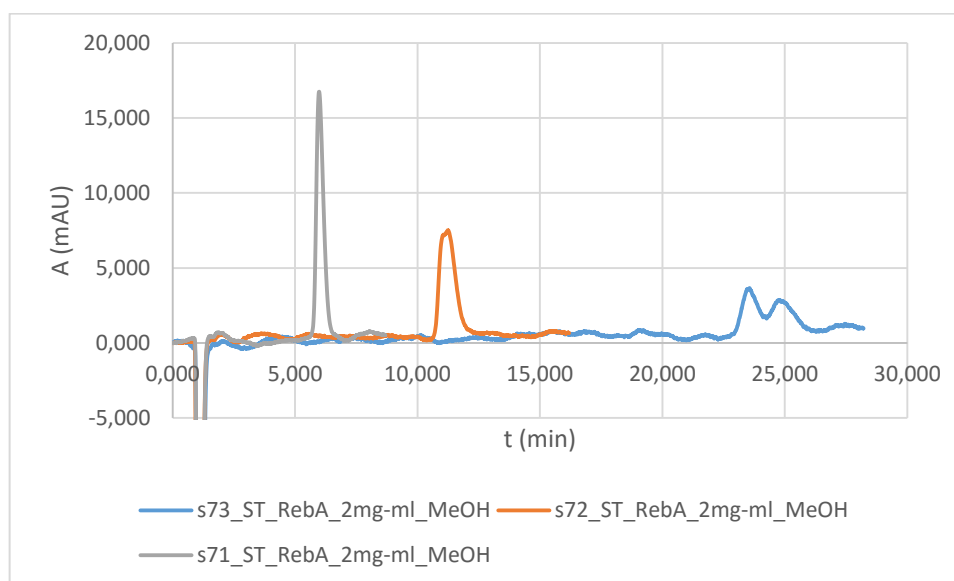


Tabuľka 10 Hľadanie optimálneho zloženia mobilnej fázy 5

séria	koncentrácia Na ₂ HPO ₄ / kys. citrónová	pH	MF	t _r ST - MeOH	ST/RebA MeOH	ST 2 mg	RebA 2 mg	ST/RebA 2 mg
S59	0,1/0,05	3	58/42	2,84/3,31	–	3,31	3,32	–
S60	0,1/0,05	3	56/44	3,22/3,89	3,19/3,9	3,92	3,89	–
S61	0,1/0,05	3	56/44	2,69/3,31	2,69/3,29	3,28	3,28	–
S62	0,1/0,05	3	58/42	2,2/2,58	2,21/2,56	2,6	2,56	–
S63	0,1/0,05	3	60/40	–	2,83/3,58	3,55	3,56	–
S64	0,1/0,05	3	60/40	–	2,81/3,54	3,56	3,55	–
S69	0,1/0,05	3	60/40	–	–	3,5	3,5	3,5
S70	0,1/0,05	3	60/40	–	–	3,48	3,48	3,48
S71	0,1/0,05	3	55/45	–	–	5,97	6,04	5,98
S72	0,1/0,05	3	50/50	–	–	–	11,39	11,24
S73	0,1/0,05	3	45/55	–	–	23,56	–	23,56/24,8

Následne sme previedli ešte niekoľko meraní, za účelom nájdenia podmienok pri ktorých by dochádzalo k deleniu ST a RebA (tabuľka 10). K deleniu SVgly dochádzalo postupne až v sérach S71, S72 a S73. Graf 4 zobrazuje porovnanie vplyvu zloženia MF týchto sérií na delenie.

Graf 4 Vplyv zloženia mobilnej fázy na delenie SVgly v S71, S72 a S73



V S71 (graf 4 sivá) nedochádza ešte k žiadnemu deleniu, v sérii S72 sa pík na svojom vrchole začína rozširovať (graf 4 oranžová), a v sérii S73 môžeme vidieť nedokonalé rozlíšenie SVgly (graf 4 modrá). V sérii S73 je retenčný čas pre ST 23,56 min a pre RebA 24,8 min.

Znižovaním obsahu MeOH v MF sa predlžoval retenčný čas SVgly a tie sa začínali deliť, ale zároveň dochádzalo k výraznej strate signálu. Ďalšie zníženie obsahu MeOH v MF za účelom dokonalého rozdelenia SVgly by analýzu neúmerne predĺžilo, navyše by bolo pravdepodobné, že SVgly v šume pozadia zaniknú. Z týchto dôvodov nemalo význam pokračovať v podmienkach optimalizácie a preto sme v tvorbe metódy pokračovali s iným typom kolóny.

5.8 Optimalizácia podmienok separácie stéviových glykozidov – HILIC

Druhým skúšaným typom chromatografickej kolóny bola kolóna Kinetex 2,6u HILIC 100A (100×2,1 mm; 2,6 μm), Phenomenex s povrchovo poréznymi časticami. Pri analýzach s týmto typom kolóny sme skúšali MF vhodné pre mód HILIC pozostávajúce z kombinácie:

1. ACN a vody (tabuľka 11),
2. ACN a pufru octanu amónneho s koncentráciou 0,01 M, upraveného kyselinou octovou na hodnoty pH=6 a pH=3, v rôznom pomere,
3. ACN a pufru mravčanu amónneho s koncentráciou 0,01/ 0,02/ 0,05 M, upraveného kyselinou mravčou na hodnotu pH=3, v rôznom pomere

Aj pri HILIC separácii ostáva elučné poradie glykozidov nezmenené, teda ako prvý eluuje ST a druhý RebA.

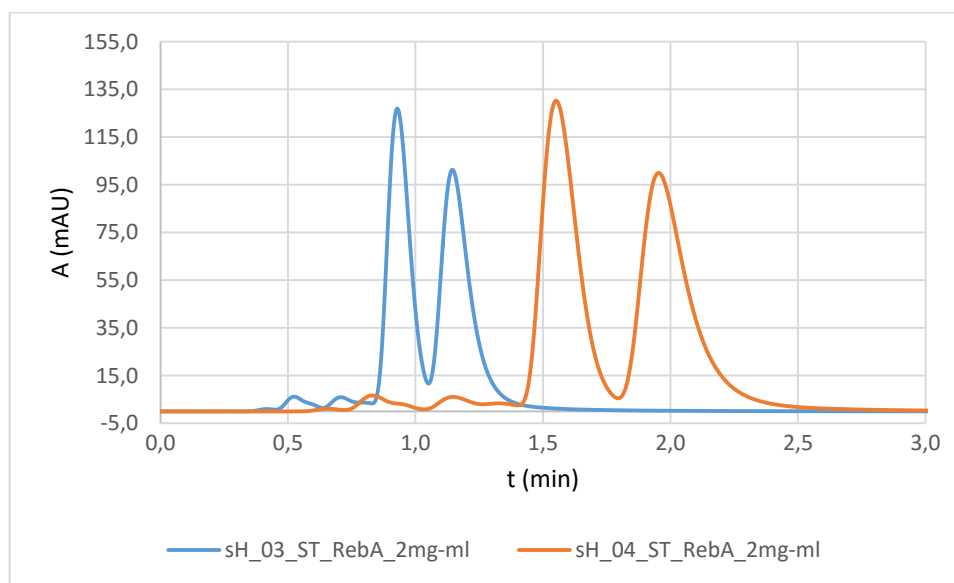
Tabuľka 11 Hľadanie optimálneho zloženia mobilnej fázy z ACN a vody

séria	MF (ACN:H ₂ O)	Prietok (ml/min)	UV (nm)	T (°C)	t _r ST 2 mg/ml	t _r RebA 2 mg/ml	t _r ST/RebA 2 mg/ml
sH01	80:20	0,66	210	30	0,61	0,63	0,631
sH02	85:15	0,66	210	30	0,72	0,78	0,77
sH03	90:10	0,66	210	30	0,928	1,143	0,93/1,15
sH04	90:10	0,4	210	30	1,58	2,07	1,55/1,95
sH05	95:5	0,4	210	30	3,96	7,74	–
sH06	92:8	0,4	210	30	2,02	2,86	2,03/2,86

5.8.1 Série analýz s mobilnou fázou zloženou z ACN a vody

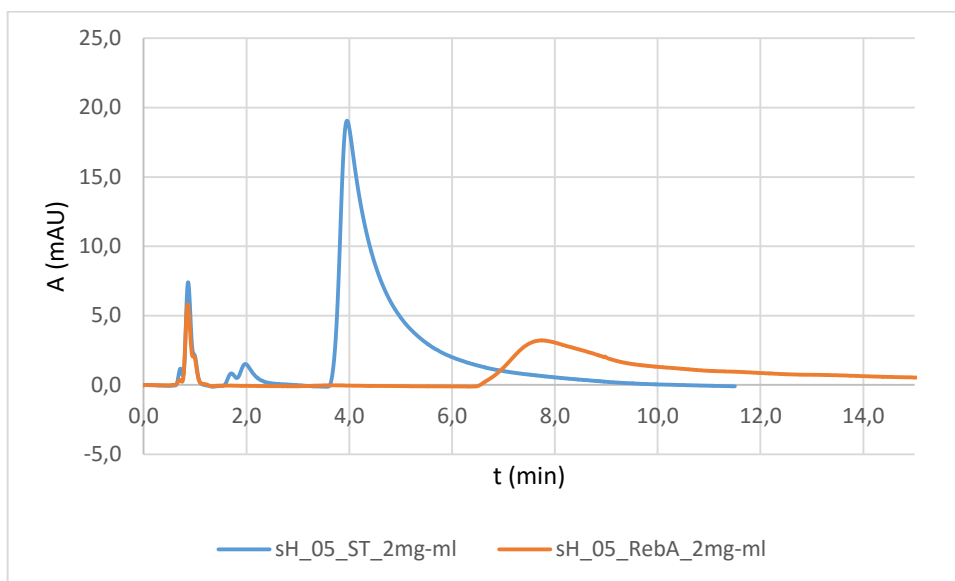
Na základe údajov z tabuľky 11 možno vidieť, že k deleniu SVgly dochádza až pri použití MF pozostávajúcej z ACN:H₂O v pomere 90:10 (sH03). Znížením rýchlosti prietoku MF z 0,66 (sH03) na 0,4 ml/min (sH04) sa dosiahlo väčšie rozlíšenie ST a RebA (graf 5).

Graf 5 Vplyv zmeny prietoku mobilnej fázy na rozlíšenie SVgly v sériách sH03 a sH04



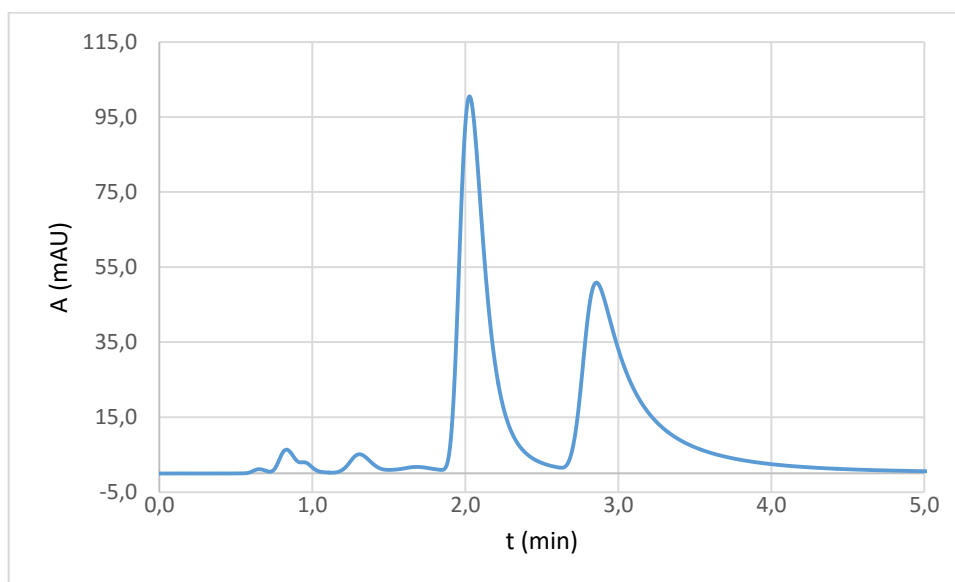
V analýzach sH05 a sH06 sme pokračovali so znižovaním obsahu vodnej zložky v MF, za účelom ďalšieho zvýšenia rozlíšenia, čo sa zároveň prejavilo predĺžením retenčných časov. V sérii sH05 bol obsah vodnej zložky iba 5 % a píky SVgly sa veľmi rozširovali a výrazne chvostovali (graf 6).

Graf 6 Vplyv zníženia obsahu vody v mobilnej fáze na tvar píkovej Svgy



Podmienky, ktoré sme zvolili v sérii sH06 predstavovali kompromis medzi sériami sH04 a sH05. Dosiahli sme tým najlepšiu možnú separáciu, ktorú umožňovalo použitie MF pozostávajúcej len z ACN a vody (graf 7). Vzhľadom na nevhodné parametre oboch píkovej, spôsobené predovšetkým výrazným chvostovaním RebA, sme v ďalšom procese optimalizácie pristúpili k použitiu MF s obsahom pufru.

Graf 7 Najlepšia dosiahnutá separačná schopnosť MF z ACN a vody na SVgly



5.8.2 Série analýz s mobilnou fázou zloženou z ACN a pufru octanu amónneho s kyselinou octovou

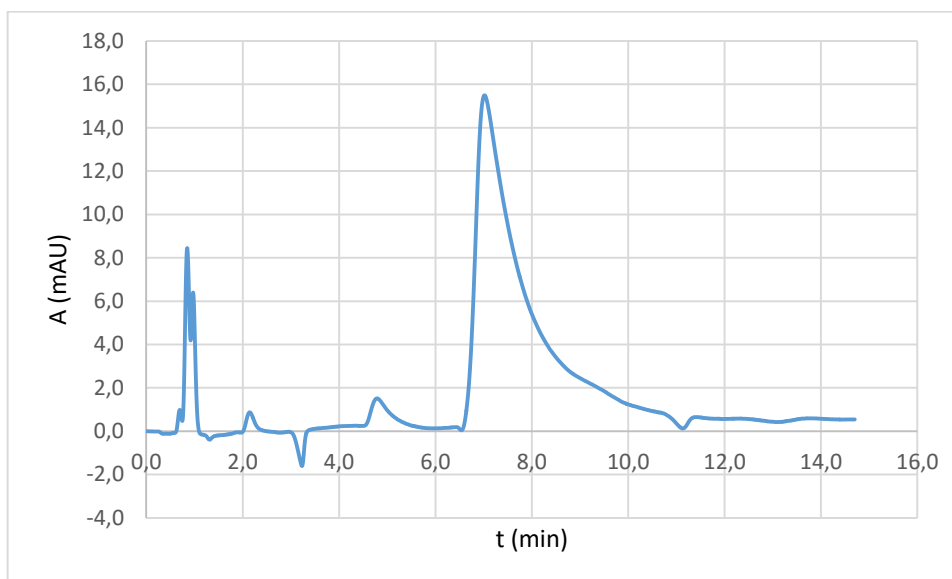
V týchto sériách sme používali pufr octanu amónneho s kyselinou octovou s koncentráciou 0,01 M a hodnotách pH=6 a pH=3. Pred samotným použitím pufru, sme overili jeho rozpustnosť v prostredí s vysokým podielom ACN. Pufr sa nevyzrážal ani v MF s 95% obsahom ACN. Presný rozpis použitých kombinácií sa nachádza v tabuľke 12.

Tabuľka 12 Hľadanie optimálneho zloženia mobilnej fázy z ACN a pufru octanu amónneho s kyselinou octovou

séria	MF (ACN:pufr)	pH	Prietok (ml/min)	UV (nm)	T °C	t _r ST	t _r RebA	t _r ST/RebA
sH07	80:20	6	0,4	210	30	1,07	1,13	1,11
sH08	85:15	6	0,4	210	30	1,3	1,52	1,32/1,54
sH09	90:10	6	0,4	210	30	2,02	2,87	2,01/2,88
sH10	95:5	6	0,4	210	30	7,02	–	–
sH11	80:20	3	0,4	210	30	1,1	–	–
sH12	85:15	3	0,4	210	30	1,21	1,36	–
sH13	90:10	3	0,4	210	30	1,76	2,41	1,77/2,41
sH14	90:10	6	0,4	210	30	1,95	2,76	1,97/2,77
sH15	90:10	6	0,45	210	30	1,79	2,51	1,76/2,51
sH16	90:10	6	0,5	210	30	1,59	2,25	1,62/2,27
sH17	90:10	6	0,5	210	35	1,52	2,12	1,52/1,75
sH18	90:10	6	0,6	210	35	1,26	1,73	1,25/1,75
sH19	90:10	6	0,7	210	35	1,08	1,48	1,06/1,46
sH20	90:10	6	0,6	210	40	1,2	1,63	1,2/1,62
sH21	90:10	6	0,7	210	40	1,02	1,38	1,02/1,36
sH22	90:10	3	0,4	210	30	1,74	2,4	1,76/2,38
sH23	90:10	3	0,5	210	30	1,4	1,88	1,41/1,89
sH24	90:10	3	0,6	210	30	1,15	1,53	1,18/1,56
sH25	90:10	3	0,8	210	30	0,84	1,1	0,83/1,09
sH26	90:10	3	0,8	210	40	0,82	1,06	0,83/1,07

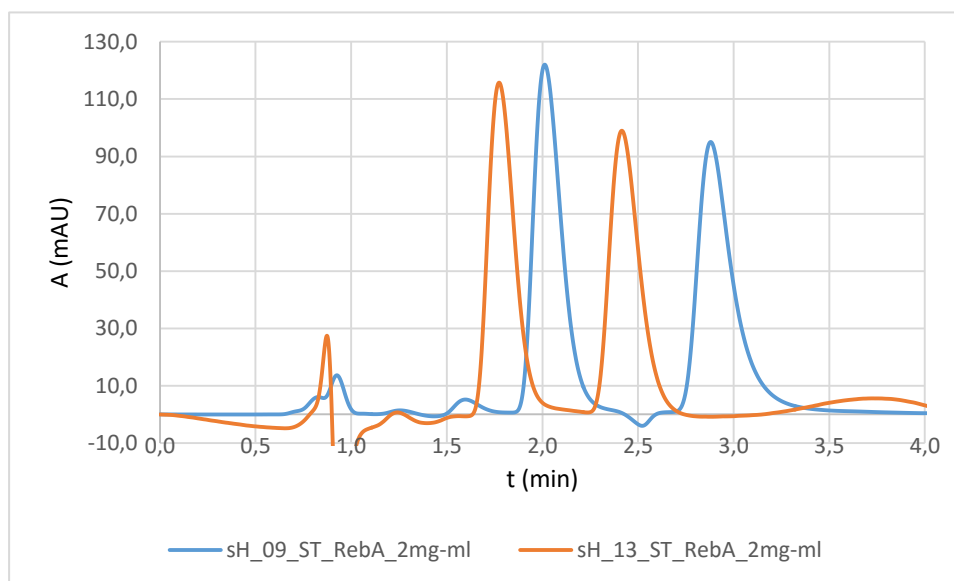
V sériách sH07 až sH10 sa jednotlivé analýzy líšia len v pomere ACN a pufru v MF. V tabuľke 12 je znázornené, že so zvyšujúcim sa obsahom ACN v MF sa predlžuje retenčný čas, čo však platí aj pre všetky ostatné série analyzované v móde HILIC. Pri obsahu ACN 95 % v MF v sH10 (graf 8) dochádza k rozmývaniu elučnej zóny SVgly čo sa prejavilo rozšírením píku a jeho chvostovaním.

Graf 8 Chvostovanie píku pri zvýšení obsahu ACN v MF na 95 %



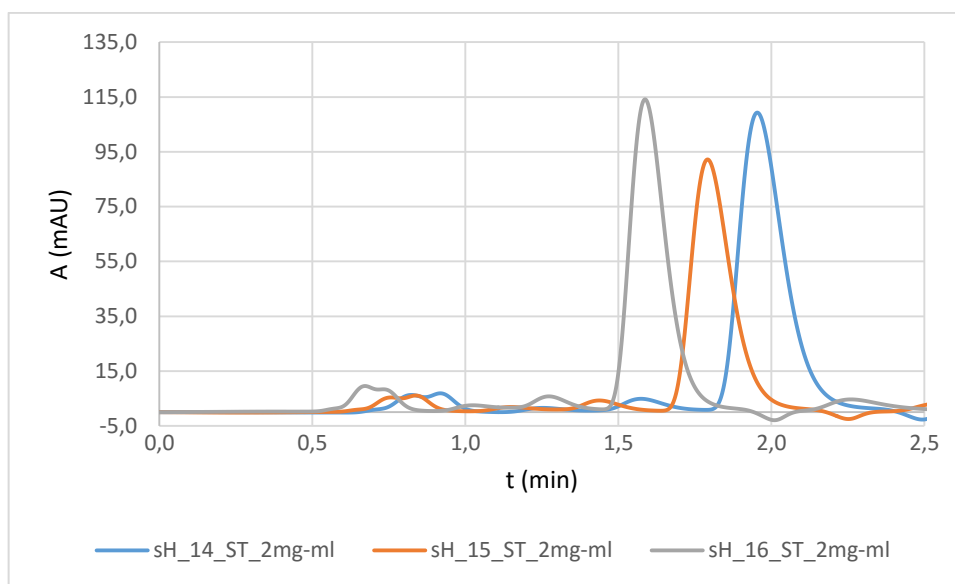
Série sH11 až sH13 sa od seba tiež odlišujú len pomerom ACN a pufru v MF. V porovnaní so sériami sH07 až sH10, ktoré používali pufror s pH=6, sa série sH11 až sH13 analyzované s pufrorom pH=3 vyznačujú kratšími retenčnými časmi (Graf 9).

Graf 9 Vplyv pH na retenčné časy, sH09 pH=6, sH13 pH=3

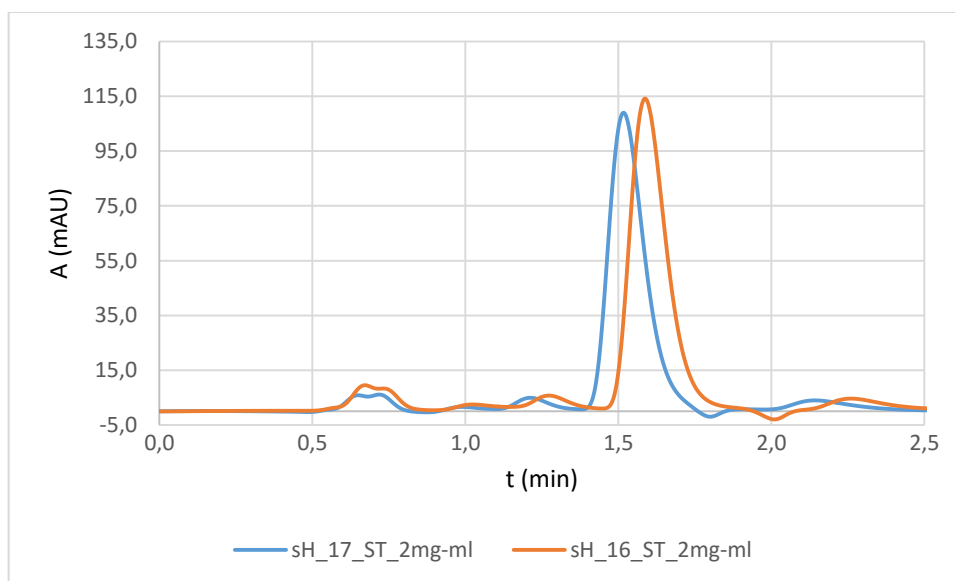


Série sH14 až sH21 prebiehali MF s konštantným pomerom ACN:H₂O 90:10 a hodnou pH=6. Tieto série sa odlišujú prietokom MF a teplotou kolóny. Podľa nameraných retenčných časov platí, že so zvyšujúcou sa teplotou (graf 11) alebo zvyšujúcim sa prietokom (graf 10) klesá retenčný čas a analýza sa urýchľuje. Väščí vplyv na urýchlenie analýzy má použitie vyšších prietokov.

Graf 10 Vplyvu rýchlosti prietoku MF na rýchlosť analýzy, sH14 $v = 0,4$ ml/min, sH15 $v = 0,45$ ml/min, sH16 $v = 0,5$ ml/min



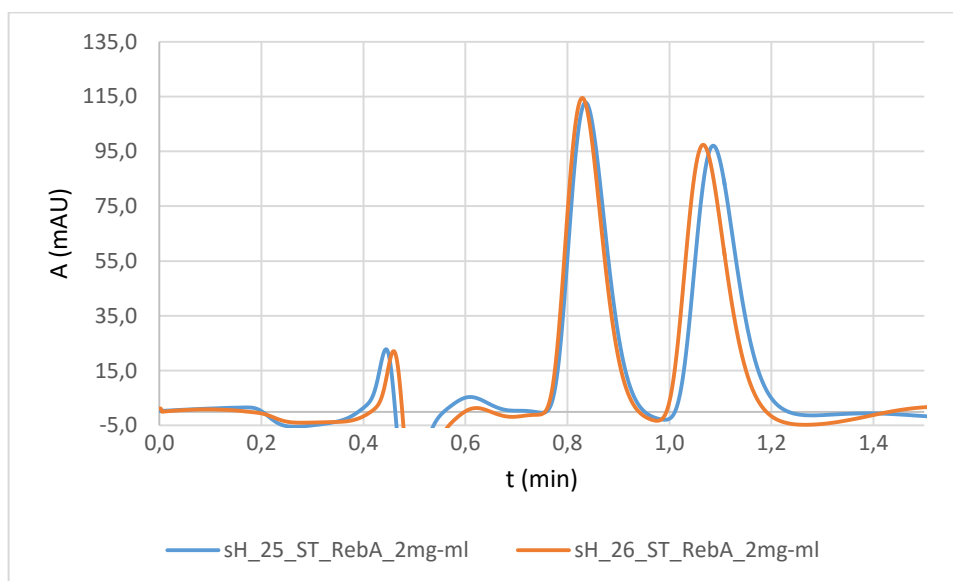
Graf 11 Vplyv zmeny teploty na rýchlosť analýzy, zmena z 30°C (sH16) na 35°C (sH17)



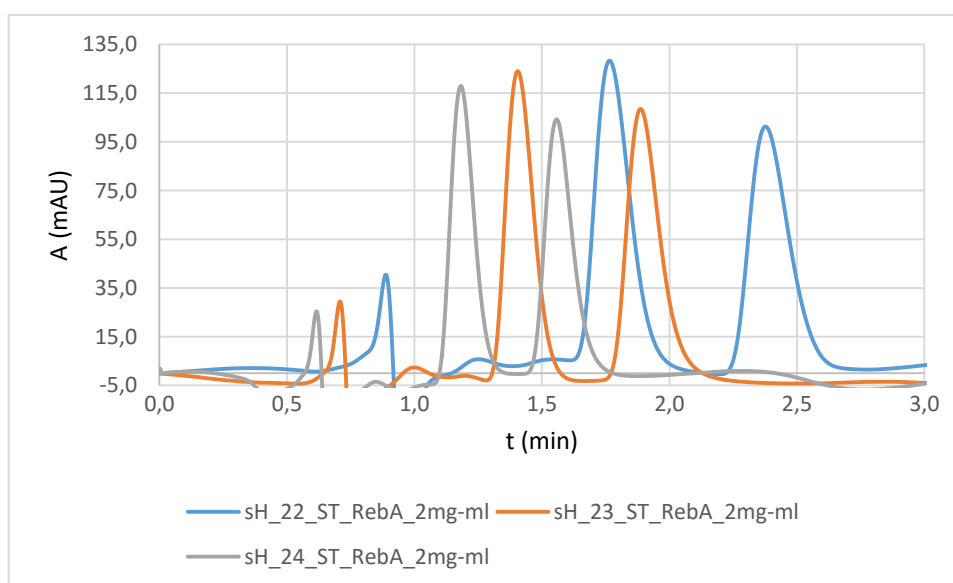
V sériách sH22 až sH26 sa optimalizovali podmienky analýzy s MF v pomere 90:10 pre ACN:pufor, ktoré spomedzi vyskúšaných analýz poskytovali najlepšie parametre pre retenčné časy a rozlíšenie avšak, tentokrát s pufrom pH=3.

Predpokladali sme, že ďalším zvyšovaním teploty (graf 12), prietoku MF (graf 13), prípadne ich kombinácie dosiahneme lepšie parametre píkovo.

Graf 12 Porovnanie analýz sH25 (30 °C) a sH26 (40 °C), ktoré sa líšia iba teplotou kolóny



Graf 13 Porovnanie analýz sH22 $v = 0,4$ ml/min, sH23 $v = 0,5$ ml/min a sH24 $v = 0,6$ ml/min



Série sH25 a sH26 predstavovali najlepšie možné podmienky, aké sa dali dosiahnuť s použitím kombinácie ACN a pufru z octanu amónneho a kyseliny octovej ako MF (graf 12).

Používaný octan amónny, ktorý je silne hygroskopický, nebol vhodne uskladnený v exikátore, čo spôsobilo jeho zvlhnutie. Preto, vypočítané a reálne odvážené navážky nezodpovedali koncentrácii 0,01 M. Nevedeli sme tak posúdiť reálnu koncentráciu pufru ktorý sme používali na delenie SVgly.

Napriek tomu bolo viditeľné, že prítomnosť pufru priaznivo ovplyvňuje podmienky separácie SVgly vplyvaním na zmenu ich retencie. Mohli sme predpokladať,

že so zvýšením koncentrácie pufru sa bude retencia SVgly ďalej zvyšovať, čo sa prejaví lepším rozlíšením a lepším tvarom pík.

Z tohto dôvodu sme sa rozhodli pre zakúpenie kryštalického mravčanu amónneho, ktorý bol v publikovaných prácach veľmi často používaný práve v spojení so separáciou SVgly HILIC metódou. Výhodou použitia pufru pozostávajúceho z mravčanu amónneho je aj možný prenos metódy na separáciu HPLC v spojení s MS detekciou.

5.8.3 Série analýz s mobilnou fázou zloženou z ACN a pufru mravčanu amónneho s kyselinou mravčou

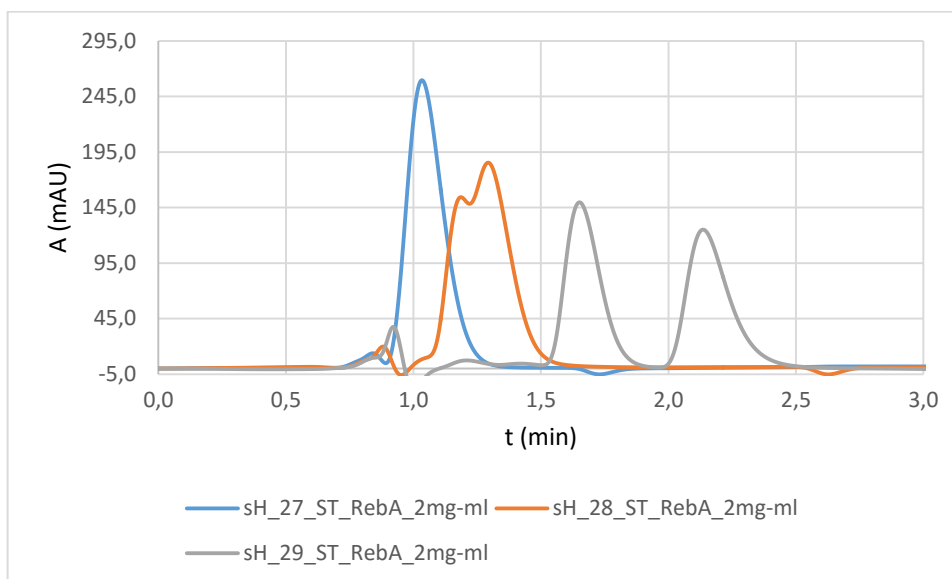
Testovali sme MF pripravené z mravčanu amónneho v koncentráciách 0,01 M, 0,02 M a 0,05 M a okyslené kyselinou mravčou na hodnotu pH=3 (tabuľka 13). Pri každej zmene koncentrácie pufru sa odskúšalo jeho možné vyzrážanie v prostredí s vysokým obsahom ACN (95 %). Rozpustnosť pufru mravčanu amónneho vo všetkých použitých koncentráciách bola výborná a nedochádzalo ku zrážaniu.

Tabuľka 13 Hľadanie optimálneho zloženia mobilnej fázy s obsahom 0,01 mol/l pufru mravčanu amónneho a kyseliny mravčej

séria	MF (ACN:pufor) 0,01 M	pH	Prietok (ml/min)	UV (nm)	T °C	t _r ST	t _r RebA	t _r ST/RebA
sH27	80:20	3	0,4	210	30	1,01	1,08	1,03
sH28	85:15	3	0,4	210	30	1,18	1,3	1,29
sH29	90:10	3	0,4	210	30	1,66	2,12	1,65/2,14
sH30	90:10	3	0,6	210	30	1,1	1,33	1,11/1,38
sH31	90:10	3	0,6	210	40	1,08	1,35	1,11/1,38
sH32	92:8	3	0,4	210	30	1,9	2,68	1,93/2,68
sH33	92:8	3	0,3	210	30	2,59	3,6	2,56/3,58
sH34	92:8	3	0,5	210	30	1,57	2,16	1,56/2,15

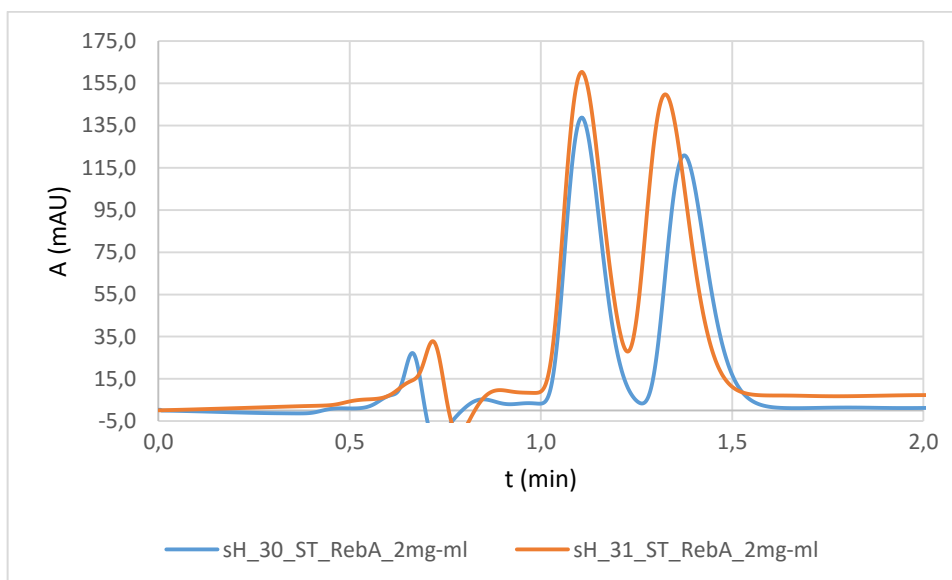
Pri použití MF 80:20 ACN:pufor (sH27,modrá) ešte nedochádza ku deleniu zložiek. Náznaky delenia sa objavujú až pri použití MF s obsahom ACN:pufor v pomere 85:15 (sH28, oranžová). Úplné rozdelenie SVgly nastáva pri použití MF s pomerom 90:10 pre ACN: pufor (sH29, sivá) (graf 14).

Graf 14 Vplyv zvyšovania obsahu ACN v mobilnej fáze na delenie ST a RebA



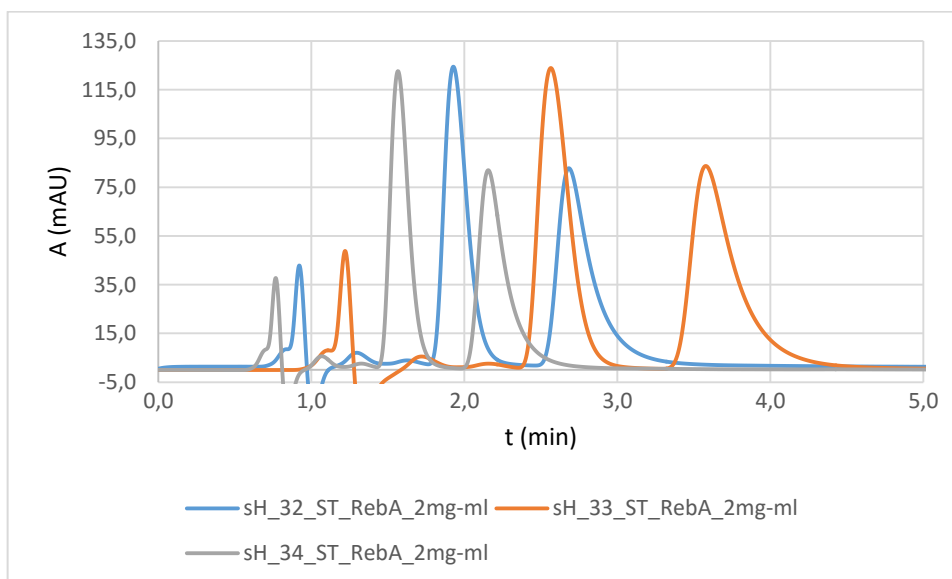
V sériách sH30 a sH31 sú použité vyššie prietoky 0,6 ml/min avšak, zmenou teploty z 30 °C (sH30) na 40 °C (sH31) dochádza ku zhoršeniu rozlíšenia a postupnému zlievaniu pík (graf 15).

Graf 15 Vplyv zmeny teploty na rozlíšenie SVgly v kombinovanom pracovnom štandarde ST a RebA



Graf 16 znázorňuje série sH32 až sH34, kedy sa postupne po 0,1 ml/min zvyšuje prietok MF. Rýchlosť prietoku MF je v sérii sH32 0,4 ml/min, v sH33 0,3 ml/min a v sH34 0,5 ml/min. So zvyšujúcim sa prietokom sa skracujú retenčné časy SVgly a zároveň sa píky ST a RebA približujú, ale stále si zachovávajú dostatočné rozlíšenie. Okrem toho sa vylepšujú aj parametre pík, čo si môžeme najlepšie všimnúť na píkoch RebA, ktoré pri vyšších prietokoch chvostujú menej.

Graf 16 Vplyv prietoku MF na rozlíšenie a chvostovanie píkov SVgly

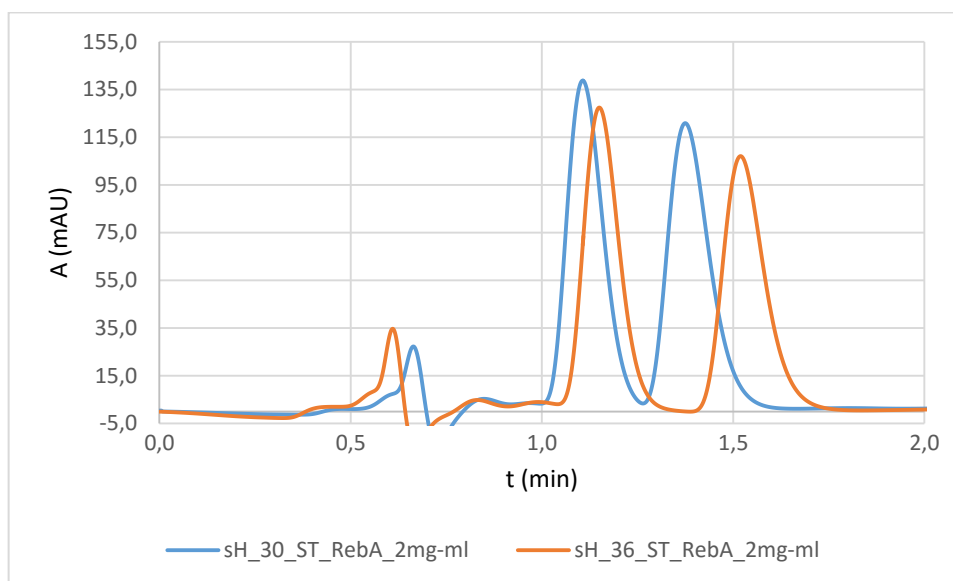


Tabuľka 14 Hľadanie optimálneho zloženia mobilnej fázy s obsahom 0,02 mol/l pufru mravčanu amónneho okysleného kyselinou mrvačou

séria	MF (ACN:pufor) 0,02 mol/l	pH	Prietok (ml/min)	UV (nm)	T °C	t _r ST	t _r RebA	t _r ST/RebA
sH35	90:10	3	0,4	210	30	1,76	2,35	1,73/2,32
sH36	90:10	3	0,6	210	30	1,16	1,52	1,15/1,52
sH37	91:9	3	0,6	210	30	1,35	1,91	1,33/1,9

S pufrom mravčanu amónneho s koncentráciou 0,02 M sme previedli len tri série (tabuľka 14), ktorých účelom bolo zistiť vplyv zmeny koncentrácie pufru na ďalšie ovplyvnenie parametrov pík a ich rozlíšenia.

Graf 17 Porovnanie vplyvu koncentrácie pufru 0,01 M (sH30) a 0,02 M (sH36) na retenčný čas, rozlíšenie a parametre píkov kombinovaného pracovného štandardu SVgly



Na grafe 17 môžeme vidieť, že použitím koncentrovanejšieho pufru (oranžová krivka) sa predĺžil retenčný čas ST len mierne, zatiaľ čo retenčný čas RebA sa predĺžil výraznejšie. Navyše, rozlíšenie oboch glykozidov sa pri použití koncentrovanejšieho pufru zväčšilo. To naznačuje možnosť použitia vyšších prietokov v kombinácii s koncentrovanejšími puframi mravčanu amónneho a kyseliny mravčej, ktoré zabránia prudkej strate rozlíšenia SVgly v kombinácii s vyššími prietokmi.

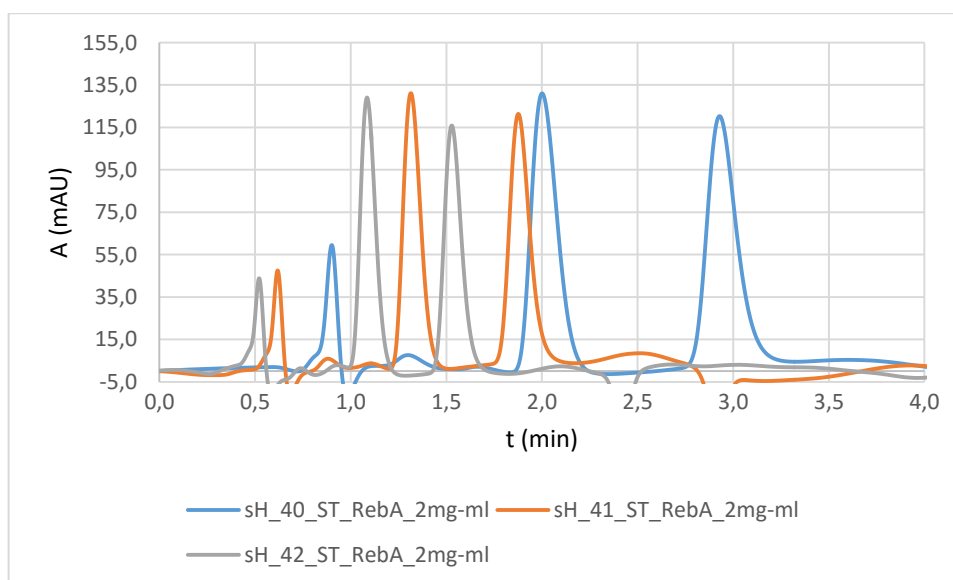
V sériách sH38 až sH49 preto používame koncentrovanejší 0,05 M pufr mravčanu amónneho upraveného kyselinou mravčou na hodnotu pH 3. Podrobnejší prehľad podmienok analýz jednotlivých sérií sa nachádza v tabuľke 15.

Tabuľka 15 Hľadanie optimálneho zloženia mobilnej fázy s obsahom 0,05 M pufru mravčanu amónneho okysleného kyselinou mravčou

séria	MF (ACN:pufor) 0,05 mol/l	pH	Prietok (ml/min)	UV (nm)	T °C	t _r ST	t _r RebA	t _r ST/RebA
sH38	80:20	3	0,4	210	30	1,03	1,1	1,07
sH39	85:15	3	0,4	210	30	1,25	1,47	1,26/1,47
sH40	90:10	3	0,4	210	30	1,99	2,93	2/2,93
sH41	90:10	3	0,6	210	30	1,3	1,87	1,31/1,88
sH42	90:10	3	0,7	210	30	1,11	1,54	1,09/1,53
sH43	90:10	3	0,4	210	30	1,84	2,72	1,92/2,73
sH44	90:10	3	0,7	210	30	1,17	1,70	1,16/1,8
sH45	91:9	3	0,4	210	30	2,48	3,98	2,48/4,0
sH46	91:9	3	0,6	210	30	1,64	2,64	1,67/2,65
sH47	91:9	3	0,7	210	30	1,41	2,23	1,42/2,25
sH48	90:10	3	0,7	210	30	1,1	1,55	1,12/1,58
sH49	90:10	3	0,7	203	30	1,17	1,68	1,17/1,68

K úplnému rozdeleniu SVgly dochádzalo až pri pomere ACN:pufor 90:10. Následne, postupným zvyšovaním prietoku MF z 0,4 ml/min (sH40, modrá), na 0,6 ml/min (sH41, oranžová) až na hodnotu 0,7 ml/min (sH42, sivá) sa dosiahla lepšia symetria píkov ST a RebA a vylepšili sa aj ich parametre (graf 18).

Graf 18 Vplyv zmeny rýchlosti MF na analýzu SVgly s koncentráciou pufru 0,05 mol/l

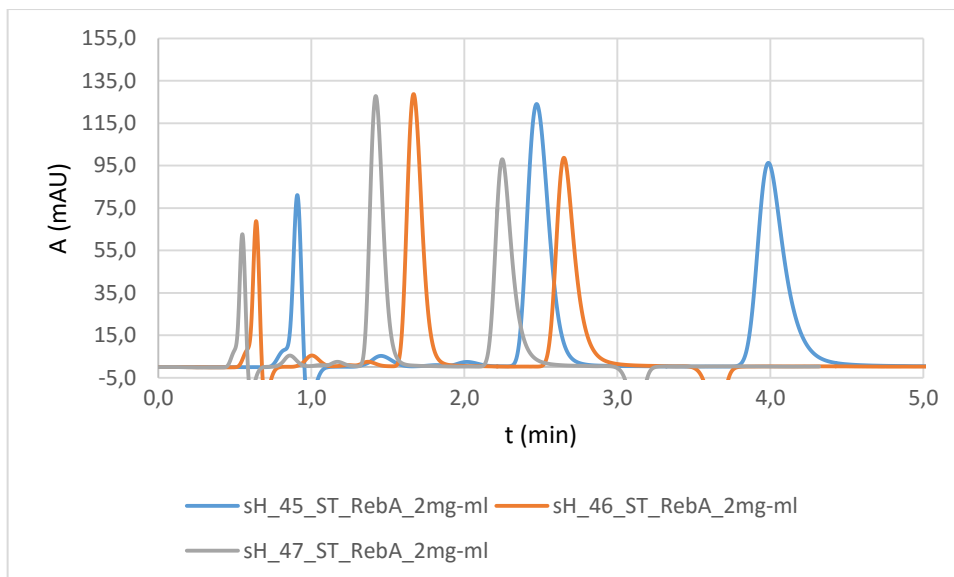


Od série sH43 sme MF pripravovali manuálnym zmiešaním ACN a pufru (0,05 M, pH=3) v požadovaných pomeroch do odmerného valca. V porovnaní so zmiešavačom HPLC prístroja, kedy vzniká MF prepínaním prívodov roztokov v čerpadle v časových úsekoch tak, aby bolo výsledné zloženie MF v požadovanom pomere,

umožňuje manuálne zmiešanie lepšiu homogenizáciu rozpúšťadiel, rýchlejšie ustáľovanie rovnováhy a menšie vlnenie základnej línie.

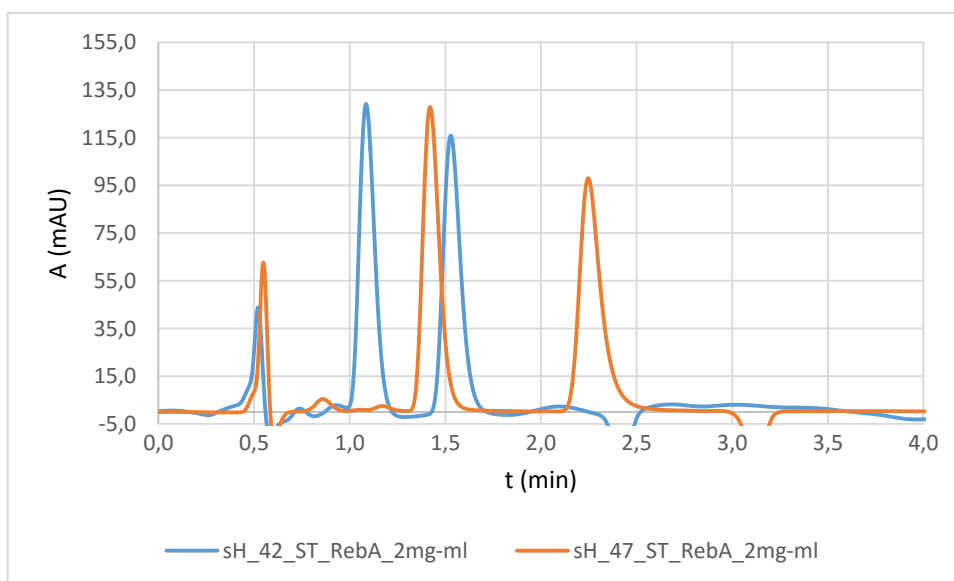
Vlnenie na základnej línii vplývalo na opakovateľnosť analýz, kedy neumožňovalo presne porovnávať plochy integrovaných píkovo SVgly.

Graf 19 Vplyv zmeny prietoku MF s 91% obsahom ACN na tvar a retenčné časy píkovo



Rovnaký spôsob porovnávania vplyvu prietoku MF na parametre analýzy ako sme použili v sériách sH40 až sH42, používame aj na porovnanie vplyvu prietoku MF so zložením ACN:pufor 91:9 (graf 19). Prietok MF zvyšujeme z 0,4 ml/min (sH45, modrá), na 0,6 ml/min (sH56, oranžová) až na 0,7 ml/min (sH47, sivá). Aj v tomto prípade sa zrýchlením prietoku MF zlepšujú parametre píkovo a znižuje chvostovanie SVgly.

Graf 20 Porovnanie analýz SVgly s mobilnou fázou ACN:pufor 90:10 a 91:9

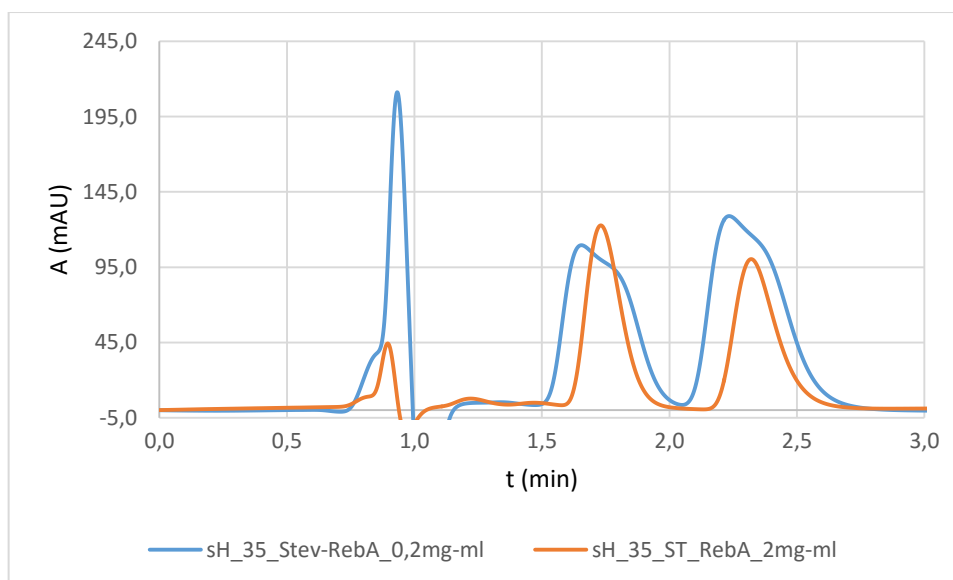


Na grafe 20 môžeme vidieť, že zvýšenie obsahu ACN v MF z 90 % (sH42, modrá) na 91 % (sH47, oranžová) sa prejavilo okrem predĺženia retenčných časov aj miernou stratou intenzity signálu v sérii sH47, na úkor rozšírenia elučnej zóny predovšetkým píku RebA.

Tieto série analýz potvrdili, že najvhodnejšou voľbou bude MF so zložením 90:10 pre ACN:pufor s koncentráciou 0,05 M, prietokom 0,7 ml/min a o teplotou 30 °C.

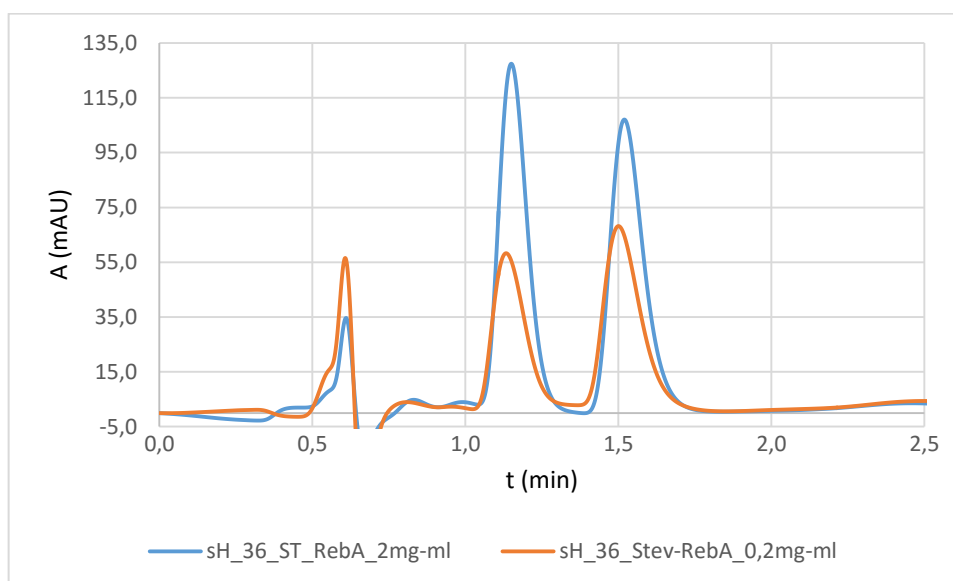
Napriek tomu, že tabuľky neuvádzajú, aké objemy sa použili na injektovanie pracovných štandardov, niektoré analýzy prebehli najprv s vyššími nástrekmi, ktoré sme neskôr upravili na 1 μ l. Pre metódy HILIC sa vo všeobecnosti odporúča použitie čo najmenších objemov nástrekov, ktoré vytvárajú užšie elučné zóny a poskytujú lepšie parametre píkov bez rizika preťaženia kolóny.

Graf 21 Vplyv objemu nástreku 15 μ l a 1 μ l na tvar píkov SVgly



V sérii sH35 sme analyzovali kombinovaný pracovný štandard ST a RebA s koncentráciou 0,2mg/ml a nástrekom 15 μ l. V grafe 21 sa nachádza porovnanie s kombinovaným pracovným štandardom ST a RebA s koncentráciou 2 mg/ml a nástrekom 1 μ l. Môžeme vidieť, že pri nástreku 15 μ l dochádzalo k preťaženiu kolóny, čo sa prejavilo výrazným rozšírením píkov, až stratou ich typického tvaru.

Graf 22 Vplyv objemu nástreku 5 μ l a 1 μ l na tvar píkov SVgly



V grafe 22 sme znížili nástrek kombinovaného pracovného štandardu ST a RebA s koncentráciou 0,2 mg/ml na 5 μ l. Porovnáваме ho s kombinovaným pracovným štandardom ST a RebA s koncentráciou 2 mg/ml a nástrekom 1 μ l. V tomto prípade, pri nástreku s objemom 5 μ l nadobúdajú píky typický tvar na rozdiel od pík v grafe 21 s nástrekom 15 μ l.

Tabuľka 16 Vplyv zloženia mobilnej fázy a jej rýchlosti prietoku na hodnoty prevádzkových tlakov kolóny

séria	MF (ACN:pufor) 0,05 mol/l	prietok (ml/min)	tlak (MPa)
sH38	80:20	0,4	14
sH39	85:15	0,4	12,5
sH40	90:10	0,4	11,3
sH41	90:10	0,6	17
sH42	90:10	0,7	19,8

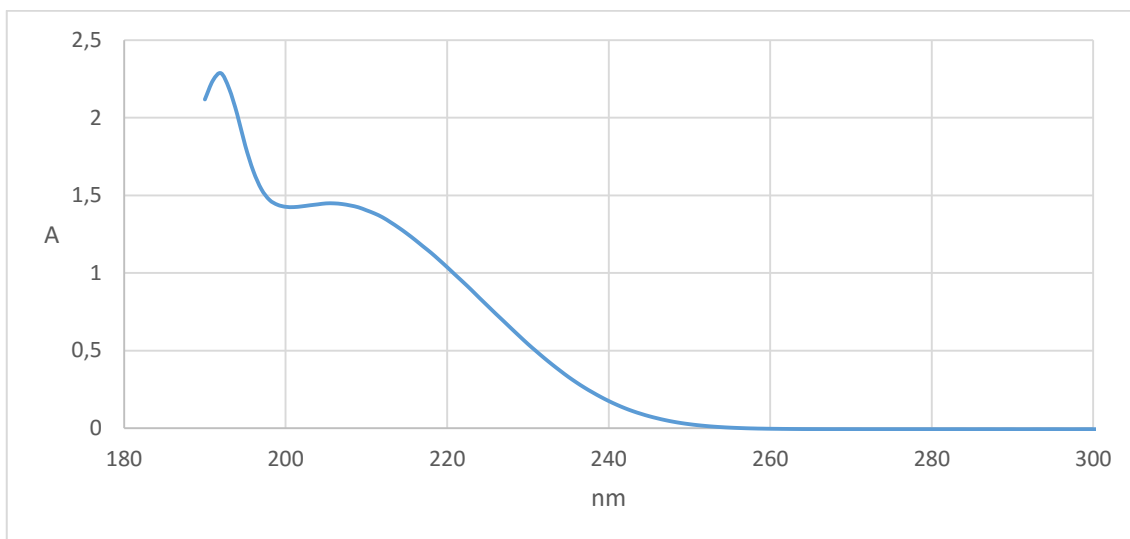
Používanie ACN, ktorého viskozita je nižšia než viskozita vody, sa prejavilo poklesom prevádzkových tlakov na kolóne. V tabuľke 16 je znázornený vplyv obsahu ACN v MF na prevádzkový tlak kolóny. Vďaka MF s vysokým podielom ACN bol prevádzkový tlak kolóny dostatočne nízky na to, aby sme použili prietoky s hodnotami 0,7 ml/min.

Vlnovú dĺžku detekcie sme v procese hľadania optimálnych separačných podmienok zvolili podľa informácií z publikovaných článkov, ktoré sa zaoberali rovnakou problematikou ako naša diplomová práca. Po zistení optimálneho pomeru ACN:pufor, koncentrácie pufru, prietoku, teploty a objemu nástrekovaného pracovného

štandardu, bola posledným krokom optimalizácie metódy nastavenie vlnovej dĺžky pri ktorej prebieha UV detekcia.

Na zistenie absorpčného maxima (λ_{\max}) ST (graf 24) a RebA (graf 25) sme použili štandardy ST a RebA v prostredí používanej MF, teda v prostredí ACN:pufor (0,05 mol/l) 90:10. Absorpčné spektrum každého zo SVgly sme získali jeho porovnaním s roztokom blanku, ktorého zloženie je totožné s MF (graf 23).

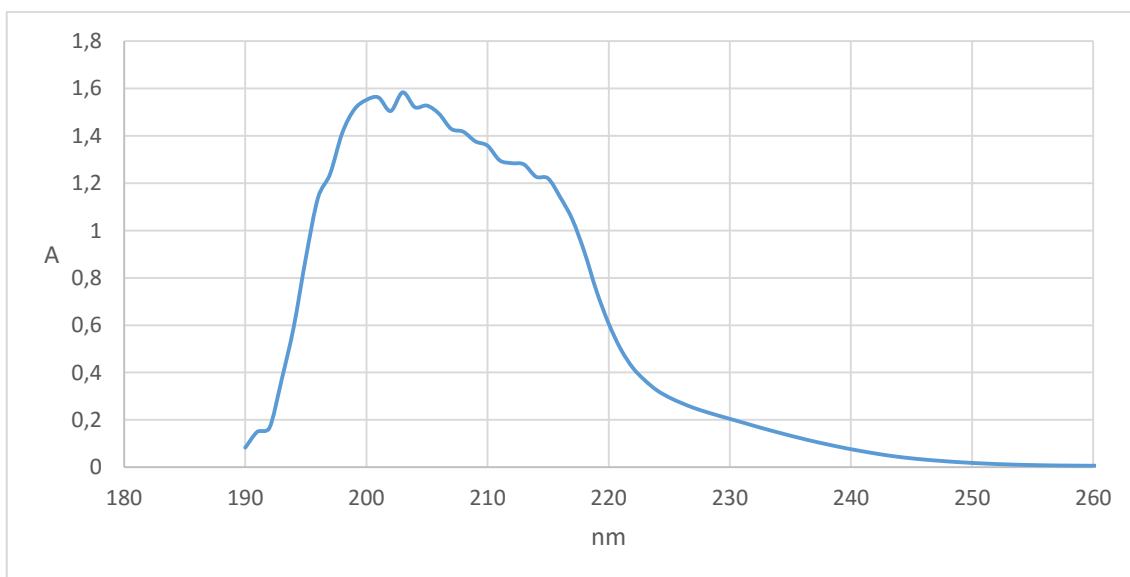
Graf 23 Absorpčná krivka mobilnej fázy



λ_{\max} MF = 192 nm

A = 2,286594

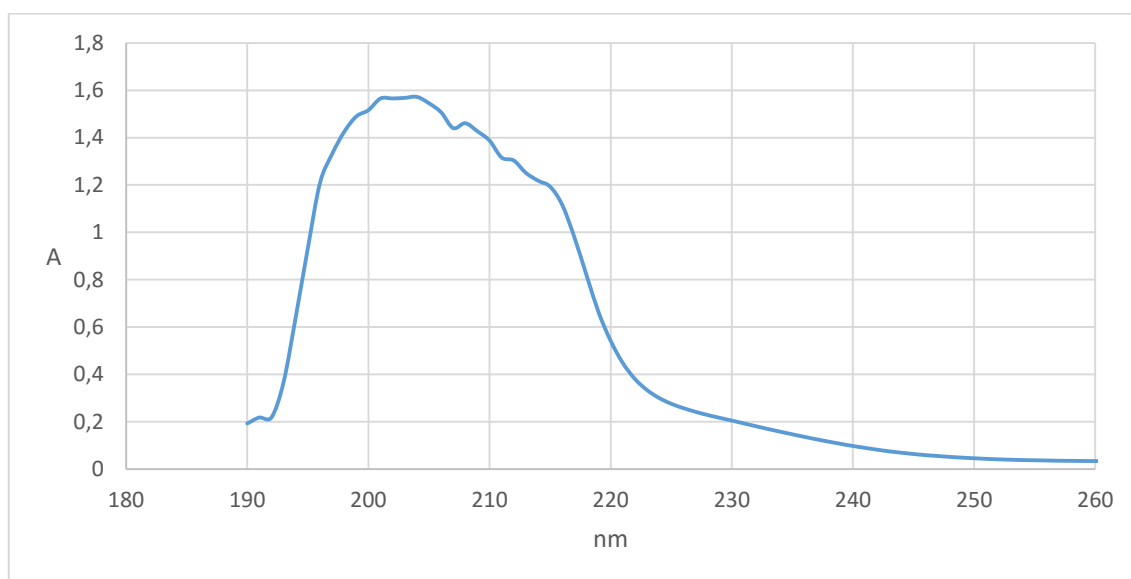
Graf 24 Absorpčná krivka stéviozidu



λ_{\max} ST = 203 nm

A = 1,584013

Graf 25 Absorpčná krivka rebaudiozidu A

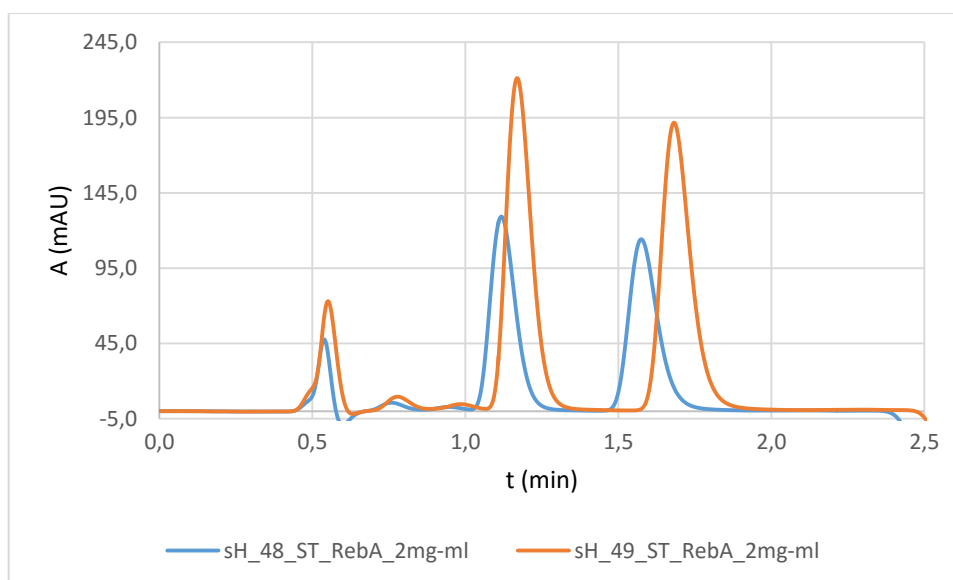


λ_{\max} RebA = 204 nm

A = 1,572248

Na základe získaných maxím absorpčných spektier SVgly sme zvolili hodnotu UV detekcie na 203 nm. Hodnota absorbancie RebA pri 203 nm síce nie je jeho absorpčné maximum, ale rozdiel je zanedbateľný ($A_{203 \text{ nm}} = 1,567962$).

Graf 26 Porovnanie vplyvu vlnovej dĺžky detekcie pri 203 a 210 nm na citlivosť analýzy



Na grafe 26 môžeme vidieť, že po zmene vlnovej dĺžky z 210 nm (modrá) na 203 nm (oranžová) sa analytický signál takmer zdvojnásobil a zároveň došlo k miernemu posunu retenčných časov oboch SVgly, čo je pravdepodobne spôsobené malou odchýlkou v príprave nového puftru alebo samotnej MF.

Na základe prezentovaných výsledkov meraní jednotlivých sérií, sme dosiahli optimálnej separácie ST a RebA za podmienok:

Kolóna:	Kinetex 2,6u HILIC 100A, 100×2,1 mm; 2,6 µm
Mobilná fáza:	90:10 ACN:pufor
Pufor:	0,05 M mravčan amónny okyslený kys. mravčou na pH=3
Prietok mobilnej fázy:	0,7 ml/min
Teplota kolóny:	30 °C
UV detekcia:	203 nm
Pracovný tlak kolóny:	19,8MPa
Objem nástreku:	1 µl
Retenčný čas:	ST= 1,17 min RebA= 1,68 min

Prezentované podmienky analýzy, sú finálne podmienky novej metódy stanovenia glykozidov ST a RebA metódou HPLC v móde HILIC. Nasledujúca kapitola sa zaoberá validáciou metódy s danými parametrami.

5.9 Validácia

5.9.1 Linearita

Linearitu metódy sme stanovili z kalibračných roztokov ST a RebA. Jednotlivé kalibračné roztoky sme pripravovali podľa tabuľky 17 pipetovaním príslušného objemu zásobného štandardu SVgly a príslušného objemu MF do označenej vialky.

Do označených vialiek sme najprv napipetovali príslušné objemy MF zloženej z ACN:H₂O v pomere 80:20. Následne sme do vialiek pipetovali príslušné objemy zásobných štandardov ST a RebA s koncentráciou 2 mg/ml, tiež pripravené v prostredí 80:20 pre ACN:H₂O.

Tabuľka 17 Príprava kalibračných štandardov

Vialka č.	1	2	3	4	5	6	7
c (mg/ml)	0,02	0,2	0,4	0,7	1	1,2	1,5
V (ml)	1	1	1	1	1	1	1
V _{MF} (ml)	0,99	0,9	0,8	0,65	0,5	0,4	0,25
V _{štandard} (ml)	0,01	0,1	0,2	0,35	0,5	0,6	0,75

Kalibračné roztoky, rovnako ako zásobné štandardy z ktorých boli pripravované, sa zámerné nachádzali v prostredí ACN:H₂O v pomere 80:20. Dôvodom bola ich kryštalizácia v prostredí s 90% obsahom ACN.

Každá z pripravených vialiek s kalibračným roztokom ST (tabuľka 18) a RebA (tabuľka 19) sa premerala 3 krát. Z troch nameraných koncentrácií SVgly sa vypočítala priemerná plocha píku, zostrojil sa graf závislosti plochy na koncentrácii a takto vzniknuté body kalibračnej priamky boli proložené do lineárnej regresie pre ST (graf 27) a RebA (graf 28).

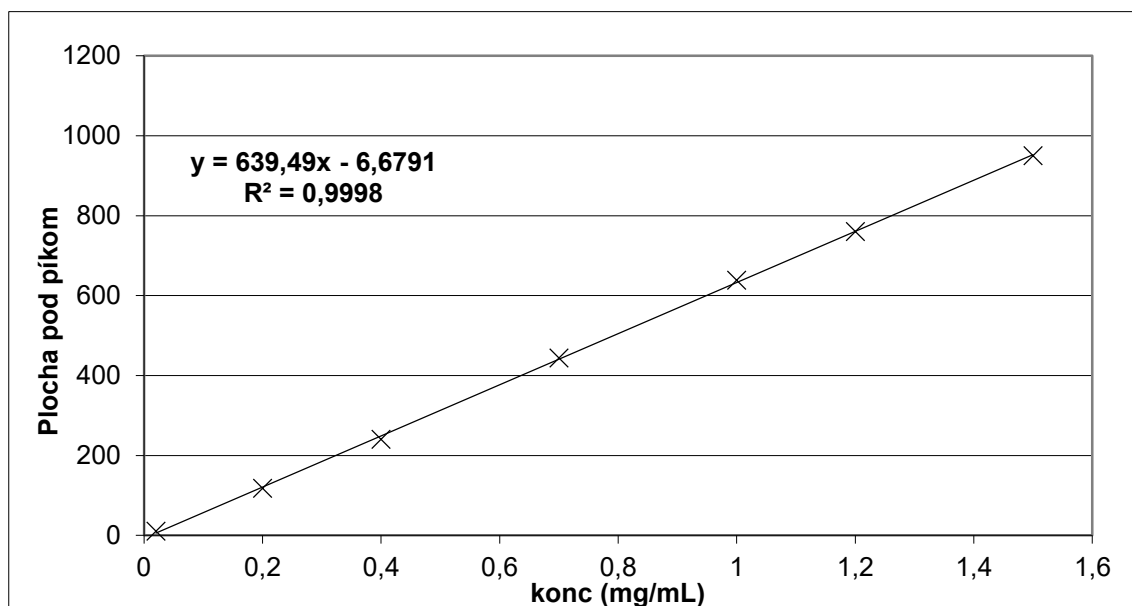
Tabuľka 18 Priemerné namerané hodnoty plôch kalibračných roztokov stéviozidu

Vialka č.	1	2	3	4	5	6	7
c (mg/ml)	0,02	0,2	0,4	0,7	1	1,2	1,5
Priemerná plocha	10,951	118,342	241,023	444,4533	638,40	760,363	949,96

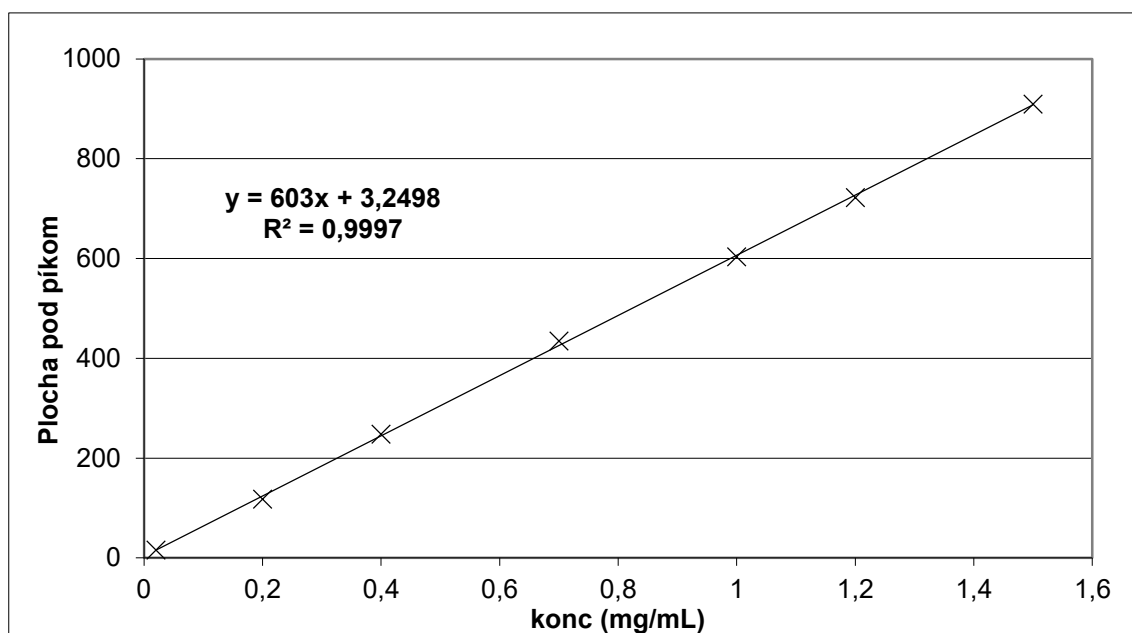
Tabuľka 19 Priemerné namerané hodnoty plôch kalibračných roztokov rebaudiozidu A

Vialka č.	1	2	3	4	5	6	7
c (mg/ml)	0,02	0,2	0,4	0,7	1	1,2	1,5
Priemerná plocha	15,403	117,603	247,674	434,4877	603,533	721,761	909,32

Graf 27 Kalibračná priamka stéviozidu



Graf 28 Kalibračná priamka rebaudiozidu A



Linearita metódy je znázornená graficky a číselne pomocou hodnôt korelačných koeficientov (R^2). Hodnoty korelačných koeficientov sú:

$$R^2_{ST} = 0,9998$$

$$R^2_{RebA} = 0,9997$$

Keďže hodnoty korelačných koeficientov sú vyššie než 0,9990, môžeme potvrdiť, že metóda je pre vzorky SVgly lineárna v koncentračnom rozsahu od 0,02 do 1,5 mg/ml.

5.9.2 Robustnosť

Robustnosť metódy sme overovali analýzou SVgly po zmene chromatografických podmienok (tabuľka 20). Pri meraniach sa menil vždy len jeden parameter a to v oboch smeroch (zníženie aj zvýšenie). Pri každej zmene parametrov sme analyzovali štandardy SVgly s koncentráciou 1,2 mg/ml 3 krát. Vplyv zmien znázorňujeme aj graficky, porovnaním s chromatogramom SVgly za optimálnych a za zmenených podmienok.

Tabuľka 20 Prehľad zmien podmienok separácie pre stanovenie robustnosti

Parameter	zmena
teplota	± 5 °C
prietok MF	± 0,1 ml/min
UV detekcia	± 5 nm
koncentrácia pufru	± 0,01 mol/l
pomer ACN:pufor	± 2 %
pH pufru	± 0,5

Teplota

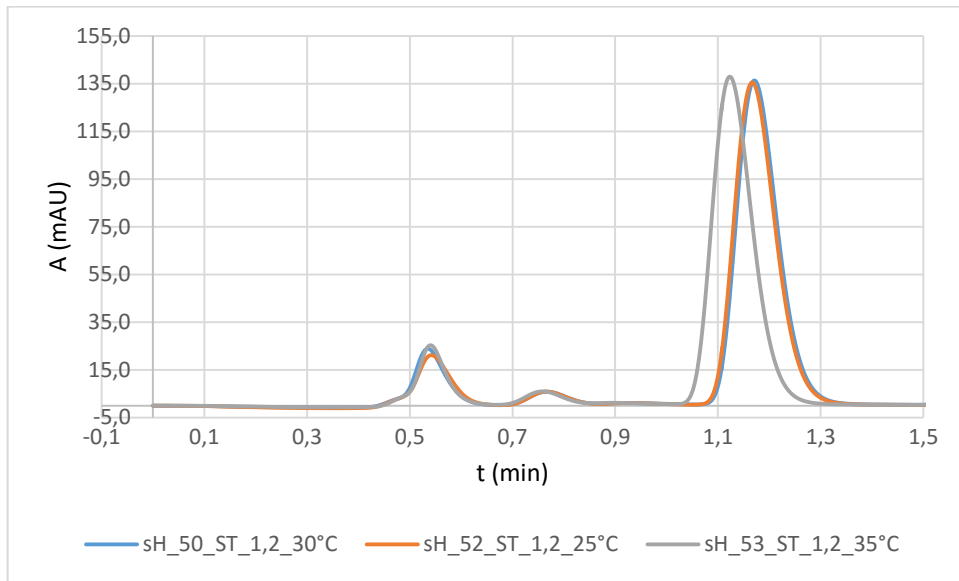
V tabuľke 21 môžeme vidieť, že poloha ST sa pri zmene teploty z pôvodných 30 °C (sH50, modrá) na 25 °C (sH52, oranžová) nemení. Zmena na 35 °C (sH53, sivá) sa prejavila posunutím píku ST vpred. V grafe 30, ktorý zobrazuje vplyv teploty na polohu píku RebA, môžeme vidieť výrazný posun píku RebA dopredu pri 35 °C (sH53, sivá). Mierny posun vpred nastal aj pri teplote 25 °C (sH52, oranžová). Plochy píkov ST aj RebA ostali takmer nezmenené (tabuľka 21).

Tabuľka 21 Robustnosť: vplyv teploty na retenčný čas a plochu píku ST a RebA

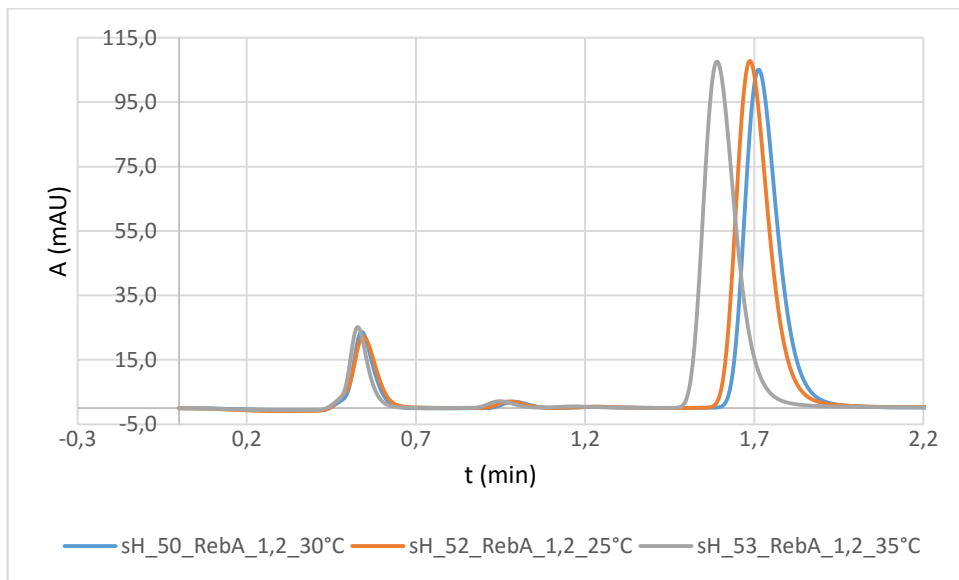
Teplota							
25 °C				35 °C			
ST		RebA		ST		RebA	
priem. plocha	priem. t _r	priem. plocha	priem. t _r	priem. plocha	priem. t _r	priem. plocha	priem. t _r
762	1,17	731	1,34	758	1,12	724	1,59

Retenčné časy SVgly za optimálnych podmienok sú pre ST = 1,14 min a RebA = 1,68 min.

Graf 29 Vplyv teploty na polohu píku stéviozidu



Graf 30 Vplyv teploty na polohu píku RebA



Prietok mobilnej fázy

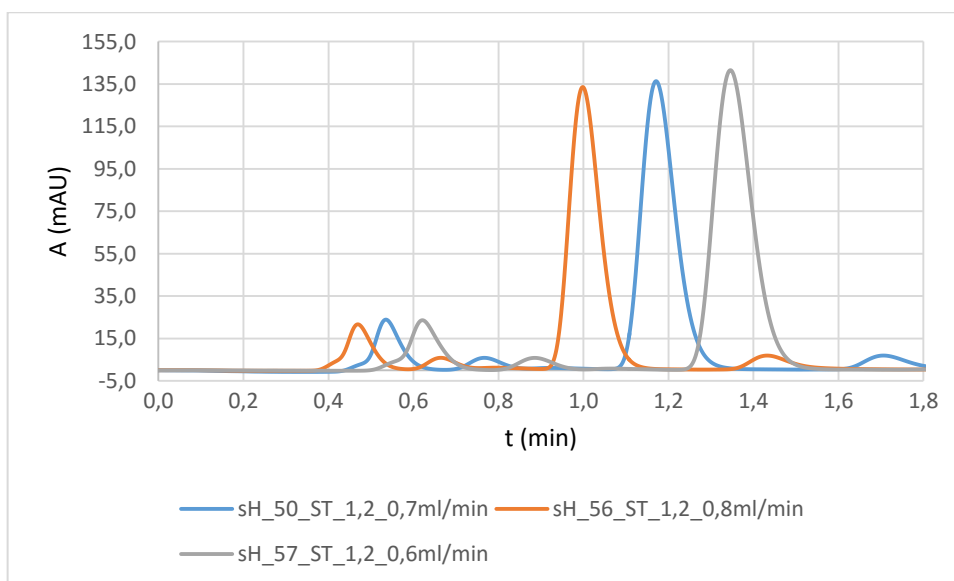
Tabuľka 22 Robustnosť: vplyv prietoku mobilnej fázy na retenčný čas a plochu píku ST a RebA

Prietok MF							
0,6 ml/min				0,8 ml/min			
ST		RebA		ST		RebA	
priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r
889	1,35	843	1,96	667	1,0	637	1,44

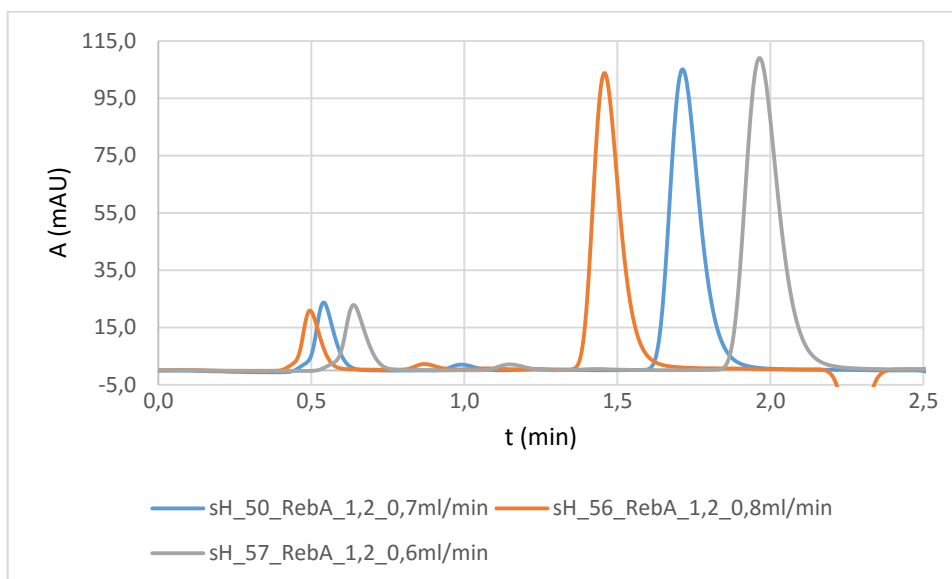
Retenčné časy SVgly za optimálnych podmienok sú pre ST = 1,14 min a RebA = 1,68 min.

Na grafoch č. 31 a 32 je znázornené, že so zvyšovaním rýchlosti prietoku MF sa skracujú retenčné časy ST aj RebA. Zároveň v tabuľke 22 môžeme vidieť, že so zvýšením prietoku na 0,8 ml/min sa znižuje plocha píkov ST aj RebA a len mierny výškový rozdiel medzi píkmí ST (graf 31) a píkmí RebA (graf 32).

Graf 31 Vplyv prietoku mobilnej fázy na polohu píku stéviozidu



Graf 32 Vplyv prietoku mobilnej fázy na polohu píku rebaudiozidu A



Vlnová dĺžka UV detekcie

Tabuľka 23 Robustnosť: vplyv vlnovej dĺžky UV detekcie na retenčný čas a plochu píku ST a RebA

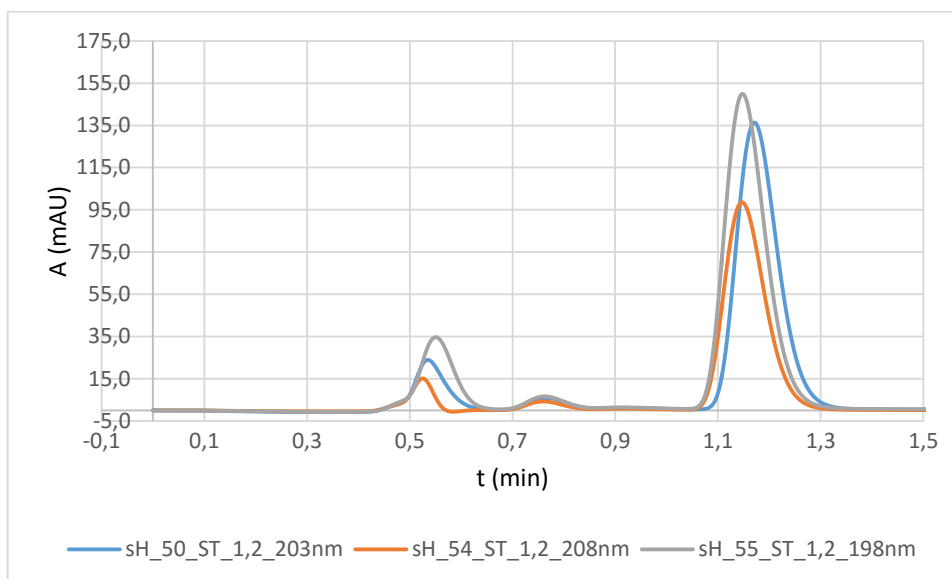
Vlnová dĺžka UV detekcie

198 nm				208 nm			
ST		RebA		ST		RebA	
priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r
832	1,14	795	1,66	546	1,15	520	1,66

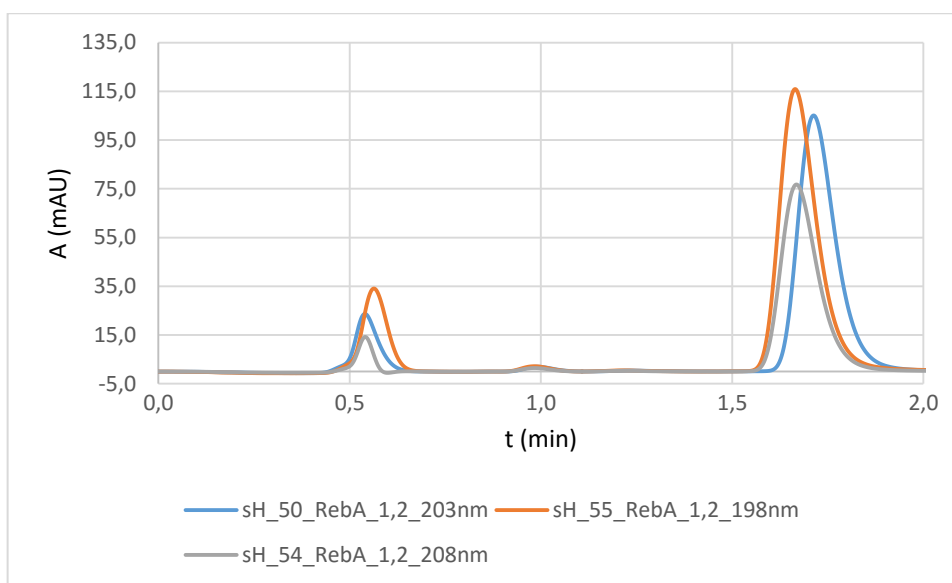
Retenčné časy SVgly za optimálnych podmienok sú pre ST = 1,14 min a RebA = 1,68 min.

V tabuľke 23 môžeme vidieť, že vlnová dĺžka UV detekcie veľkou mierou vplýva na plochy píkov ST aj RebA. Zväčšenie plôch píkov UV detekciou pri 198 nm (graf 33 a graf 34) je spôsobené nízkou špecificitou danej vlnovej dĺžky, kde sa prejavuje absorpcia ACN prípadne pufru. Naopak, UV detekciou pri 208 nm (graf 33 a graf 34) sa plochy píkov znižujú, pretože sa nejedná o špecifickú oblasť absorpcie SVgly ani iný komponent MF. V malej miere dochádza aj ku ovplyvneniu retenčných časov, čo je dôsledok odchýliek v príprave MF.

Graf 33 Vplyv vlnovej dĺžky UV detekcie na polochu píku stéviozidu



Graf 34 Vplyv vlnovej dĺžky UV detekcie na plochu píku rebaudiozidu A



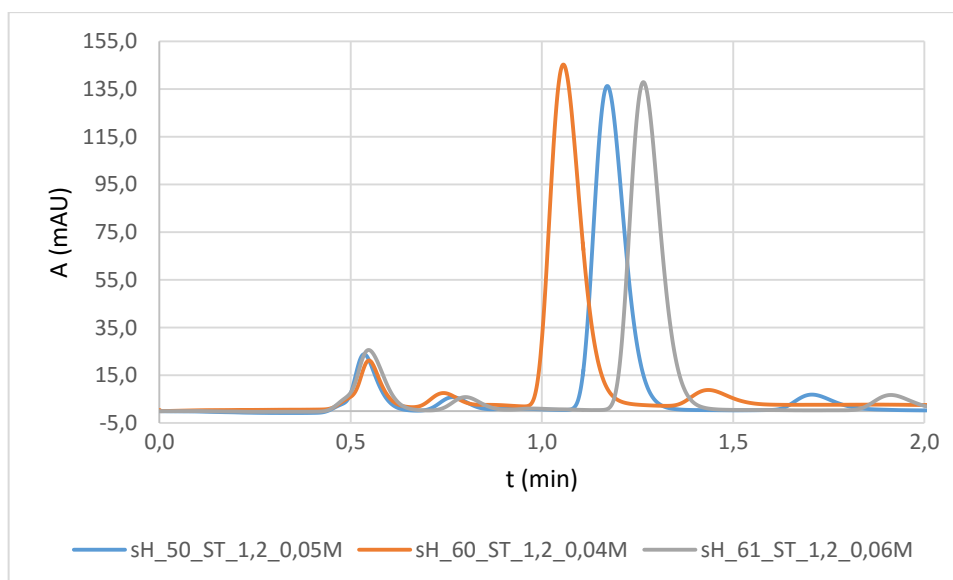
Koncentrácia pufru v mobilnej fáze

Tabuľka 24 Robustnosť: vplyv koncentrácie pufru na retenčný čas a plochu píku ST a RebA

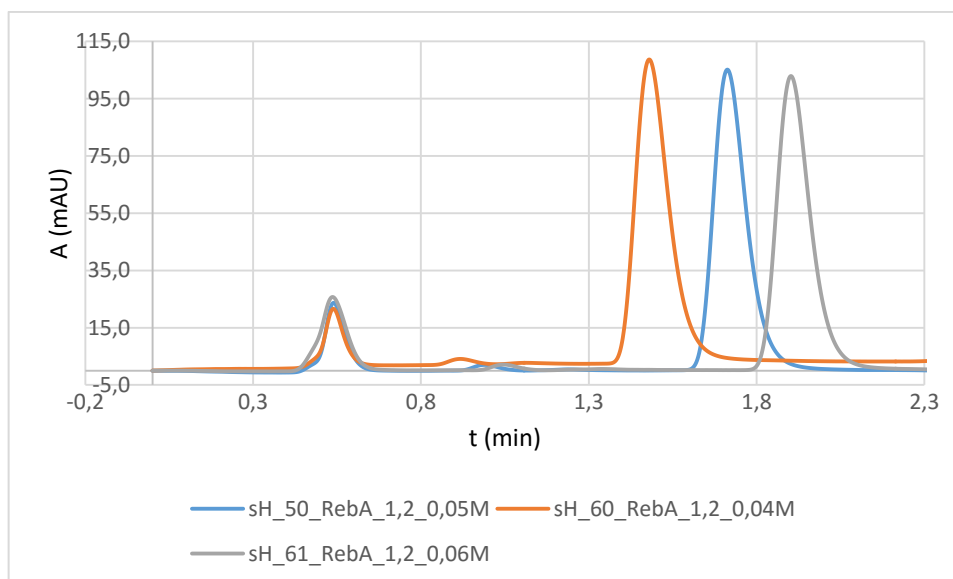
Koncentrácia pufru							
0,04 mol/l				0,06 mol/l			
ST		RebA		ST		RebA	
priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r
812	1,06	744	1,48	782	1,26	711	1,91

Retenčné časy SVgly za optimálnych podmienok sú pre ST = 1,14 min a RebA = 1,68 min.

Graf 35 Vplyv koncentrácie pufru na plochu píku a retenčný čas stéviozidu



Graf 36 Vplyv koncentrácie pufru na plochu píku a retenčný čas rebaudiozidu A



V tabuľke 24 môžeme vidieť, že so stúpajúcou koncentráciou pufru sa znižuje plocha pík ST aj RebA. Zároveň sa so stúpajúcou koncentráciou pufru predlžujú retenčné časy ST (graf 35) a RebA (graf 36). Vyššia koncentrácia pufru vplyva mierne aj na tvar pík, ktoré sú užšie a menej chvostujú.

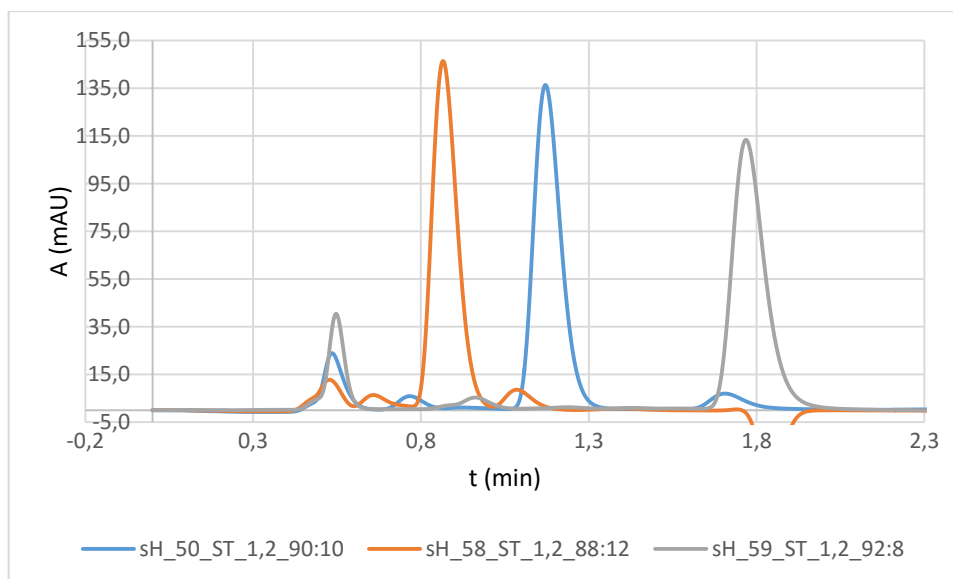
Pomer ACN a pufru v mobilnej fáze

Tabuľka 25 Robustnosť: vplyv pomeru ACN a pufru v mobilnej fáze na retenčný čas a plochu píku ST a RebA

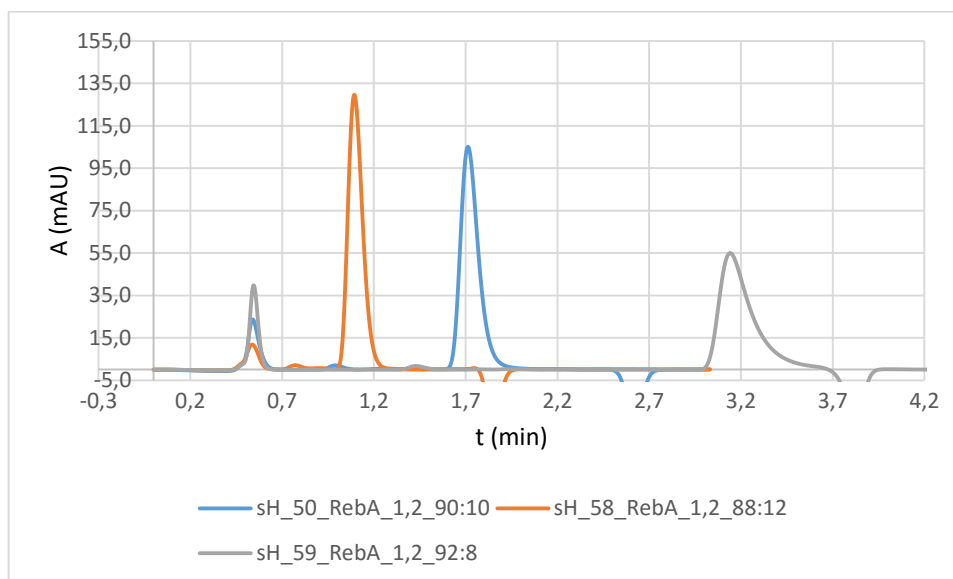
Pomer ACN:pufor							
88:12				92:8			
ST		RebA		ST		RebA	
priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r
749	0,87	723	1,09	767	1,76	706	3,14

Retenčné časy SVgly za optimálnych podmienok sú pre ST = 1,14 min a RebA = 1,68 min.

Graf 37 Vplyv pomeru ACN:pufor na plochu píku a retenčný čas stéviozidu



Graf 38 Vplyv pomeru ACN:pufor na plochu píku a retenčný čas rebaudiozidu A



Zmeny pomeru ACN a pufru vplyvajú predovšetkým na retenčné časy ST a RebA. Plochy píkov sú ovplyvnené len minimálne (tabuľka 25). Pri obsahu ACN 88% sa retenčné časy ST aj RebA skrátia natoľko, že ich píky by sa na základňach mierne prekrývali (graf 37 a graf 38, oranžová). MF s 92% obsahom ACN naopak, deformuje píky (graf 37 a graf 38, sivá).

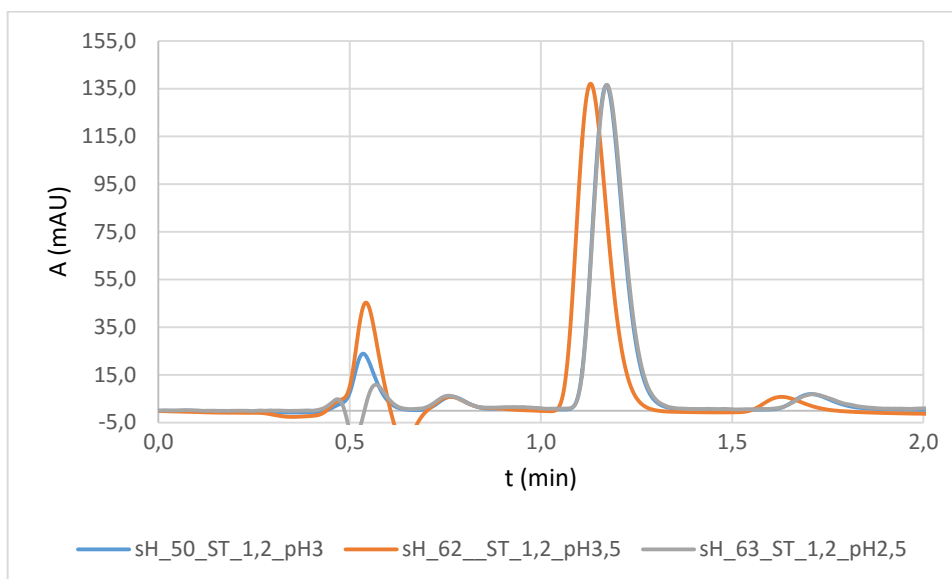
Hodnota pH mobilnej fázy

Tabuľka 26 Robustnosť: vplyv pH pufru mobilnej fázy na retenčný čas a plochu píku ST a RebA

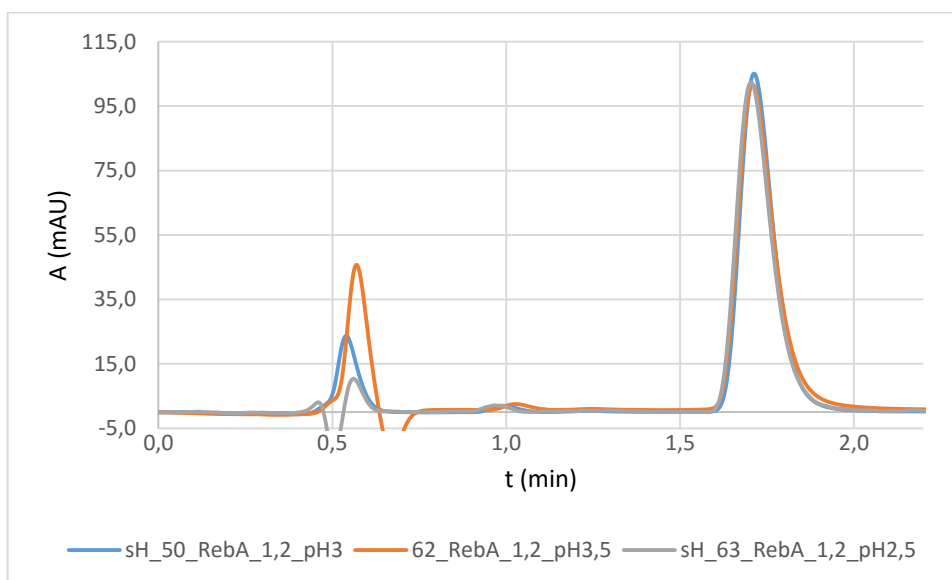
pH mobilnej fázy							
pH=2,5				pH=3,5			
ST		RebA		ST		RebA	
priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r	priem. plocha	priem. t_r
777	1,18	733	1,71	788	1,12	752	1,7

Retenčné časy SVgly za optimálnych podmienok sú pre ST = 1,14 min a RebA = 1,68 min.

Graf 39 Vplyv pH pufru na plochu píku a retenčný čas stéviozidu



Graf 40 Vplyv pH pufru na plochu píku a retenčný čas rebaudiozidu A



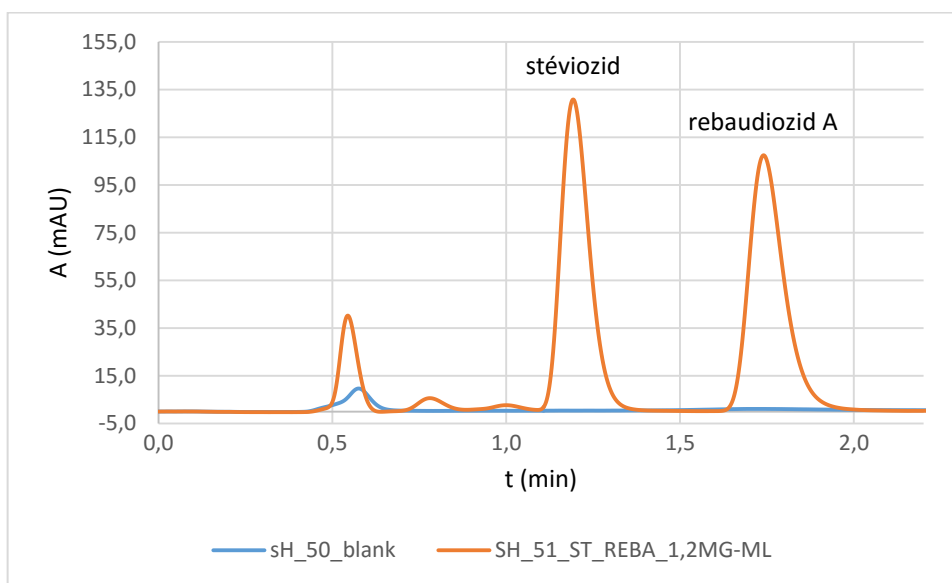
Hodnota pH ovplyvnila retenčný čas ST, a to jeho skrátením pri pH=3,5, pri hodnote pH=2,5 nenastali zmeny (graf 39). Zmeny hodnôt pH neovplyvnili retenčné časy RebA (graf 40). Podľa údajov v Tabuľka 26 môžeme vidieť, že plochy píkov sa významne nemenili.

5.9.3 Selektivita

Selektivitu metódy sme overovali pomocou kombinovaného pracovného štandardu ST a RebA ktorý bol pripravený v prostredí ACN:H₂O 80:20, tak isto ako kalibračné štandardy. Koncentrácia SVgly v štandarde bola 1,2 mg/ml.

Účelom stanovenia selektivity je preukázať, že analytická metóda je schopná správne a špecificky zmerať stanovovanú látku, aj v prítomnosti iných látok.

Graf 41 Preukázanie selektivity pomocou analýzy blanku a kombinovaného pracovného štandardu



Podľa údajov v grafe 41 môžeme vidieť, že vytvorená metóda je selektívna pre ST a RebA, pretože nedochádza ku interferenciám sledovaných analytov v blanku.

5.9.4 Test vhodnosti systému

Počet teoretických priehradok

Počet teoretických priehradok predstavuje účinnosť separačnej metódy, ktorá charakterizuje mieru rozširovania elučných zón separovaných látok. Účinnosť uvádzame ako počet výškových priehradok (N). Výpočet podľa vzorca:

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

5,545 – konštanta

t_R – retenčný čas

w_h – šírka píku v polovici jeho výšky

$$N_{ST} = 5,545 \left(\frac{1,172}{0,09} \right)^2$$

$$N_{ST} = 940$$

$$N_{RebA} = 5,545 \left(\frac{1,713}{0,11} \right)^2$$

$$N_{RebA} = 1344$$

Účinnosť separácie ako počet teoretických priehradok pre ST a RebA s koncentráciou 1,2 mg/ml je:

$$\underline{N_{ST} = 940}$$

$$\underline{N_{RebA} = 1344}$$

Separácia sa považuje za účinnú, keď je počet teoretických priehradok vyšší než 2000.

Rozlíšenie

Rozlíšenie dvoch susedných píkov, ST a RebA v ich kombinovanom štandarde s koncentráciou 1,2 mg/ml, uvádzame ako výpočet zo vzorca:

$$R_{1,2} = 1,18 \cdot \left(\frac{t_{R1} - t_{R2}}{w_{h1} + w_{h2}} \right)$$

t_{R1} a t_{R2} – retenčné časy zložiek

w_{h1} a w_{h2} – šírky píkov zložiek v polovici ich výšky

$$t_{R1} (ST) = 1,193 \text{ min}$$

$$w_{h1} (ST) = 0,09$$

$$t_{R2} (RebA) = 1,740 \text{ min}$$

$$w_{h2} (RebA) = 0,11$$

$$R_{1,2} = 1,18 \cdot \left(\frac{1,740 - 1,193}{0,09 + 0,11} \right)$$

$$R_{1,2} = 3,227$$

Rozlíšenie píkov ST a RebA sme stanovili z ich zmesného pracovného štandardu na základe údajov o retenčných časoch a šírke píkov v polovici ich výšky ako:

$R_{1,2} = 3,227$, čím sme splnili podmienku na úplné rozlíšenie, teda viac ako 1,5.

PRESNOSŤ – Opakovateľnosť – retenčný čas a plocha píku

Opakovateľnosť retenčného času (tabuľka 27) a plochy píku (tabuľka 28) sme zisťovali opakovaným meraním pracovných štandardov ST a RebA 6 krát po sebe. Zvýšené hodnoty smerodajnej odchýlky vyjadrené v percentách, sú zapríčinené tým, že všetky merania neprebehli s MF pripravenou v jednom kroku. Po nameraní 3. opakovania sa pre nedostatok pripravovala nová MF. Aj minimálne rozdiely v navážke mravčanu amónneho zapríčinili, že hodnoty stotín retenčných časov a plôch píkov sa líšia.

Tabuľka 27 Opakovateľnosť retenčných časov stéviozidu a rebaudiozidu A

meranie č.	t_R ST	t_R RebA
1.	1,187	1,712
2.	1,172	1,713
3.	1,187	1,703
4.	1,177	1,732
5.	1,19	1,735
6.	1,195	1,733
priemer	1,184	1,721
SD	0,00855	0,0136
RSD [%]	0,72 %	0,79 %

Tabuľka 28 Opakovateľnosť plôch píkov stéviozidu a rebaudiozidu A

meranie č.	plocha ST	plocha RebA
1.	759,15	717,52
2.	761,91	721,619
3.	760,03	726,144
4.	765,34	733,814
5.	764,016	738,978
6.	762,163	729,92
priemer	762,102	727,99
SD	2,129	7,211
RSD [%]	0,27 %	0,99 %

Výsledné hodnoty opakovateľnosti retenčných časov a plôch píkov ST a RebA vyjadrené ako percento smerodajnej odchýlky sú menšie než 1 %, čím sme splnili požiadavky na opakovateľnosť retenčného času a plochy píku.

Asymetria píkov – faktor chvostovania a faktor asymetrie

Kvalitu chromatografickej separácie môžeme vyjadriť pomocou *faktoru asymetrie píku A* a tiež pomocou *faktoru chvostovania T_f* .

Faktor chvostovania T_f je vyjadrený ako šírka píku v 5 % jeho výšky ku dvojnásobku šírky píku jeho vzostupnej časti.

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

$w_{0,05}$ – šírka píku v 5 % jeho výšky

f – šírka píku v jeho vzostupnej časti

Ffaktor asymetrie A je vyjadrený ako pomer šírky zostupnej časti píku v 10 % jeho výšky, ku vzostupnej časti píku v 10 % jeho výšky.

$$A = \frac{t}{f}$$

t – šírka zostupnej časti píku v 10 % jeho výšky

f – šírka vzostupnej časti píku v 10 % jeho výšky

Tabuľka 29 Faktor chvostovania stéviozidu a rebaudiozidu A

meranie č.	T_f ST	T_f RebA
1.	1,45	1,596
2.	1,45	1,596
3.	1,45	1,596
priemer	1,45	1,596

Tabuľka 30 Faktor asymetrie stéviozidu a rebaudiozidu A

meranie č.	A ST	A RebA
1.	1,26	1,365
2.	1,261	1,365
3.	1,27	1,375
priemer	1,263	1,368

Výsledné hodnoty faktoru chvostovania sú pre ST = 1,45 a pre RebA = 1,596 (tabuľka 29), čím sme splnili podmienku, že faktor chvostovania píkov je menší ako 2. Faktor asymetrie je pre ST = 1,263 a pre RebA = 1,368 (tabuľka 30), čím sme splnili podmienku, že jeho hodnota sa má nachádzať v rozmedzí 0,8 až 1,5.

Retenčný faktor

Retenčný faktor k predstavuje mieru retencie delených látok. Je vyjadrený ako podiel rozdielu retenčného času látky a mŕtveho retenčného času.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

k – retenčný faktor

t_R – retenčný čas

t_0 – mŕtvy retenčný čas

Tabuľka 31 Retenčný faktor stéviozidu a rebaudiozidu A

meranie č.	t_R ST	t_0 ST	t_R RebA	t_0 RebA
1.	1,187	0,550	1,712	0,538
2.	1,172	0,535	1,713	0,54
3.	1,187	0,550	1,703	0,53
priemer	1,182	0,545	1,709	0,536

$$k_{ST} = \frac{1,182 - 0,545}{0,545}$$

$$k_{ST} = 1,168$$

$$k_{RebA} = \frac{1,709 - 0,536}{0,536}$$

$$k_{RebA} = 2,188$$

Hodnoty retenčného faktora pre ST a RebA sme stanovili z priemerných hodnôt retenčných časov a priemerných mŕtvych retenčných časov troch meraní (tabuľka 31). Tieto hodnoty sa dosadili do vrozca pre retenčný faktor a ich výsledné hodnoty sú:

$$\underline{k_{ST} = 1,168}$$

$$\underline{k_{RebA} = 2,188}$$

Hodnota retečného faktoru by sa mala byť väčšia než 2. Tieto podmienky sú splnené len pre RebA.

Limit detekcie a limit kvantifikácie

Limit detekcie (LOD, limit of detection) a limit kvantifikácie (LOQ, limit of quantification) nebolo možné z dôvodu minimálneho šumu detektora odčítať vizuálnou metódou ani metódou pomeru signálu a šumu. Z tohto dôvodu sme pristúpili k tretej novej metóde určenia LOD a LOQ. Metóda je založená na smerodajnej odchýlke hodnôt y-reziduálov z kalibračnej priamky (tabuľka 32 a 33) a hodnoty smernice kalibračnej priamky.

LOD získame ako podiel trojnásobku smerodajnej odchýlky y-reziduálov a smernice kalibračnej priamky.

$$LOD = \frac{3 \cdot SD \sigma}{s}$$

SD σ – smerodajná odchýlka hodnôt y-reziduálov

S – smernica kalibračnej priamky

LOQ získame ako podiel desťnásobku smerodajnej odchýlky y-reziduálov a smernice kalibračnej priamky.

$$LOQ = \frac{10 \cdot SD \sigma}{s}$$

SD σ – smerodajná odchýlka hodnôt y-reziduálov

S – smernica kalibračnej priamky

Tabuľka 32 Hodnoty y-reziduálov pre stéviozid

Vialka č.	1	2	3	4	5	6	7
c (mg/ml)	0,02	0,2	0,4	0,7	1	1,2	1,5
y-reziduály	4,8409	-2,8767	-8,0949	3,4876	5,5879	-0,3486	-2,596
S.D. y-rezid.	4,9579						

$$LOD_{ST} = \frac{3 \cdot 4,9579}{639,49}$$

$$LOD_{ST} = \mathbf{0,023}$$

$$LOQ_{ST} = \frac{10 \cdot 4,9579}{639,49}$$

$$LOQ_{ST} = \mathbf{0,078}$$

Na základe výsledkov výpočtov, je pre ST hodnota LOD = 0,023 mg/ml a hodnota LOQ = 0,078 mg/ml.

Tabuľka 333 Hodnoty y-reziduálov pre rebaudiozid A

Vialka č.	1	2	3	4	5	6	7
c (mg/ml)	0,02	0,2	0,4	0,7	1	1,2	1,5
y-reziduály	0,0939	-6,2455	3,2289	9,1409	-2,7121	-5,0835	1,5803
S.D. y-rezid.	5,3021						

$$LOD_{RebA} = \frac{3 \cdot 5,3021}{639,49}$$

$$LOD_{RebA} = \mathbf{0,026}$$

$$LOQ_{RebA} = \frac{10 \cdot 5,3021}{639,49}$$

$$LOQ_{RebA} = \mathbf{0,088}$$

Na základe výsledkov výpočtov, je pre RebA hodnota LOD = 0,026 mg/ml a hodnota LOQ = 0,088 mg/ml. Zároveň sa hodnoty LOD a LOQ nachádzajú v rozsahu kalibračnej priamky.

6. VÝSLEDKY

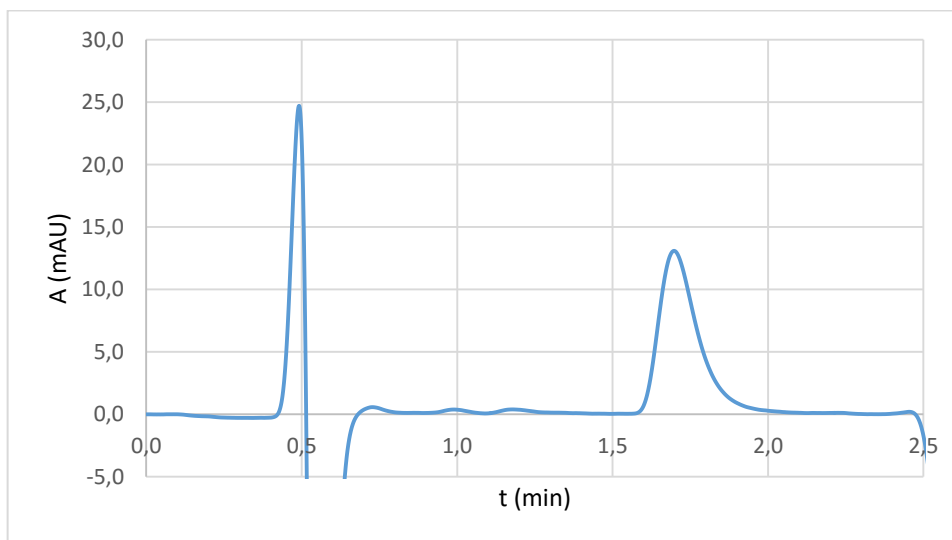
V tejto kapitole sa venujeme analýzam zakúpených komerčne dostupných sladidiel s obsahom SVgly. Analyzované vzorky komerčných sladidiel sa nachádzajú v tabletkovej forme a vo forme roztoku. Súčasťou je aj analýza sušených listov *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Jednotlivé vzorky sme analyzovali pomocou novej HPLC metódy, ktorú sme vytvorili, a zároveň sme tak overili jej použiteľnosť pre analýzu reálnych vzoriek sladidiel prípadne rastlinného materiálu s obsahom SVgly ako je ST a RebA.

6.1 Vzorka č. 1: Stevia, sladidlo so steviolglykozidmi VALOSUN

Výrobca udáva, že jedna tableta sladidla (obrázok 22) (60mg) obsahuje 12 mg 98% RebA. Sladivosť jednej tablety pripravku prirovnáva ku jednej čajovej lyžičke cukru. Bližšie zloženie a obsah plniacich látok nie je na obale uvedený.

Graf 42 Chromatogram analýzy sladidla – vzorka č. 1



Tabuľka 34 Analýza sladidla – vzorka č. 1

meranie č.	t_R RebA	plocha
1.	1,763	116,4
2.	1,775	113,03
3.	1,752	113,28
priemer		114,235

Na základe hodnôt retenčných časov v grafe 42 sme identifikovali sladidlo ako RebA, čo súhlasí aj s uvedením zložením na sladidle. Pre výpočet obsahu RebA v jednej tablete sme použili kalibračnú rovnicu pre RebA, do ktorej sme dosadili priemernú plochu píku sladidla (tabuľka 34) za hodnotu y .

Rovnica kalibračnej priamky pre RebA: $y = 603x + 3,2498$

$$x = \frac{y - 3,2498}{603}$$
$$x = \frac{114,235 - 3,2498}{603}$$
$$x = 0,184 \text{ mg/ml}$$

Dôležité je, že pri analýze vzorky sme z dôvodu nízkej koncentrácie SVgly použili nástrek s objemom 5 μl , na rozdiel od nástreku 1 μl pri tvorbe kalibračnej priamky. Z tohto dôvodu sa musí získaná hodnota x vydeliť piatimi.

$$x = \frac{0,184}{5}$$
$$x = 0,0368 \text{ mg/ml}$$

Taktiež treba zohľadniť, akým spôsobom sa pripravoval zásobný štandard a pracovný štandard sladidla. V tomto prípade sa 1 tableta sladidla rozpúšťala v 10 ml rozpúšťadla so složením ACN:H₂O 80:20, čím vznikol zásobný štandard. Pracovný štandard vznikol zmiešaním 0,3 ml zásob. št. s 2,7 ml ACN a následne sa prefiltroval cez striekačkový filter. To znamená, že koncentrácia SVgly v pracovnom štandarde bola 100 krát nižšia, než ich pôvodný obsah v jednej tablete. Aby sme zistili hodnotu celkového obsahu SVgly v sladidle, premennú x musíme vynásobiť stami.

$$x = 0,0368 \cdot 100$$
$$x = 3,68 \text{ mg}$$

Z výpočtov vyplýva, že obsah sladidla RebA v jednej tablete je 3,68 mg. Stanovený obsah RebA je približne 3,2 krát nižší, než udáva výrobca.

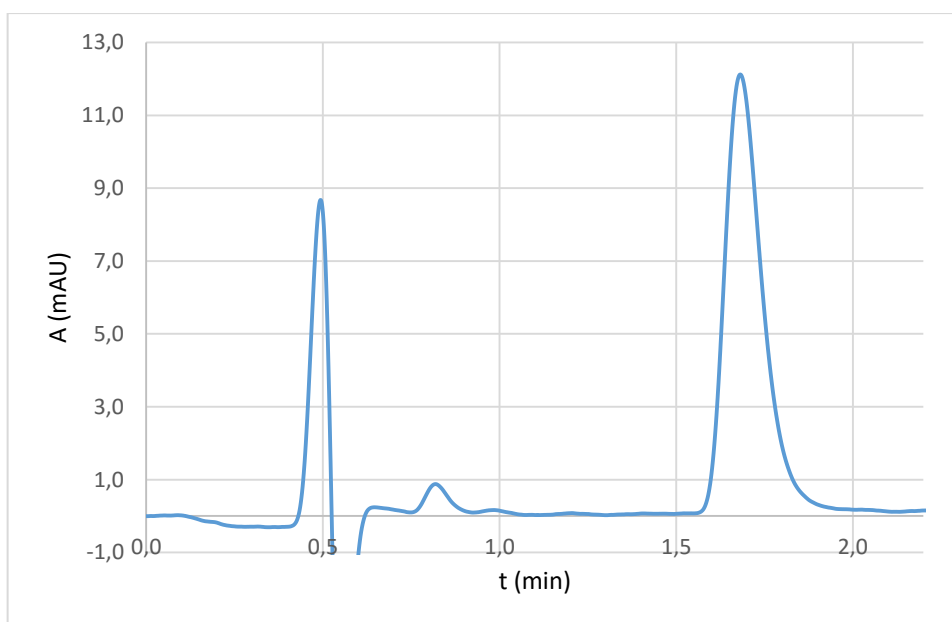


Obrázok 22 Vzorka č. 1

6.2 Vzorka č. 2: SlaDIA, Sukralóza + Stevia, SWISS Pharmaceutical Investment

Výrobca sladidla (obrázok 23) neudáva presný obsah ani typ SVgly, ktoré sa nachádzajú v jednej tablete. Sladivosť jednej tablety prirovnáva k jednej čajovej lyžičke cukru. Hmotnosť jednej tablety je približne 55 mg. V zložení na obale sa uvádza: plnidlo: laktóza; sladidlo: sukralóza, stéviozidy, rebaudiozid; spevňujúca látka: sodná soľ kroskaramelózy; protihrudkujúca látka: stearan horečnatý.

Graf 43 Chromatogram analýzy sladidla – vzorka č. 2



Tabuľka 35 Analýza sladidla – vzorka č. 2

meranie č.	t_R RebA	plocha
1.	1,762	97,429
2.	1,762	95,635
3.	1,75	96,188
priemer		96,417

Na základe hodnôt retenčných časov v grafe 43 sme identifikovali sladidlo ako RebA. Pre výpočet obsahu RebA v jednej tablete sme použili kalibračnú rovnicu pre RebA, do ktorej sme dosadili priemernú plochu píku sladidla (tabuľka 35) za hodnotu y .

Rovnica kalibračnej priamky pre RebA: $y = 603x + 3,2498$

$$x = \frac{y - 3,2498}{603}$$

$$x = \frac{96,417 - 3,2498}{603}$$

$$x = 0,154 \text{ mg/ml}$$

V tomto prípade sme pri analýze vzorky použili nástrek s objemom 1 μl , tak isto ako aj pri tvorbe kalibračnej priamky.

Taktiež sme zohľadnili, akým spôsobom sa pripravoval zásobný štandard a pracovný štandard sladidla. Jedna tableta sladidla sa rozpustila v 10 ml rozpúšťadla so složením ACN:H₂O 90:10, čím vznikol zásobný štandard. Pracovný štandard vznikol prefiltrovaním roztoku zásobného št. cez striekačkový filter. To znamená, že koncentrácia sladidiel v pracovnom štandarde bola len 10 krát nižšia než ich obsah v tablete. Aby sme zistili hodnotu celkového obsahu sladidla v tablete, hodnotu x musíme ešte vynásobiť desiatimi.

$$x = 0,154 \cdot 10$$

$$x = 1,545 \text{ mg}$$

Z výpočtov vyplýva, že obsah sladidla RebA v jednej tablete je 1,545 mg.

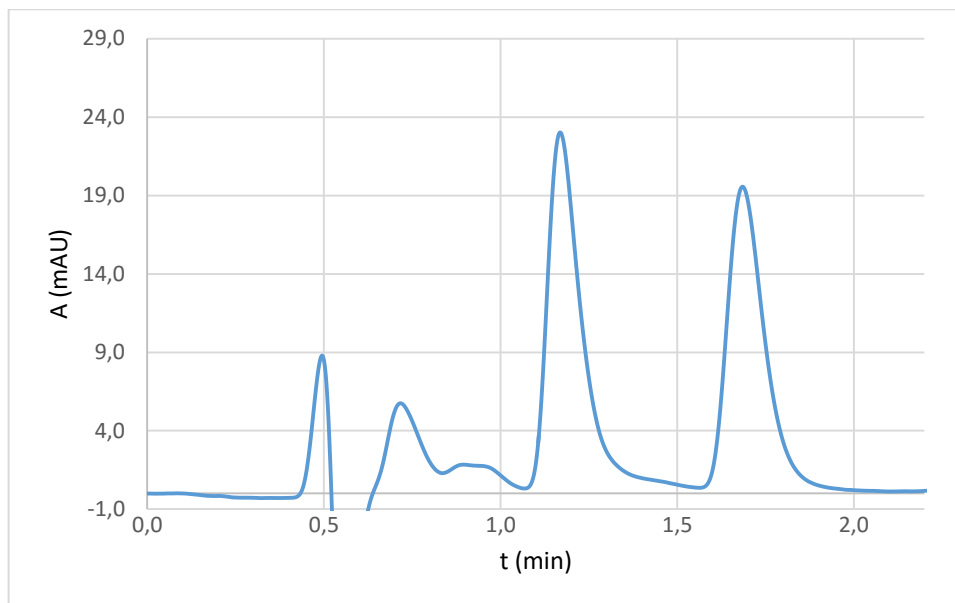


Obrázok 23 Vzorka č. 2

6.3 Vzorka č. 3: Stevia, tekuté sladidlo SOLIA

Výrobca sladidla neudáva presný obsah ani typ SVgly, ktoré sa nachádzajú v tekutom sladidle (obrázok 24). Uvedené zloženie výrobku: glycerín, destilovaná voda, steviolglykozidy.

Graf 44 Chromatogram analýzy sladidla – vzorka č. 3



Tabuľka 36 Analýza sladidla – vzorka č. 3

meranie č.	t_R ST	plocha ST	t_R RebA	Plocha RebA
1.	1,208	151,77	1,76	141,908
2.	1,2	154,86	1,752	143,033
3.	1,208	154,31	1,76	143,353
priemer		153,646		142,764

Na základe hodnôt retenčných časov v grafe 44 sme identifikovali, že vo vzorke sladidla sa nachádza ST aj RebA. Pre výpočet obsahu ST a RebA v 1 ml tekutého sladidla sme použili ich príslušné kalibračné rovnice, do ktorých sme dosadili priemerné plochy pík SVgly (tabuľka 36) za hodnoty y.

Rovnica kalibračnej priamky pre ST: $y = 639,49x - 6,6791$

$$x_{ST} = \frac{y + 6,6791}{639,49}$$
$$x_{ST} = \frac{153,646 + 6,6791}{639,49}$$
$$x_{ST} = 0,250 \text{ mg/ml}$$

Rovnica kalibračnej priamky pre RebA: $y = 603x + 3,2498$

$$x_{RebA} = \frac{y - 3,2498}{603}$$
$$x_{RebA} = \frac{142,764 - 3,2498}{603}$$
$$x_{RebA} = 0,231 \text{ mg/ml}$$

Pri analýze vzorky sme použili nástrek s objemom 1 μl , tak isto ako pri tvorbe kalibračnej priamky.

Je potrebné zohľadniť, akým spôsobom sa pripravoval zásobný štandard a pracovný štandard sladidla. V tomto prípade sa 1 ml tekutého sladidla zmiešal s 10 ml rozpúšťadla so složením ACN:H₂O 80:20, čím vznikol zásobný štandard. Pracovný štandard vznikol zmiešaním 0,3 ml zásob. št. s 2,7 ml ACN a následne sa prefiltraval cez striekačkový filter. To znamená, že koncentrácia sladidiel v pracovnom štandarde bola 100 krát nižšia, než ich obsah vo vzorke tekutého sladidla. Aby sme zistili celkový obsah sladidla v 1 ml vzorky, hodnotu x musíme vynásobiť stoma.

$$x_{ST} = 0,250 \cdot 100$$
$$x_{ST} = 25 \text{ mg/ml}$$

$$x_{RebA} = 0,231 \cdot 100$$
$$x_{RebA} = 23,1 \text{ mg/ml}$$

Obsah ST v tekutom sladidle je 25 mg/ml a obsah RebA je 23,1 mg/ml.

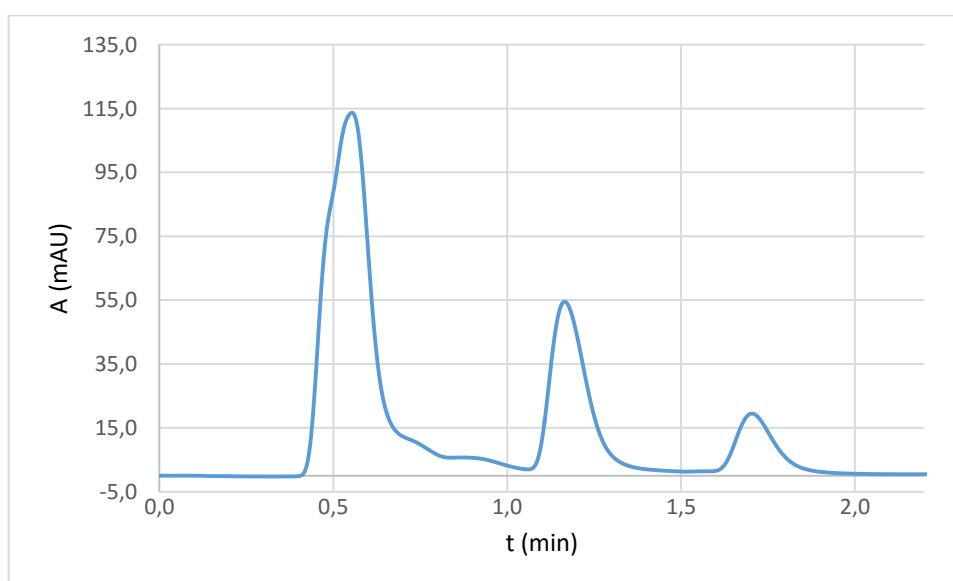


Obrázok 24 Vzorka č. 3

6.4 Vzorka č. 4: Sušené listy stévie, SOLIA

Poslednou a zároveň najnáročnejšou vzorkou na stanovenie obsahu SVgly boli sušené listy *Stevie rebaudiana* (obrázok 25). Podrobný popis postupu extrakcie SVgly zo sušených litov sa nachádza v kapitole 5.6.4. Vzorka sušených listov stévia pochádza z Paraguaja.

Graf 45 Chromatogram analýzy sladidla – vzorka č. 4



Tabuľka 37 Analýza extraktu zo sušených listov stévie – vzorka č. 4

meranie č.	t_R ST	plocha ST	t_R RebA	Plocha RebA
1.	1,175	369,9	1,713	134,975
2.	1,165	374,88	1,703	133,47
3.	1,187	374,06	1,725	134,377
priemer		372,948		134,274

Na základe hodnôt retenčných časov grafe 45 sme identifikovali, že vo vzorke sušených listov stévie sa nachádza ST aj RebA. Pre výpočet obsahu ST a RebA v 1 ml extraktu sme použili ich príslušné rovnice kalibračnej priamky, do ktorých sme dosadili priemerné plochy píkov SVgly (tabuľka 37) za hodnoty y .

Rovnica kalibračnej priamky pre ST: $y = 639,49x - 6,6791$

$$x_{ST} = \frac{y + 6,6791}{639,49}$$
$$x_{ST} = \frac{372,948 + 6,6791}{639,49}$$
$$x_{ST} = 0,594 \text{ mg/ml}$$

Rovnica kalibračnej priamky pre RebA: $y = 603x + 3,2498$

$$x_{RebA} = \frac{y - 3,2498}{603}$$
$$x_{RebA} = \frac{134,274 - 3,2498}{603}$$
$$x_{RebA} = 0,217 \text{ mg/ml}$$

Pri analýze vzorky sme použili nástrek s objemom 5 μ l. Je dôležité zohľadniť, okrem objemu nástreku aj spôsob, akým sa pripravoval extrakt stéviových listov a následne pracovný štandard.

Z prefiltrovaného extraktu sme 1 ml odobrali a podrobili SPE extrakcii. Pri SPE extrakcii sa analyty z dávkovaného 1 ml extraktu eluovali 2 ml roztoku ACN:H₂O (80:20). Následne sa eluovaný extrakt ešte 10 krát riedil deionizovanou vodou. To znamená, že koncentrácia extrahovaných SVgly v pracovnom štandarde bola 20 krát nižšia než ich obsah v primárnom extrakte. Aby sme zistili celkový obsah SVgly v 1 ml primárneho extraktu sušených listov, hodnoty x musíme vynásobiť dvadsiatimi.

$$x_{ST} = \frac{0,594 \cdot 20}{5}$$

$$x_{ST} = 2,376 \text{ mg/ml}$$

$$x_{RebA} = \frac{0,217 \cdot 20}{5}$$

$$x_{RebA} = 0,868 \text{ mg/ml}$$

Extrakt stéviových listov sa pripravoval ich povarením v 20 ml deionizovanej vody. Po varení a filtrácii bol čistý zisk extraktu 15 ml. Celkový obsah SVgly v navážke 1,02 g sušených drvených stéviových listov, vypočítame ako násobok pätnástich z predbežných výsledkov.

$$x_{ST} = 2,376 \cdot 15$$

$$x_{ST} = 35,64 \text{ mg}$$

$$x_{RebA} = 0,875 \cdot 15$$

$$x_{RebA} = 13,02 \text{ mg}$$

Z výpočtov vyplýva, že obsah SVgly v navážke 1,02 g sušených, drvených stéviových listov je 35,64 mg ST a 13,02 mg RebA.



Obrázok 25 Vzorka č. 4

6.5 Výsledky – zhodnotenie

Výsledky jednotlivých analýz obsahu SVgly vo vzorkách komerčných sladidiel a vo vzorke sušenej rastliny *Stevia rebaudiana* sú zhrnuté v tabuľke č. 38.

Vo vzorke č. 1 výrobca udáva, že obsah RebA v jednej tablete je 12 mg. Na základne našej analýzy sme zistili že nameraná hodnota RebA vo vzorke je približne 3,2 krát nižšia, než udáva výrobca.

Vzorky č. 2, č. 3, a č. 4 nemajú výrobcom uvedený obsah SVgly.

Dôležité je poznamenať, že pri príprave pracovných štandardov vzoriek č. 1 až č. 3, sme ako posledný bod úpravy vzorky využili filtráciu striekačkovými filtrami. V prípade vzorky č. 4 bola posledným bodom úpravy vzorky SPE extrakcia. Úlohou SPE extrakcie aj striekačkovej filtrácie bolo odstrániť balastné a nerozpustené látky, ktoré by pri analýze mohli interferovať, prípadne by mohli poškodiť chromatografickú kolónu jej upchatím.

Ani jeden zo spomínaných procesov neprešiel optimalizáciou za účelom maximalizovania výťažku SVgly v predanalytickej fáze. Z tohto dôvodu nevieme určiť, či v prípade vzorky č. 1 výrobca neudáva správny obsah RebA v tablete, alebo je hodnota nášho merania zaťažená stratou analytov pri úprave vzorky v predanalytickej fáze. Rovnako, aj výsledky meraní vo vzorkách č. 2 až č. 4 môžu byť zaťažené stratou analytou pri ich úprave, avšak tieto vzorky nemajú udaný obsah SVgly a teda namerané hodnoty nemáme s čím porovnať.

Tabuľka 38 Výsledky analýz vzoriek

Vzorka	forma	ST	RebA
1	tableta	–	3,68 mg
2	tableta	–	1,545 mg
3	roztok	25 mg/ml	23,1 mg/ml
4	rastlina	35,64 mg/g	13,02 mg/g

Každá z analyzovaných vzoriek obsahovala aspoň jeden typ SVgly. Z komerčne dostupných sladidiel má najvyšší obsah SVgly vzorka č. 3.

7. DISKUSIA

Pri tvorbe novej HPLC metódy na súčasné stanovenie stéviových glykozidov stéviozidu a rebaudiozidu A sme sa pokúsili o ich separáciu v móde reverzných fáz s kolónou Ascentis Express RP-Amide (100×3 mm; 2,7 μm) Supelco s povrchovo poréznymi časticami, a v móde HILIC s kolónou Kinetex 2,6u HILIC 100A (100×2,1 mm; 2,6 μm) Phenomenex, tiež s povrchovo poréznymi časticami. Výber týchto separačných módov je odôvodnený fyzikálno-chemickými vlastnosťami SVgly a tiež na základe informácií publikovaných prác, ktoré sa zaoberajú problematikou separácie SVgly. Použitím kolón s povrchovo poréznymi časticami sme očakávali vysokú separačnú účinnosť SVgly, ktoré sa všeobecne považujú za obtiažne separovateľné z dôvodu podobnosti ich štruktúr.

Ako prvú sme testovali kolónu Ascentis Express 100x3 mm; 2,7 μm pracujúcu v móde RP–HPLC. Sledovali sme schopnosť delenia pracovných štandardov SVgly s MF zloženou z ACN a vody v pomeroch 80:20 až 30:70. So zvyšovaním obsahu ACN sa skracoval retenčný čas analytov. Maximálny dosiahnutý rozdiel retenčných časov SVgly predstavoval 0,1 minúty, čo neumožnilo separáciu. Z tohto dôvodu ďalšia testovaná MF obsahovala rozpúšťadlo s nižšou elučnou silou. MF sa skladala z MeOH a vody v pomere 30:70 až 50:50. Zvyšovaním obsahu MeOH v MF sa retenčný čas analytov skracoval, naopak, pri znížení obsahu MeOH pod 50 % nedochádzalo k elúcii analytov. Maximálny dosiahnutý rozdiel retenčných časov predstavoval 0,4 minúty, čo stále nepostačovalo na účinnú separáciu.

Ako ďalšiu možnosť ovplyvnenia selektivity MF sme použili pufohydrogénfosforečnanu amónneho s kyselinou citrónovou v rôznych pomeroch s MeOH. Testovali sme MF s pufrom v rôznych koncentráciách, s rôznymi hodnotami pH a v rôznom pomere s MeOH. Prítomnosť pufru a jeho vyšších koncentrácií zvýšila retenciu analytov. Vplyv pH na retenciu analytov bol len mierny, znižovaním pH sa retenčný čas predlžoval. Pri zložení MF 60:40 z MeOH a pufru pH=3 (0,1 M Na₂HPO₄/0,05 M kys. cit.) (séria S45) sme prvýkrát na chromatografickom zázname analýzy ST pracovného štandardu pozorovali rozdelovanie píku ST. Predpokladali sme, že v zakúpenom analytickom štandarde stéviozidu sa vyskytuje prímes rebaudiozidu A, pretože výrobca negarantoval obsah ST a prítomnosť iných látok v analytickom štandarde. Túto teóriu podporoval aj fakt, že analýza pracovného štandardu RebA, poskytovala pík v rovnakom čase ako 2. pík z pracovného štandardu ST. To znamená, že sme píky v ST štandarde identifikovali ako: 1. ST a 2. RebA. Pokračovali sme preto v optimalizácii podmienok separácie menšími zmenami v pomere zložiek MF, rýchlosti prietoku MF, teploty kolóny, objemu nástreku a vlnovej dĺžky UV detekcie. V sérii S58 sme pripravovali nové, koncentrovanejšie zásobné štandardy a z nich koncentrovanejšie pracovné štandardy ST a RebA. Chromatografický záznam analýzy nového

pracovného štandardu ST už poskytoval len jeden pík. Pík eluoval v rovnakom čase, ako pík RebA z pracovného štandardu RebA. Na základe týchto skutočností sme zistili, že zásobný štandardný roztok bol kontaminovaný neznámou látkou, ktorú sme chybné identifikovali ako ST, zatiaľ, čo skutočný ST (2. pík) eluoval v rovnakom čase ako pracovný štandard RebA. K deleniu SVgly teda v skutočnosti nedochádzalo.

S novými pracovnými štandardmi SVgly sme preto pokračovali v hľadaní optimálnych podmienok separácie. Separácia s použitím danej kolóny a zložením MF nebola možná. Ani prídavok pufru nedokázal dostatočne ovplyvniť selektivitu stanovenia SVgly. Najlepšie možné podmienky separácie, i keď len čiastočnej, sa dosiahli v sérii S73 s: MF 45:55 pre MeOH:pufr s pH=3 (0,1 M Na₂HPO₄/0,05 M kys. cit.), rýchlosťou prietoku MF 0,5 ml/min, teplotou kolóny 30 °C, vlnovou dĺžkou UV detekcie 223 nm, objemom nástreku 5 µl a pracovným tlakom na kolóne 25,4 MPa.

Ako druhú sme testovali kolónou Kinetex 2,6u HILIC 100A (100×2,1 mm; 2,6 µm) Phenomenex pracujúcou v móde HILIC. Elučné poradie SVgly ostalo nezmenené, 1. eluoval ST, 2. RebA. Používané pracovné štandardy sme pripravili v prostredí s obsahom 80 % ACN, aby sa predišlo strate účinnosti separácie. Sledovali sme schopnosť delenia pracovných štandardov SVgly rôznymi typmi MF.

Prvý testovaný typ MF pozostával z ACN a vody v pomere 80:20 až 95:5. Keďže sa jedná o mód HILIC, platilo, že so zvyšovaním obsahu polárnejšieho rozpúšťadla (voda) v MF sa analýza skracovala. Najlepšie podmienky separácie SVgly sa dosiahli s MF v pomere 92:8 pre ACN:voda (séria sH06), kde k rozdeleniu SVgly dochádzalo na základnej línii, avšak píky chvostovali. Separácie s vyšším obsahom ACN v MF neboli vyhovujúce, pretože k elúcii SVgly dochádzalo príliš pomaly a píky neúmerne chvostovali a zmenšovali sa, takže odčítanie plochy pod píkom bolo čím ďalej tým ťažšie. Pre ďalšie sledovanie vplyvu selektivity MF na delenie SVgly bolo potrebné použiť MF s obsahom pufru. Na základe preštudovania publikácií zaoberajúcich sa separáciou SVgly v móde HILIC, sa objavovalo použitie pufru octanu amónneho s kyselinou octovou, avšak omnoho častejšie sa vyskytovalo použitie pufru mravčanu amónneho s kyselinou mravčou.

V tom čase sme mali potrebné chemikálie len na prípravu octanového pufru. Navyše octan amónny bol značne zvlhnutý, takže jeho navážky by nezodpovedali reálnej koncentrácii v MF. Preto sme sa rozhodli použiť tento typ pufru len na overenie tvrdení publikovaných prác iných autorov, kedy práve použitím pufru dosahujú potrebnú účinnosť stanovenia. V prípade, že pufr bude pôsobiť priaznivo, zaobstaráme potrebné chemikálie na prípravu pufru mravčanu amónneho.

Testovanie MF s pufrom 0,01 M octanu amónneho s kyselinou octovou prebiehalo s hodnotami pH=3 a pH=6. v pomere 80:20 až 95:5. Prítomnosť pufru predĺžila retenčné časy SVgly približne o 0,6 minúty, v porovnaní s MF bez pufru. Taktiež platilo, že znížením pH pufru sa skrátili retenčné časy SVgly. Delenie SVgly sme

mohli pozorovať až MF s 85 % ACN, naopak, pri obsahu ACN 95 % boli SVgly síce rozdelené, avšak piliš chvovali. Porovaním chromatografických záznamov analýz sme zistili, že najlepšie separačné podmienky predstavuje MF s pH=3 v pomere 90:10 pre ACN:pufor. Rozlíšenie píkov SVgly analyzovaných s MF s pH=6 bolo v porovnaní s píkmi analyzovanými pri pH=3 síce väčšie, ale vhodnejší tvar píkovo, kratší čas analýzy a stále dostačujúce rozlíšenie poskytovala MF s pH=3.

Ďalšími analýzami sme teda pokračovali MF v pomere 90:10 a pH=3 a zamerali sme sa na optimalizáciu prietoku MF a teploty kolóny, čím sme predpokladali ďalšie zlepšenie parametrov píkovo. Najväčší vplyv na optimalizáciu mala zmena rýchlosti prietoku MF. Vplyv teploty na parametre píkovo bol v porovnaní s vplyvom na životnosť kolóny zanedbateľný. Na základe porovania chromatogramov sa najlepšie podmienky dosahli v sérii sH25 s: MF 90:10 pre ACN:pufor pH 3 s 0,01 M octanom amónnym s kyselinou octovou, rýchlosťou prietoku MF 0,8 ml/min, teplotou kolóny 30 °C, vlnovou dĺžkou detekcie 210 nm, objemom nástreku 1 µl a pracovným tlakom kolóny 22,3 MPa. Retenčný čas ST 0,84 min, RebA 1,1 min.

V hľadaní optimálnych separačných podmienok sme pokračovali s MF s pufrom z mravčanu amónneho a kyseliny mravčej. Testovali sme koncentrácie pufru 0,01 M, 0,02 M a 0,05 M s hodnotou pH=3. K deleniu SVgly dochádzalo tak, ako sme predpokladali, najlepšie s MF v pomere 90:10 pre ACN:pufor. Potrebovali sme ďalej zlepšiť parametre píkovo a preto sme skúšali kombinácie vyšších prietokov MF s vyššou teplotou kolóny. Avšak, nízka koncentrácia pufru spôsobovala, že za daných podmienok dochádzalo až k zlievaniu píkovo. Preto, sme ďalšie analýzy testovali MF s vyššou koncentráciou pufru, ktorá síce predĺži retenčné časy, ale pri použití vyšších prietokov umožní dosiahnuť lepšie parametre píkovo bez ich zlievania.

MF s koncentráciou pufru 0,02 M a pH=3 sme si overili, že píky sa pri vyšších rýchlosťach nezlievajú a že zvýšenie koncentrácie pufru sa prejavuje predĺžením retenčných časov SVgly, dokonca, vplyv koncentrácie pufru na retenčný čas RebA je väčší než na retenčný čas ST.

S optimalizáciou sme pokračovali MF s koncentráciou pufru 0,05 M a pH=3. Delenie SVgly prebiehalo s MF v pomere 90:10 pre ACN: pufor, následne sme postupne zvyšovali rýchlosť prietoku MF až na 0,7 ml/min, čím sa dosiahla lepšia symetria píkovo. Túto analýzu sme opakovali s MF, ktorú sme manuálne namiešali do odmerného valca. Lepšia homogenizácia zložiek MF sa prejavila stabilnejšou základnou líniou a lepšou opakovateľnosťou analýz. Rovnakým spôsobom sme testovali aj MF s obsahom ACN 91 %, keďže zmenou je len zvýšenie ACN o 1 %, manuálna príprava bola výhodnejšia. V tomto prípade zmena o 1% okrem predĺženia retenčných časov spôsobila aj miernu stratu signálu a zhoršenie symetrie píkovo SVgly. Tieto analýzy potvrdili, že najvhodnejšou voľbou bude MF so zložením 90:10 pre ACN:pufor s pH=3 a koncentráciou 0,05 M , prietokom 0,7 ml/min a o teplotou 30 °C. Taktiež, nižšie objemy

nástrekov poskytovali lepšiu symetriu píkov. Najlepšie je použiť objem 1 μ l. V poslednom kroku sme optimalizovali vlnovú dĺžku detekcie premeraním absorpčných spektier SVgly. Na základe výsledkov, je najvhodnejšia detekcia pri 203 nm.

Tým sme získali finálne podmienky separácie SVgly na kolóne Kinetex: MF v pomere 90:10 pre ACN:pufor 0,05 M mravčanu amónneho okysleného kys. mravčou na pH=3, prietok MF 0,7 ml/min, teplota kolóny 30 °C, vlnová dĺžka UV detekcie 203 nm a tlak kolóny 19,8 MPa. Retenčný čas ST= 1,17 min a RebA= 1,68 min.

V experimentálnej časti sme ďalej previedli validáciu novej HPLC metódy. Linearitu metódy sme stanovili z koncentrácií 0,02; 0,2; 0,4; 0,7; 1; 1,2; a 1,5 mg/ml SVgly a z hodnôt priemerov troch meraní každej koncentrácie. Závislosť koncentrácie na ploche píku sme vyjadrili metódou lineárnej regresie. Korelačný koeficient pre ST=0,9998 a pre RebA=0,9997 potvrdzuje, že metóda je v danom koncentračnom rozsahu lineárna.

Robustnosť metódy sme overili zmenami separačných podmienok. K ovplyvneniu separácie dochádzalo znížením teploty kolóny na 25 °C. Zvyšovaním rýchlosti prietoku MF sa okrem skrátenia retenčných časov znížil aj signál detekcie SVgly. Veľký význam zohráva vlnová dĺžka UV detekcie, kedy jej znížením na 198 nm stúpa signál SVgly z dôvodu nešpecifickej absorpcie UV žiarenia MF. Zvýšením vlnovej dĺžky na 208 nm naopak, klesá signál, pretože daná oblasť nie je pre SVgly špecifická. Zmena koncentrácie pufru ovplyvňuje predovšetkým retenčný čas SVgly a v menšej miere vplýva aj na plochy píkov. Zvýšením koncentrácie sa plocha píkov zväčšila. Pomer ACN:pufor spôsobuje okrem zmeny retenčných časov, ktoré sa s vyšším podielom ACN predlžujú aj zmeny parametrov píkov, ktoré sú vyššie a užšie. Pri obsahu ACN 88 % sa pík ST posúva bližšie k mŕtvemu retenčnému objemu a pík RebA výrazne chvostuje. Zmena hodnoty pH MF na 2,5 sa blíži k spodnej hranici rozsahu pH, v ktorom je kolóna použiteľná. Pri hodnote pH=3,5 sa retenčný čas ST skracuje.

Selektivitu metódy sme overili porovnaním chromatogramov blanku a kombinovaného pracovného štandardu ST a Reba. Z porovnania vyplynulo, že nedochádza ku interferenciám so sledovanými analytmi v roztoku blanku.

Test vhodnosti systému sme overili zistením počtu teoretických priehradok, ktorých počet by pre účinnú separáciu nemal byť nižší než 2000. Počet teoretických priehradok pre ST je 940 a pre RebA 1344, čo znamená, že separácia nie je dostatočne účinná. Rozlíšenie píkov ST a RebA by malo byť najmenej 1,5, čo sa nám s hodnotou 3,227 podarilo splniť. Presnosť metódy sme stanovili ako mieru opakovateľnosti retenčných časov a plôch píkov ST a RebA z ich priemernej hodnoty zo šiestich opakovaní. V oboch prípadoch je percento SD menšie než 1 %. Tým sme splnili požiadavky na opakovateľnosť. Asymetriu píkov vyjadrujeme ako faktor chvostovania, ktorého hodnoty pre ST a RebA sú menšie ako 2, a ako faktor asymetrie, ktorého hodnoty pre ST a RebA sú medzi 0,8 až 1,5. Retenčný faktor analytov má nadobúdať hodnoty vyššie ako 2. Túto požiadavku spĺňa ReA s hodnotami 2,188, a nespĺňa ST s hodnotami

1,168. LOD a LOQ SVgly sa nachádza v koncentračnom rozsahu kalibračnej priamky. Hodnoty LOD sú pre ST=0,023 mg/ml a pre RebA=0,026 mg/ml. Hodnoty LOQ sú pre ST=0,078 mg/ml a pre RebA=0,088 mg/ml.

Použitelnosť/aplikovateľnosť vytvorenej metódy sme overili na vzorke komerčne dostupných sladidiel s obsahom SVgly a na extrakte zo sušených listov stévie. Je potrebné poznamenať, že spôsob prípravy a extrakcie jednotlivých vzoriek nebol optimalizovaný. Namerané plochy pík ST a RebA sme pomocou rovnice kalibračnej priamky prepočítali na mg/ml. Následne sme prvotné výsledky ešte prepočítali v závislosti od použitého objemu nástreku pri ich analýze a od rôznych riedení v dôsledku prípravy vzorky. Vo vzorke č. 1 VALOSUN bol deklarovaný obsah SVgly 12 mg/tableta 98% RebA. Na základe našich meraní sa potvrdila prítomnosť RebA, avšak jeho obsah bol približne 3,2 krát nižší, konkrétne 3,68 mg/tableta. Vo vzorke č. 2 SlaDIA výrobca neudáva množstvo ani typ použitých SVgly. Podľa výsledkov našich meraní obsahujú tablety RebA v množstve 1,545 mg/tableta a žiadny ST. Komerčná vzorka č. 3 SOLIA bola ako jediná v kvapalnej forme, znova nebolo uvedené aké množstvo a typ SVgly obsahuje. Z výsledkov meraní vyplýva, že v sladidle sa nachádza 25 mg/ml ST a 23,1 mg/ml RebA. Vzorka č. 4 extrakt získaný z 1,02 g sušených listov stévie obsahoval 35,64 mg ST a 13,02 mg RebA.

Spomedzi testovaných komerčných sladidiel je z pohľadu obsahu SVgly najlepšia vzorka č. 3 SOLIA.

Vytvorená HPLC metóda umožňuje rýchlu analýzu komerčne používaných stéviových glykozidov ST a RebA v jednoduchých vzorkách do 2,2 minúty. Množstvo spotrebovanej MF na jednu analýzu je len 1,4 ml. Znížením nárokov na spotrebu rozpúšťadiel v mobilnej fáze sa výrazne znižujú finančné náklady na analýzu. Avšak, metóda nespĺňa potrebné parametre pre počet teoretických priehradok a taktiež hodnotu retenčného faktora pre ST. Preto nie je možné využiť metódu na komerčné účely.

8. ZÁVER

Cieľom práce bolo vytvorenie novej HPLC metódy na stanovenie hlavných stéviových glykozidov stéviozidu a rebaudiozidu A a následné overenie jej využitia v praxi, analýzou komerčne dostupných sladidiel s obsahom stéviových glykozidov a extraktu zo stéviových listov.

Pôvodným zámerom bolo vytvoriť metódu s použitím kolóny Ascentis Express RP-Amide (100×3 mm; 2,7 μm) Supelco pracujúcej v móde reverzných fáz. Pri tvorbe metódy sme testovali niekoľko typov mobilných fáz, ktoré pozostávali z rôznych pomerov acetonitrilu a vody, metanolu a vody, metanolu a rôznych koncentrácií a hodnôt pH hydrogénfosforečnanového pufru s kyselinou citrónovou. Testované zmeny separačných parametrov neumožnili potrebnú separáciu stéviových glykozidov s požadovanými parametrami. Preto sme v tvorbe metódy pokračovali s kolónou Kinetex 2,6u HILIC 100A (100×2,1 mm; 2,6 μm) Phenomenex pracujúcou v móde HILIC. Testované mobilné fázy pozostávali z rôzneho pomeru acetonitrilu a vody, acetonitrilu a rôzneho pomeru a hodnôt pH pufru octanu amónneho s kyselinou octovou, acetonitrilu a rôzneho pomeru a hodnôt pH pufru mravčanu amónneho s kyselinou mravčou. Úspešnú separáciu sme dosiahli práve s treťou sponínanou kombináciou. V optimalizácii sme pokračovali voľbou rýchlosti prietoku mobilnej fázy, teploty kolóny a vlnovej dĺžky UV detektora. Najlepšie podmienky separácie stéviozidu a rebaudiozidu A sa dosiahli za podmienok s mobilnou fázou v pomere 90:10 pre acetonitril a pufo mravčanu amónneho s koncentráciou 0,05 M upraveného kyselinou mravčou na pH=3, rýchlosťou prietoku mobilnej fázy 0,7 ml/min, teplotou kolóny 30 °C, vlnovou dĺžkou detekcie 203 nm a pracovným tlakom kolóny 19,8 MPa.

Validáciu novej HPLC metódy sme previedli na základe výsledkov tvorby kalibračnej priamky a hodnôt korelačných koeficientov, overením robustnosti metódy zmenou teploty, rýchlosti prietoku mobilnej fázy, vlnovej dĺžky UV detekcie, koncentrácie pufru, pomeru acetonitrilu a pufru a zmenou pH pufru. Ďalej overením selektivity metódy a testom vhodnosti systému, ktorý pozostáva zo stanovenia počtu teoretických priehradok, rozlíšenia, opakovateľnosti retenčných časov a plôch pík, faktoru chvostovania, faktoru asymetrie, retenčného faktoru, limitu detekcie a kvantifikácie.

V poslednej časti práce sme vyvinutú HPLC metódu testovali na vzorkách sladidiel VALOSUN, SlaDIA, SOLIA a sušených listov stévie. Vzorky sladidiel sa pripravili rozpustením ich tabliet alebo roztoku v prostredí s podobným zložením ako mobilná fáza a následnou filtráciou. Vzorka extraktu zo sušených listov sa pripravila extrakciou horúcou vodou a následnou SPE extrakciou. Keďže išlo len o overenie použitia metódy v praxi, bližšie podmienky prípravy vzoriek a extrakcie listov stévie

neboli optimalizované. Získané výsledky analýz mohli byť len v jednom prípade porovnané s obsahom stéviových glykozidov deklarovaných výrobcom na obale sladidla.

9. POUŽITÉ SKRATKY

2D-LC	dvojdimenziálna kvapalinová chromatografia
ACN	acetonitril
C ⁴ D	bezkontaktný kondukčný detektor
CAD	detektor nabitého aerosólu
CE	kapilárna elektroforéza
CPPS	copalyl difosfát syntáza
CZE	kapilárna zónová elektroforéza
DAD	detektor diódového poľa
DCC	kvapková protiprúdna chromatografia
EFSA	Európsky úrad pre bezpečnosť potravín
ELSD	evaporative light scattering detector
ESI	elektrónová ionizácia
FAO	Organizácia spojených národov pre výživu a poľnohospodárstvo
FTIR	Fourierova transformačná infračervená spektroskopia
GC	plynová chromatografia
GGDP	geranylgeranyl difosfát
HILIC	hydrofilná interakčná chromatografia
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HPTLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia na tenkej vrstve
JECFA	Spoločný výbor expertov pre potravinové aditíva
KAH	hydroxylázy kyseliny ent-kaurenovej
KO	ent-kaurenová oxidáza
KS	ent-kaurenová syntáza
LLE	extrakcia kvapalina-kvapalina
LOD	limit detekcie
LOQ	limit kvantifikácie
MEKC	micelárna elektrokinetická chromatografia
MeOH	metanol
MF	mobilná fáza
MS	hmotnostná spektrometria
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
NP	normálne fázy
PAD	pulzný ampérometrický detektor
PFE	vysokotlačná extrakcia rozpúšťadlom
RebA	rebaudiozid A
RP	reverzná fáza

SDS	dodecylsulfát sodný
SF	stacionárna fáza
SFE	superkritická fluidná extrakcia
SIM	selektívny záznam jedného alebo viacerých iónov
SIR	selektívny záznam reakcie
SPE	extrakcia tuhou fázou
ST	stéviozid
SVgly	stéviové glykozidy
TOF	detektor času letu
UGTs	glykozyltransferázy
UHPLC	ultra vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia

10. ZOZNAM TABULIEK

TABUĽKA 1 MEDICÍNSKE VYUŽITIE JEDNOTLIVÝCH DRUHOV STÉVIE, MODIFIKOVANÉ POĎĽA [9].....	18
TABUĽKA 2 PREĤĽAD A POROVNANIE METÓD EXTRAKCIE SVGLY ZO SUŠENÝCH LISTOV S. REBAUDIANA, MODIFIKOVANÉ POĎĽA [9]	20
TABUĽKA 3 POROVNANIE ČASTO POUŽÍVANÝCH DĽŽOK KOLÓN S NIEKOĽKÝMI TYPMI ČASTÍC A ICH TYPICKÝM POČTOM TEORETICKÝCH PRIEHRADOK, MODIFIKOVANÉ POĎĽA [80].....	32
TABUĽKA 4 POUŽITÉ MOBILNÉ FÁZY S OBSAHOM ACN A H ₂ O	51
TABUĽKA 5 POUŽITÉ MOBILNÉ FÁZY S OBSAHOM MEOH A H ₂ O.....	52
TABUĽKA 6 HĽADANIE OPTIMÁLNEHO ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY 1.....	53
TABUĽKA 7 HĽADANIE OPTIMÁLNEHO ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY 2.....	54
TABUĽKA 8 HĽADANIE OPTIMÁLNEHO ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY 3.....	54
TABUĽKA 9 HĽADANIE OPTIMÁLNEHO ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY 4.....	54
TABUĽKA 10 HĽADANIE OPTIMÁLNEHO ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY 5.....	56
TABUĽKA 11 HĽADANIE OPTIMÁLNEHO ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY Z ACN A VODY	58
TABUĽKA 12 HĽADANIE OPTIMÁLNEHO ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY Z ACN A PUFRU OCTANU AMÓNNEHO S KYSELINOU OCTOVOU	60
TABUĽKA 13 HĽADANIE OPTIMÁLNEHO ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY S OBSAHOM 0,01 MOL/L PUFRU MRAVČANU AMÓNNEHO A KYSELINY MRAVČEJ.....	64
TABUĽKA 14 HĽADANIE OPTIMÁLNEHO ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY S OBSAHOM 0,02 MOL/L PUFRU MRAVČANU AMÓNNEHO OKYSLENÉHO KYSELINOU MRVAČOU	66
TABUĽKA 15 HĽADANIE OPTIMÁLNEHO ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY S OBSAHOM 0,05 M PUFRU MRAVČANU AMÓNNEHO OKYSLENÉHO KYSELINOU MRAVČOU.....	68
TABUĽKA 16 VPLYV ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY A JEJ RÝCHLOSTI PRIETOKU NA HODNOTY PREVÁDZKOVÝCH TLAKOV KOLÓNY	71
TABUĽKA 17 PRÍPRAVA KALIBRAČNÝCH ŠTANDARDOV	75
TABUĽKA 18 PRIEMERNÉ NAMERANÉ HODNOTY PLÔCH KALIBRAČNÝCH ROZTOKOV STÉVIOZIDU	75
TABUĽKA 19 PRIEMERNÉ NAMERANÉ HODNOTY PLÔCH KALIBRAČNÝCH ROZTOKOV REBAUDIOZIDU A.....	75
TABUĽKA 20 PREĤĽAD ZMIEN PODMIENOK SEPARÁCIE PRE STANOVENIE ROBUSTNOSTI	77
TABUĽKA 21 ROBUSTNOSŤ: VPLYV TEPLoty NA RETENČNÝ ČAS A PLOCHU PÍKU ST A REBA.....	77
TABUĽKA 22 ROBUSTNOSŤ: VPLYV PRIETOKU MOBILNEJ FÁZY NA RETENČNÝ ČAS A PLOCHU PÍKU ST A REBA	79
TABUĽKA 23 ROBUSTNOSŤ: VPLYV VLNOVEJ DĽŽKY UV DETEKcie NA RETENČNÝ ČAS A PLOCHU PÍKU ST A REBA	80
TABUĽKA 24 ROBUSTNOSŤ: VPLYV KONCENTRÁCIE PUFRU NA RETENČNÝ ČAS A PLOCHU PÍKU ST A REBA	82
TABUĽKA 25 ROBUSTNOSŤ: VPLYV POMERU ACN A PUFRU V MOBILNEJ FÁZE NA RETENČNÝ ČAS A PLOCHU PÍKU ST A REBA.....	83
TABUĽKA 26 ROBUSTNOSŤ: VPLYV PH PUFRU MOBILNEJ FÁZY NA RETENČNÝ ČAS A PLOCHU PÍKU ST A REBA	84
TABUĽKA 27 OPAKOVATEĽNOSŤ RETENČNÝCH ČASOV STÉVIOZIDU A REBAUDIOZIDU A	88
TABUĽKA 28 OPAKOVATEĽNOSŤ PLÔCH PÍKOV STÉVIOZIDU A REBAUDIOZIDU A.....	88
TABUĽKA 29 FAKTOR CHVOSTOVANIA STÉVIOZIDU A REBAUDIOZIDU A.....	89

TABUĽKA 30 FAKTOR ASYMETRIE STÉVIOZIDU A REBAUDIOZIDU A	89
TABUĽKA 31 RETENČNÝ FAKTOR STÉVIOZIDU A REBAUDIOZIDU A	90
TABUĽKA 32 HODNOTY Y-REZIDUÁLOV PRE STÉVIOZID	91
TABUĽKA 33 HODNOTY Y-REZIDUÁLOV PRE REBAUDIOZID A.....	92
TABUĽKA 34 ANALÝZA SLADIDLA – VZORKA Č. 1	93
TABUĽKA 35 ANALÝZA SLADIDLA – VZORKA Č. 2	96
TABUĽKA 36 ANALÝZA SLADIDLA – VZORKA Č. 3	98
TABUĽKA 37 ANALÝZA EXTRAKTU ZO SUŠENÝCH LISTOV STÉVIE – VZORKA Č. 4.....	101
TABUĽKA 38 VÝSLEDKY ANALÝZ VZORIEK	103

11. ZOZNAM OBRÁZKOV

OBRÁZOK 1 <i>STEVIA REBAUDIANA</i> BERTONI [8]	11
OBRÁZOK 2 MIESTA JUŽNEJ AMERIKY, KDE <i>S. REBAUDIANA</i> RASTIE SPONTÁNNE [9].....	12
OBRÁZOK 3 OBLASTI SVETA, V KTORÝCH SA <i>S. REBAUDIANA</i> PESTUJE MIMO SVOJICH PRIRODZENÝCH PODMIENOK [9]	12
OBRÁZOK 4 SUBSTITUENTY STEVIOLU NACHÁDZAJÚCE SA V EXTRAKTE <i>S.</i> <i>REBAUDIANA</i> [9].....	14
OBRÁZOK 5 STEVIOL, ZÁKLADNÁ ŠTRUKTÚRA SVGLY [27].....	15
OBRÁZOK 6 KYSELINA ENT-KAURENOVÁ [28]	15
OBRÁZOK 7 BIOSYNTÉZA STÉVIOVÝCH GLYKOZIDOV [31].....	16
OBRÁZOK 8 STEVIOZID, ŠTRUKTÚRNY VZOREC [33]	16
OBRÁZOK 9 REBAUDIOZID A, ŠTRUKTÚRNY VZOREC [35].....	17
OBRÁZOK 10 ROZŠIROVANIE ELUČNEJ ZÓNY V KOLÓNE S PLNE PORÉZNYMI A POVRCHOVO PORÉZNYMI ČASTICAMI [82]	31
OBRÁZOK 11 POROVNANIE VPLYVU ČLENOV VAN DEEMTEROVEJ TEÓRIE NA SEPARÁCIU S PLNE PORÉZNYMI (V ĽAVO) A POVRCHOVO PORÉZNYMI (V PRAVO) ČASTICAMI [82].....	32
OBRÁZOK 12 POROVNANIE VPLYVU PRIETOKU MOBILNEJ FÁZY NA ÚČINNOSŤ KOLÓN S RÔZNYMI ČASTICAMI A NA ZVYŠOVANIE SPÄTNÉHO TLAKU [80]	33
OBRÁZOK 13 MIKROSKOPICKÝ POHĽAD NA PRIEREZ POVRCHOVO PORÉZNEJ (V ĽAVO) A PLNE PORÉZNEJ ČASTICE (V PRAVO) [82]	34
OBRÁZOK 14 POROVNANIE ŠTRUKTÚRY POVRCHOVO (V ĽAVO) A PLNE PORÉZNYCH ČASTÍC (V PRAVO) [80].....	34
OBRÁZOK 15 PROCES TVORBY STACIONÁRNEJ FÁZY NAVIAZANÍM AMIDU NA POVRCH SILIKAGÉLU V JEDNOM KROKU [80]	34
OBRÁZOK 16 HILIC KOMBINUJE CHAREKTERISTIKY REVERZNÝCH FÁZ, NORMÁLNÝCH FÁZ A IÓNOVÝMENNEJ CHROMATOGRAFIE [90]	36
OBRÁZOK 17 ADSORPCIA VODY NA POVRCH POLÁRNEJ STACIONÁRNEJ FÁZY A VZNIK MOBILNEJ FÁZY OCHUDOBNEJ O VODNÚ ZLOŽKU [106].....	39
OBRÁZOK 18 SCHÉMA SEPARAČNÉHO MECHANIZMU HILIC [120]	41
OBRÁZOK 19 SCHÉMA SEPARAČNÉHO MECHANIZMU A TVORBA IMOBILIZOVANEJ VODNEJ VRSTVY S GRADIENTOM [90].....	41
OBRÁZOK 20 TVORBA PREBYTKU MF NA POVRCHU STACIONÁRNEJ FÁZY A JEHO ZLOŽENIE; [121].....	42
OBRÁZOK 21 MODEL ELEKTRICKEJ DVOJVRSTVY NA POVRCHU STACIONÁRNEJ FÁZY S NAVIAZANÝM LIGANDOM [90].....	44
OBRÁZOK 22 VZORKA Č.1	95
OBRÁZOK 23 VZORKA Č.2	97
OBRÁZOK 24 VZORKA Č. 3.....	100
OBRÁZOK 25 VZORKA Č. 4.....	102

12. ZOZNAM GRAFOV

GRAF 1 POROVNANIE DELENIA PÔVODNÉHO PRACOVNÉHO ŠTANDARDU (MODRÁ) A NOVO PRIPRAVENÉHO KONCENTROVANEJŠIEHO PRACOVNÉHO ŠTANDARDU (ORANŽOVÁ) BEZ DELENIA	55
GRAF 2 CHROMATOGRAM NOVÉHO PRACOVNÉHO ŠTANDARDU ST A PRACOVNÉHO ŠTANDARDU REBA BEZ ROZDELENIA.....	55
GRAF 3 POROVNANIE DELENIA A RETENČNÝCH ČASOV EXRAKTU ZO STÉVIE (ZELENÁ), PÔVODNÉHO (MODRÁ) A NOVÉHO (ORANŽOVÁ) PRACOVNÉHO ŠTANDARDU STÉVIOZIDU	56
GRAF 4 VPLYV ZLOŽENIA MOBILNEJ FÁZY NA DELENIE SVGLY V S71, S72 A S73	57
GRAF 5 VPLYV ZMENY PRIETOKU MOBILNEJ FÁZY NA ROZLIŠENIE SVGLY V SÉRIÁCH SH03 A SH04	58
GRAF 6 VPLYV ZNÍŽENIA OBSAHU VODY V MOBILNEJ FÁZE NA TVAR PÍKOV SVGLY	59
GRAF 7 NAJLEPŠIA DOSIAHNUTÁ SEPARAČNÁ SCHOPNOSŤ MF Z ACN A VODY NA SVGLY	59
GRAF 8 CHVOSTOVANIE PÍKU PRI ZVÝŠENÍ OBSAHU ACN V MF NA 95 %.....	61
GRAF 9 VPLYV PH NA RETENČNÉ ČASY, SH09 PH= 6, SH13 PH= 3.....	61
GRAF 10 VPLYVU RÝCHLOSTI PRIETOKU MF NA RÝCHLOSŤ ANALÝZY, SH14 V = 0,4 ML/MIN, SH15 V = 0,45 ML/MIN, SH16 V = 0,5 ML/MIN	62
GRAF 11 VPLYV ZMENY TEPLoty NA RÝCHLOSŤ ANALÝZY, ZMENA Z 30°C (SH16) NA 35°C (SH17).....	62
GRAF 12 POROVNANIE ANALÝZ SH25 (30 °C) A SH26 (40 °C), KTORÉ SA LÍŠIA IBA TEPLotOU KOLÓNY	63
GRAF 13 POROVNANIE ANALÝZ SH22, SH23 A SH24, KTORÉ SA LÍŠIA PRIETOKOM MOBILNEJ FÁZY O 0,1 ML/MIN.....	63
GRAF 14 VPLYV ZVYŠOVANIA OBSAHU ACN V MOBILNEJ FÁZE NA DELENIE ST A REBA.....	65
GRAF 15 VPLYV ZMENY TEPLoty NA ROZLIŠENIE SVGLY V KOMBINOVANOM PRACOVNOM ŠTANDARDE ST A REBA	65
GRAF 16 VPLYV PRIETOKU MF NA ROZLIŠENIE A CHVOSTOVANIE PÍKOV SVGLY	66
GRAF 17 POROVNANIE VPLYVU KONCENTRÁCIE PUFRU 0,01 MOL/L (SH30) A 0,02 MOL/L (SH36) NA RETEČNÝ ČAS, ROZLIŠENIE A PARAMETRE PÍKOV KOMBINOVANÉHO PRACOVNÉHO ŠTANDARDU SVGLY.....	67
GRAF 18 VPLYV ZMENY RÝCHLOSTI MF NA ANALÝZU SVGLY S KONCENTRÁCIou PUFRU 0,05 MOL/L	68
GRAF 19 VPLYV ZMENY PRIETOKU MF S 91% OBSAHOM ACN NA TVAR A RETENČNÉ ČASY PÍKOV	69
GRAF 20 POROVNANIE ANALÝZ SVGLY S MOBILNOU FÁZOU ACN:PUFOR 90:10 A 91:9	69
GRAF 21 VPLYV OBJEMU NÁSTREKU 15 µL A 1 µL NA TVAR PÍKOV SVGLY	70
GRAF 22 VPLYV OBJEMU NÁSTREKU 5 µL A 1 µL NA TVAR PÍKOV SVGLY	71
GRAF 23 ABSORPČNÁ KRIVKA MOBILNEJ FÁZY	72
GRAF 24 ABSORPČNÁ KRIVKA STÉVIOZIDU	72
GRAF 25 ABSORPČNÁ KRIVKA REBAUDIOZIDU A.....	73
GRAF 26 POROVNANIE VPLYVU VLNOVEJ DÍŽKY DETEKcie PRI 203 A 210 NM NA CITLIVOSŤ ANALÝZY	73
GRAF 27 KALIBRAČNÁ PRIAMKA STÉVIOZIDU	76
GRAF 28 KALIBRAČNÁ PRIAMKA REBAUDIOZIDU A	76
GRAF 29 VPLYV TEPLoty NA POLOHU PÍKU STÉVIOZIDU	78
GRAF 30 VPLYV TEPLoty NA POLOHU PÍKU REBA	78
GRAF 31 VPLYV PRIETOKU MOBILNEJ FÁZY NA POLOHU PÍKU STÉVIOZIDU	79

GRAF 32 VPLYV PRIETOKU MOBILNEJ FÁZY NA POLOHU PÍKU REBAUDIOZIDU A.....	80
GRAF 33 VPLYV VLNOVEJ DĹŽKY UV DETEKČIE NA POLOCHU PÍKU STÉVIOZIDU.....	81
GRAF 34 VPLYV VLNOVEJ DĹŽKY UV DETEKČIE NA PLOCHU PÍKU REBAUDIOZIDU A	81
GRAF 35 VPLYV KONCENTRÁCIE PUFRU NA PLOCHU PÍKU A RETENČNÝ ČAS STÉVIOZIDU	82
GRAF 36 VPLYV KONCENTRÁCIE PUFRU NA PLOCHU PÍKU A RETENČNÝ ČAS REBAUDIOZIDU A.....	82
GRAF 37 VPLYV POMERU ACN:PUFOR NA PLOCHU PÍKU A RETENČNÝ ČAS STÉVIOZIDU	83
GRAF 38 VPLYV POMERU ACN:PUFOR NA PLOCHU PÍKU A RETENČNÝ ČAS REBAUDIOZIDU A.....	84
GRAF 39 VPLYV PH PUFRU NA PLOCHU PÍKU A RETENČNÝ ČAS STÉVIOZIDU	85
GRAF 40 VPLYV PH PUFRU NA PLOCHU PÍKU A RETENČNÝ ČAS REBAUDIOZIDU A	85
GRAF 41 PREUKÁZANIE SELEKTIVITY POMOCOU ANALÝZY BLANKU A KOMBINOVANÉHO PRACOVNÉHO ŠTANDARDU	86
GRAF 42 CHROMATOGRAM ANALÝZY SLADIDLA- VZORKA Č. 1.....	93
GRAF 43 CHROMATOGRAM ANALÝZY SLADIDLA- VZORKA Č. 2.....	96
GRAF 44 CHROMATOGRAM ANALÝZY SLADIDLA- VZORKA Č. 3.....	98
GRAF 45 CHROMATOGRAM ANALÝZY SLADIDLA- VZORKA Č. 4.....	100

13. POUŽITÁ LEITERATÚRA

- 1) BRIDEL, M., LAVIEILLE, R.: Le principe a saveur sucre du Kaa-He-e (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *J. Pharm. Chim.* 1931, 14, 99, 154, 161, 321, 369. Dostupné na: <http://chimie.these.free.fr/CHIMTHE%20083.htm>
- 2) SOEJARTO, DD., COMPADRE, CM., MEDON, PJ., KAMATH, SK., KINGHORN, AD.: Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Econom. Bot.* 1983, 37, 71-79. Dostupné na: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02859308>
- 3) MOHD-RADZMAN, NH., ISMAIL, WIW., ADAM, Z., JAAPAR, SS., ADAM, A.: Potential roles of *Stevia rebaudiana* Bertoni in abrogating insulin resistance and diabetes: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* [online]. 2013, 2013, 1-10 [cit. 2016-10-18]. DOI: 10.1155/2013/718049. ISSN 1741-427x. Dostupné na: <http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/718049/>
- 4) HAJIHASHEMI, S., GEUNS, JMC.: Gene transcription and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* under polyethylene glycol-induced drought stress in greenhouse cultivation. *FEBS Open Bio* [online]. 2016, 6(9), 937-944 [cit. 2016-10-19]. DOI: 10.1002/2211-5463.12099. ISSN 22115463. Dostupné na: <http://doi.wiley.com/10.1002/2211-5463.12099>
- 5) ZIMMERMANN, BF.: Tandem mass spectrometric fragmentation patterns of known and new steviol glycosides with structure proposals. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011. 25(23), 3657-3658
- 6) OHTA, M., SASA, S., INOUE, A., TAMAI, T., FUJITA, I., MORITA, K., MATSUURA, F.: Characterization of novel steviol glycosides from leaves of *Stevia rebaudiana* Morita. *Journal of Applied Glycoscience* [online]. 2010, 57(3), 199-209 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.5458/jag.57.199. ISSN 1344-7882. Dostupné na: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jag/57.199?from=CrossRef>
- 7) MORLOCK, GE., MEYER, S., ZIMMERMANN, BF., ROUSSEL, JM.: High-performance thin-layer chromatography analysis of steviol glycosides in *Stevia* formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, 1350, 102-111 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.05.016. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967314007523>
- 8) *Stevia- the plant. Sweet Green Fields* [online]. [cit. 2016-10-30]. Dostupné na: <https://sweetgreenfields.com/our-story/about-stevia/>
- 9) FERRAZZANO, G, TIZIANA, C, ALCIDI, B., CODA, M., INGENITO, A., ZARRELLI, A., DI FABIO, G., POLLIO, A.: Is *Stevia rebaudiana* Bertoni a non

- cariogenic sweetener? A Review. *Molecules* [online]. 2016, 21(1), 38- [cit. 2016-10-18]. DOI: 10.3390/molecules21010038. ISSN 1420-3049. Dostupné na: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/1/38>
- 10) Stévia sladká. Herbár [online]. [cit. 2016-10-30]. Dostupné na: <http://www.herbar.org/liccive-rastliny/rastlina/stevia-sladka/>
 - 11) BARBET-MASSIN C., GIULIANO, S., ALLETTO, L., DAYDÉ, J., BERGER, M.: Nitrogen limitation alters biomass production but enhances steviol glycoside concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *PLoS ONE*, 2015, 10(7): e0133067. doi:10.1371/journal.pone.0133067
 - 12) Stévia cukrová. Wikipedia [online]. 2015 [cit. 2016-10-30]. Dostupné na: https://sk.wikipedia.org/wiki/St%C3%A9via_cukrov%C3%A1
 - 13) VAN EYK, AD.: The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug and Chemical Toxicology* [online]. 2014, **38**(3), 318-327 [cit. 2016-12-18]. DOI: 10.3109/01480545.2014.966381. ISSN 0148-0545. Dostupné na: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/01480545.2014.966381>
 - 14) TAKAYAMA, S., THORGEIRSSON, UP., ADAMSON, RH.: Chemical carcinogenesis studies in nonhuman primates. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and Biological Sciences*. 2008;84(6):176-188. doi:10.2183/pjab/84.176.
 - 15) ANDREATTA, MM., MUÑOZ, SE., LANTIERI, MJ., EYNARD, AR., NAVARRO, A.: Artificial sweetener consumption and urinary tract tumors in Cordoba, Argentina. *Preventive Medicine* [online]. 2008, **47**(1), 136-139 [cit. 2016-12-18]. DOI: 10.1016/j.ypmed.2008.03.015. ISSN 00917435. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091743508001576>
 - 16) GASMALLA, MAA., YANG, R., HUA, Y.: Extraction of rebaudioside-A by sonication from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf and decolorization of the extract by polymers. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2015, 52(9), 5946-5953 [cit. 2016-10-19]. DOI: 10.1007/s13197-015-1717-3. ISSN 0022-1155. Dostupné na: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-015-1717-3>
 - 17) KUMAR, RD., OOMMEN, OV.: *Stevia rebaudiana* Bertoni does not produce female reproductive toxic effect: Study in Swiss albino mouse. *J. Endocrinol Reprod*. 2008, 12: 57-60.
 - 18) GEUNS, JMC.: Safety of stevia and stevioside. *Recent Res. Dev. Phytochem*. 2000, 4, 75-88. Dostupné na: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14197077>
 - 19) JURKOVÁ, M., OLŠOVSKÁ, J.: Determination of rebaudioside A in mixed beer, beer-based beverages and lemonades. *Kvasny Prumysl* [online]. 2015-9-1, 61(9),

- 262-267 [cit. 2016-10-19]. DOI: 10.18832/kp2015025. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2015025.html>
- 20) Additional information about high-intensity sweeteners permitted for use in food in the United States. U.S. Food and Drug Administration. [online], [citované 29.1.2017]. Dostupné na: http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm397725.htm#Steviol_glycosides
- 21) SABARI, D., SUMAN, V., SNEHALATA, NIBHRITI, D., Srivastava, LM.: Correlation between total antioxidant status and lipid peroxidation in hypercholesterolemia. *Current Science*. 2000, 78(4). Dostupné na: https://www.researchgate.net/profile/Lalit_Mohan_Srivastava/publication/237603040_Correlation_between_total_antioxidant_status_and_lipid_peroxidation_in_hypercholesterolemia/links/00b495389a3d22710b000000.pdf
- 22) YADAV, AK., SINGH, S., DHYANI, D., AHUJA, PS.: A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science* [online]. 2011, 91(1), 1-27 [cit. 2017-01-29]. DOI: 10.4141/cjps10086. ISSN 0008-4220. Dostupné na: <http://pubs.aic.ca/doi/abs/10.4141/cjps10086>
- 23) PRAKASH CHATURVEDULA, VS., PRAKASH. I.: A new diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Molecules* [online]. 2011, 16(12), 2937-2943 [cit. 2017-02-01]. DOI: 10.3390/molecules16042937. ISSN 1420-3049. Dostupné na: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/4/2937/>
- 24) HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Laboratorní metody [online]. [cit. 2016-10-29]. Dostupné z: <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>
- 25) Zloženie a porovnanie sladivosti. Stévia [online]. [cit. 2016-10-29]. Dostupné z: <http://www.stevia.eu.sk/sladivost-steviozid-rebaudiozid>
- 26) YU, X., YANG, J., WANG, E., LI, B., YUAN, H.: Effects of growth stage and fulvic acid on the diversity and dynamics of endophytic bacterial community in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, 6, - [cit. 2016-10-19]. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00867. ISSN 1664-302x. Dostupné na: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00867/abstract>
- 27) STEVIOSID [online]. [cit. 2016-10-29]. Dostupné z: <http://www3.hhu.de/biodidaktik/Blattgewuerze/german/chemie/steviosid.html>
- 28) LIZARTE NETO, FS., TIRAPELLI, DPC., AMBROSIO, SR., TIRAPELLI, CR., OLIVEIRA, FM.: Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. 2013, (1) [cit. 2016-10-29]. ISSN 1414-431X. Dostupné na: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2013000100071

- 29) KUMAR, H., KAUL, K., BAJPAI-GUPTA, S., KAUL, VK., KUMAR, S.: A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene* [online]. 2012, **492**(1), 276-284 [cit. 2017-01-29]. DOI: 10.1016/j.gene.2011.10.015. ISSN 03781119. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111911005920>
- 30) BRANDLE, JE., TELMER, PG.: Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* [online]. 2007, **68**(14), 1855-1863 [cit. 2016-10-19]. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.02.010. ISSN 00319422. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942207000933>
- 31) PRAVEEN, G., SUDESH, KY.: Insights into steviol glycoside biosynthesis pathway enzymes through structural homology. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **3** (1): 1-19, 2013, ISSN 21504210, dostupné na: <http://scialert.net/abstract/?doi=ajbmb.2013.1.19>
- 32) KRUTOŠÍKOVÁ, A., UHER, M.: Natural and synthetic sweet substances. West Sussex: Ellis Horwood Limited, 1992: 85-90
- 33) Nové sladidlo: Steviol-glykosidy (E 960). Státní zdravotní ústav [online]. [cit. 2016-10-30]. Dostupné na: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/nove-sladidlo-steviol-glykosidy-e-960>
- 34) The Difference Between Stevia & Rebaudiana A? Ever Stevia [online]. Toronto, 2008 [cit. 2016-10-30]. Dostupné na: <http://www.everstevia.com/stevia-rebaudiana-a.html>
- 35) Rebaudioside A. Wikipedia [online]. [cit. 2016-10-30]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Rebaudioside_A
- 36) GONZÁLEZ, C., TAPIA, M., PÉREZ, E., PALLET, D., DORNIER, M.: Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: A review. *Fruits* [online]. 2014, (69), 127-141 [cit. 2016-10-30]. Dostupné na: <http://www.fruits-journal.org/articles/fruits/pdf/2014/02/fruits140003.pdf>
- 37) ARANDA-GONZÁLEZ, I., MOGUEL-ORDÓÑEZ, Y., CHEL-GUERRERO, L., SEGURA-CAMPOS, M., BETANCUR-ANCONA, D.: Evaluation of the antihyperglycemic effect of minor steviol glycosides in normoglycemic and induced-diabetic wistar rats. *Journal of Medicinal Food* [online]. 2016, **19**(9), 844-852 [cit. 2016-10-28]. DOI: 10.1089/jmf.2016.0014. ISSN 1096-620x. Dostupné na: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2016.0014>
- 38) PERICHE, Angela, Maria Luisa CASTELLÓ, Ana HEREDIA a Isabel ESCRICHE. Influence of Extraction Methods on the Yield of Steviol Glycosides and Antioxidants in *Stevia rebaudiana* Extracts. *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2015, **70**(2), 119-127 [cit. 2016-10-19]. DOI: 10.1007/s11130-015-0475-8. ISSN 0921-9668. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-015-0475-8>

- 39) SHIVANNA, N., NAIKA, M., KHANUM, F., KAUL, VK.: Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications* [online]. 2013, **27**(2), 103-113 [cit. 2017-01-29]. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2012.10.001. ISSN 10568727. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1056872712002802>
- 40) HUXTABLE, RJ.: Pharmacology and toxicology of stevioside, rebaudioside A, and steviol. *Stevia: The Genus Stevia*. Taylor and Francis, London and New York. 2002, str. 160-177. Dostupné na: http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:W5xDaUDO5okJ:scholar.google.com/+HUXTABLE,+RJ.:Pharmacology+and+toxicology+of+stevioside,+rebaudioside+A,+%26+steviol.&hl=sk&as_sdt=0,5&as_vis=1
- 41) HSIEH, MH., CHAN, P., SUE, YM., LIU, JC., LIANG, TH., HUANG, TY., TOMLINSON, B., CHOW, MS., KAO, PF., CHEN, YJ.: Efficacy and tolerability of oral stevioside in patients with mild essential hypertension a two-year, randomized, placebo-controlled study. *Clin. Ther.* 2003, **25**, 2797–2808.
- 42) GREGERSEN, S., JEPPESEN, PB., HOLST, JJ., HERMANSEN, K.: Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metab. Clin. Exp.* 2004, **53**, 73–76.
- 43) GEUNS, JMC., BUYSE, J., VANKEIRSBILCK, A., TEMME, EHM.: Metabolism of stevioside by healthy volunteers. *Exp. Biol. Med.* 2007, **232**, 164–173.
- 44) RAO, AB., GOKA RR., PRASAD, E., SUNDERGOPAL, S., YERRAPRAGADA, VLR.: An improvised process of isolation, purification of steviosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves and its biological activity. *International Journal of Food Science & Technology* [online]. 2012, **47**(12), 2554-2560 [cit. 2017-01-31]. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2012.03134.x. ISSN 09505423. Dostupné na: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2012.03134.x>
- 45) PÓL, J., VARAĐOVÁ OSTRÁ, E., KARÁSEK, P. a kol.: Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Anal Bioanal Chem.* 2007, **388**: 1847. doi:10.1007/s00216-007-1404-y
- 46) JAVAD, S., NAZ, S., ILYAS, S., TARIQ, A., ASLAM, F.: Optimization of the microwave assisted extraction and its comparison with different conventional extraction methods for isolation of stevioside from *Stevia rebaudiana*. *Asian Journal of Chemistry* [online]. 2014, **26**(23), 8043-8048 [cit. 2017-01-31]. DOI: 10.14233/ajchem.2014.17031. ISSN 09707077. Dostupné na: http://www.asianjournalofchemistry.co.in/user/journal/viewarticle.aspx?ArticleID=26_25_37

- 47) KAUR, G., PANDHAIR, V., CHEEMA, GS.: Extraction and characterization of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana bertonii* leaves. *Journal of Medicinal Plants Studies* [online]. 2014, (2), 41-45 [cit. 2016-10-30]. ISSN 2320-3862. Dostupné: http://www.plantsjournal.com/vol2Issue5/Issue_sep_2014/10.1.pdf
- 48) WALLIN, H.: Steviol glycosides: Chemical and Technical Assessment. *Journal of Medicinal Plants Studies* [online]. FAO, 2004 [cit. 2016-10-30]. Dostupné z: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/69/Steviol_glycosides.pdf
- 49) VANNESTE, J., SOTTO, A., COURTIN, C. a kol.: Application of tailor-made membranes in a multi-stage process for the purification of sweeteners from *Stevia rebaudiana*, *J. Food Eng.* 2011, 103, 285–293. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877410005248>
- 50) ERKUCUK, A., AKGUN, IH., YESIL-CELIKTAS, O.: Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. *The Journal of Supercritical Fluids* [online]. 2009, **51**(1), 29-35 [cit. 2017-02-07]. DOI: 10.1016/j.supflu.2009.07.002. ISSN 08968446. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844609002368>
- 51) CARAKOSTAS, MC., CURRY, LL., BOILEAU, AC., BRUSICK, DJ.: Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2008, **46**(7), 1-10 [cit. 2017-02-07]. DOI: 10.1016/j.fct.2008.05.003. ISSN 02786915. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691508002342>
- 52) MORAES, E., MACHADO, N.: Clarification of *Stevia rebaudiana* Bertoni extract by adsorption in modified zeolites. *Acta Scientiarum*. 2001, 23, 1375-1380. Dostupné na: <https://www.scribd.com/document/178307400/CLARIFICACION-STEVIAPOR-ZEOLITAS>
- 53) YODA, S., MARQUES, M., PETENATE, A., MEIRELES, M.: Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂ + water: extraction kinetics and identification of extracted components. *J. Food Eng.* 2003, 57, 125–134. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877402002819>
- 54) PURI, M., SHARMA, D., BARROW, CJ., TIWARY, AK.: Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry* [online]. 2012, **132**(3), 1113-1120 [cit. 2017-02-07]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.11.063. ISSN 03088146. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611016451>
- 55) XIE, J., WANG, P., SU, W.: Application of chitosan flocculation method in clarification of water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves and

- flocculation mechanism analysis. *Food Sci.* 2012, 32, 1–6. Dostupné na: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SPKX201120002.htm
- 56) DORTA, E., LOBO, MG., GONZÁLEZ, M.: Improving the efficiency of antioxidant extraction from mango peel by using microwave-assisted extraction. *Plant Foods for Human Nutrition* [online]. 2013, **68**(2), 190-199 [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.1007/s11130-013-0350-4. ISSN 0921-9668. Dostupné na: <http://link.springer.com/10.1007/s11130-013-0350-4>
- 57) TOMA, M., VINATORU, M., PANIWNKY, L., MASON, TJ.: Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* [online]. 2001, **8**(2), 137-142 [cit. 2017-04-05]. DOI: 10.1016/S1350-4177(00)00033-X. ISSN 13504177. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135041770000033X>
- 58) JAITAK, V., BANDA, BS., KAUL, VK.: An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Phytochem. Anal.* 2009, 20: 240-245. doi:10.1002/pca.1120. Dostupné na: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.1120/abstract;jsessionid=AA95C0974D3C4423274E684336F0818F.f04t02>
- 59) PÓL, J., HOHNOVÁ, B., HYÖTYLÄINEN, T.: Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1150**(1-2), 85-92 [cit. 2016-11-07]. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.09.008. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730601716X>
- 60) HURUM, D., ROHRER, J.: Steviol glycoside determination by HPLC with charged aerosol and UV detections using the acclaim trinity P1 column. [online]. California: Thermo Scientific, 2011 [cit. 2016-10-30]. Dostupné na: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AN293-HPLC-SteviolGlycosides-13Jan2012-LPN2976.pdf>
- 61) ZIMMERMANN, BF., WOELWER-RIECK, U., PAPAGIANNPOULOS, M.: Separation of steviol glycosides by hydrophilic liquid interaction chromatography. *Food Analytical Methods* [online]. 2012, **5**(2), 266-271 [cit. 2016-11-09]. DOI: 10.1007/s12161-011-9229-x. ISSN 1936-9751. Dostupné na: <http://link.springer.com/10.1007/s12161-011-9229-x>
- 62) MAKAPUGAY, HC., NANYAKKARA, NPD., KINGHORN, AD.: Improved high-performance liquid chromatographic separation of the *Stevia rebaudiana* sweet terpene glycosides using a linear. gradient elution. *J Chromatog.* 1984, 283:390–395. Dostupné na: <https://eurekamag.com/research/001/210/001210293.php>

- 63) KITADA, Y., SASAKI, M., YAMAZOE, Y.: Simultaneous determination of stevioside, rebaudioside A and C and dulcoside A in foods by high-performance liquid chromatography. *J chromatog.* 1989, 474:447–451. Dostupné na: <http://documentslide.com/documents/simultaneous-determination-of-stevioside-rebaudioside-a-and-c-and-dulcoside.html>
- 64) KOLB, N., HERRERA, JL., FERREYRA, DJ., ULIANA, RF.: Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, **49**(10), 4538-4541 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1021/jf010475p. ISSN 0021-8561. Dostupné na: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf010475p>
- 65) PÓL, J., VARAĎOVÁ OSTRÁ, E., KARÁSEK, P., a kol.: Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Anal Bioanal Chem.* 2007, 388: 1847. doi:10.1007/s00216-007-1404-y. Dostupné na: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-007-1404-y>
- 66) BOVANOVA, L., BRANDŠTETEROVÁ, E., BAXA, S.: HPLC determination of stevioside in plant material and food samples. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A* [online]. 1998, 11-2, **207**(5), 352-355 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1007/s002170050344. ISSN 1431-4649. Dostupné na: <http://link.springer.com/10.1007/s002170050344>
- 67) VANEK, T., NEPOVIM, A., VALICEK, P.: Determination of stevioside in plant material and fruit teas. *Journal of food composition and analysis: an official publication of the United Nations University International Network of Food Data Systems.* 2001, 14(4): 383-388. Dostupné na: <https://eurekamag.com/research/003/402/003402438.php>
- 68) HUTAPEA, AM., TOSKULKAO, C., WILAIRAT, P., BUDDHASUKH, D.: High performance liquid chromatography separation and quantitation of stevioside and its metabolites. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 1999, **22**(8), 1161-1170 [cit. 2016-12-19]. DOI: 10.1081/JLC-100101724. ISSN 1082-6076. Dostupné na: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-100101724>
- 69) KOYAMA, M., YOSHIDA, K., UCHIBORI, N., WADA, I., AKIYAMA, K., SASAKI, T.: Analysis of nine kinds of sweeteners in food by LC/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2005;46:72–78. doi: 10.3358/shokueishi.46.72. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16042292>
- 70) GARDANA, C., SCAGLIANTI, M., SIMONETTI, P.: Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, **1217**(9), 1463-1470 [cit. 2016-11-02]. DOI:

- 10.1016/j.chroma.2009.12.036. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730901841X>
- 71) WOELWER-RIECK, U., LANKES, Ch., WAWRZUN, A., WÜST, M.: Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology* [online]. 2010, **231**(4), 581-588 [cit. 2016-11-09]. DOI: 10.1007/s00217-010-1309-4. ISSN 1438-2377. Dostupné na: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-010-1309-4>
- 72) JAMALUDDIN AHMED, M., SMITH, RM.: Determination of stevioside by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Sep. Science.* 2002, 25: 170-172. DOI:10.1002/1615-9314(20020201)25:3<170::AID-JSSC170>3.0.CO;2-W
- 73) VEERLE, JYM., COMPERNOLLE, F., TOPPET, S., Geuns, JMC.: Steviol quantification at the picomole level by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52 (9), 2445–2449, DOI: 10.1021/jf0307200. Dostupné na : <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf0307200>
- 74) PAVLÍČEK, V., TŮMA, P.: The use of capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for sensitive determination of stevioside and rebaudioside A in foods and beverages. *Food Chemistry* [online]. 2017, **219**, 193-198 [cit. 2016-11-09]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.09.135. ISSN 03088146. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461631531X>
- 75) Steviol glycosides: Tentative [online]. FAO [cit. 2016-10-30]. Dostupné na: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-442.pdf>.
- 76) HURUM, D., ROHRER, J.: Determination of steviol glycosides by HPLC with UV and ELS detections. *American Journal of Analytical Chemistry* [online]. California: Thermo Fisher Scientific, 2014 [cit. 2016-10-30]. Dostupné na: http://www.dionex.com/en-us/webdocs/83393-AN-241-HPLC-Steviol-Glycosides-UV-ELS-AN70235_E.pdf
- 77) TADA, A., ISHIZUKI, K., IWAMURA, J., a kol.: Improvement of the assay method for steviol glycosides in the JECFA specifications. *American Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2013, 04(04), 190-196 [cit. 2016-10-23]. DOI: 10.4236/ajac.2013.44024. ISSN 2156-8251. Dostupné na: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/ajac.2013.44024>
- 78) JAWORSKA, Karolina, Alexander J. KRYNITSKY a Jeanne I. RADER. Simultaneous Analysis of Steviol and Steviol Glycosides by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection on a Mixed-Mode Column: Application to *Stevia* Plant Material and *Stevia*-Containing Dietary Supplements. *Journal of AOAC International* [online]. 2012, **95**(6), 1588-1596

- [cit. 2017-04-19]. DOI: 10.5740/jaoacint.11-435. ISSN 10603271. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1060-3271&volume=95&issue=6&spage=1588>
- 79) SAKAMAKI, N., MATSUMOTO, H., HAGINO, K., NAKAZATO, M., YASUDA, K.: Simultaneous determination of stevioside, rebaudioside A and glycyrrhizic acid in foods by HPLC. *Journal of the food hygienic society of Japan* [online]. 2004, 45(2):81-86 [cit. 2016-11-07]. DOI: 10.3358/shokueishi.45.81. Dostupné na: <http://europepmc.org/abstract/med/15272605>
- 80) Ascentis Express HPLC Resource Guide. Sigma-Aldrich. 2011. Dostupné na: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Brochure/1/t409118.pdf>
- 81) BERGS, D., BURGHOFF, B., JOEHNCK, M., MARTIN, G., SCHEMBECKER, G.: Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* [online]. 2012, 7(2), 147-154 [cit. 2017-04-06]. DOI: 10.1007/s00003-012-0760-5. ISSN 1661-5751. Dostupné na: <http://link.springer.com/10.1007/s00003-012-0760-5>
- 82) Core-Shell Technology. Phenomenex. Dostupné na: <https://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology>
- 83) ALPERT, AJ.: Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A* [online]. 1990, 499, 177-196 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)96972-3. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967300969723>
- 84) OYLER, AR., ARMSTRONG, BL., CHA, JY., ZHOU, MX., YANG, Q., ROBINSON, RI., DUNPHY, R., BURINSKY, DJ.: Hydrophilic-interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for peptide analysis. *Journal of Chromatography A*. 2008, 724, 378-383. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967395009876?via%3Dihub>
- 85) GARBIS, SD, MELSE-BOONSTRA, A, WEST, CE., VAN BREEMEN, RB.: Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2001;73:5358-5364. Dostupné na: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11816560?access_num=11816560&link_type=MED&dopt=Abstract
- 86) OLSEN, BA.: Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for the determination of polar pharmaceutical impurities. *J. Chromatogr.*

- A. 2001, 913: 113-122. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11355803>
- 87) RUIPING, L., JUNXIONG, H.: Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography*. 2004, 1041(1-2):163-169. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967304006338>
- 88) GUO, Y., GAIKI, S.: Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, **1074**(1-2), 71-80 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.03.058. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305005984>
- 89) HEMSTRÖM, P., IRGUM, K.: Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2006, **29**(12), 1784-1821 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1002/jssc.200600199. ISSN 1615-9306. Dostupné na: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200600199>
- 90) BUSZEWSKI, B., NOGA, S.: Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, **402**(1), 231-247 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5. ISSN 1618-2642. Dostupné na: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-5308-5>
- 91) CUBBON, S., BRADBURY, T., WILSON, J., THOMAS-OATES, J.: Hydrophilic interaction chromatography for mass spectrometric metabonomic studies of urine. *Analytical Chemistry* [online]. 2007, **79**(23), 8911-8918 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1021/ac071008v. ISSN 0003-2700. Dostupné na: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac071008v>
- 92) McCALLEY, DV.: Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1171**(1-2), 46-55 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.047. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307015610>
- 93) ALPERT, AJ., SHUKLA, K., SHUKLA, AK., a kol.: Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates. *Journal of Chromatography A* [online]. 1994, **676**(1), 191-202 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1016/0021-9673(94)00467-6. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967394004676>
- 94) CHURMS, SC.: Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on size exclusion. *J. Chromatogr. A*. 1996, 720:151-166.

- 95) YOSHIDA, T.: Peptide separation by hydrophilic-interaction chromatography: a review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2004, **60**(3), 265-280 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1016/j.jbbm.2004.01.006. ISSN 0165022x. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165022X04000090>
- 96) HO, ChT.: Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1147**(2), 165-171 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.02.057. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307003226>
- 97) STREGE, MA., STEVENSON, S., LAWRENCE, SM.: Mixed-mode anion-cation exchange/hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray mass spectrometry as an alternative to reversed phase for small molecule drug discovery. *Analytical Chemistry* [online]. 2000, **72**(19), 4629-4633 [cit. 2017-03-08]. DOI: 10.1021/ac000338b. ISSN 0003-2700. Dostupné na: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac000338b>
- 98) SANDOVAL, JE., PESEK, JJ.: *Anal. Chem.* 1989; 61:2067-2075.
- 99) YOSHIDA, T., OKADA, T.: Peptide separation in normal-phase liquid chromatography: study of selectivity and mobile phase effects on various columns. *J. Chromatogr. A*. 1999, 840:1-9.
- 100) FU, Q., LIANG, T., ZHANG, X., DU, Y., GUO, Z., LIANG, X.: Carbohydrate separation by hydrophilic interaction liquid chromatography on a 'click' maltose column. *Carbohydrate Research* [online]. 2010, **345**(18), 2690-2697 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.carres.2010.09.033. ISSN 00086215. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621510004283>
- 101) YOSHIDA, T.: Peptide separation in normal phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1997, 69:3038-3043. Dostupné na: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac9702204>
- 102) KARLSSON, G., WINGE, S., SANDBERG, H.: Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, **1092**(2), 246-249 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.08.025. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305016742>
- 103) SAMUELSON, O., SWENSON, B. *Acta. Chem. Scand.* 1962, 16, 2056.
- 104) SAMUELSON, O., SWENSON, B. *Anal. Chim. Acta.* 1962, 28, 426-423.
- 105) BUI, N., Hong, T., VERHAGE, JJ., IRGUM, K.: Tris(hydroxymethyl)aminomethane-functionalized silica particles and their application for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, **33**(19), 2965-2976 [cit. 2017-03-09]. DOI:

- 10.1002/jssc.201000154. ISSN 16159306. Dostupné na:
<http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201000154>
- 106) BELL, DS.: HILIC Chromatography: Theory and method development .ractices. Sigma-Aldrich. 2013. Dostupné na:
https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/1/HILIC-sep_sci_webinar_09132013.pdf
- 107) McCALLEY, DV.: Hydrophilic Interaction Chromatography. 2008. Dostupné na:
<http://www.chromatographyonline.com/hydrophilic-interaction-chromatography-0>
- 108) BUI, N., Hong, T., VERHAGE, JJ., IRGUM, K.: Tris(hydroxymethyl)aminomethane-functionalized silica particles and their application for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, **33**(19), 2965-2976 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1002/jssc.201000154. ISSN 16159306. Dostupné na:
<http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201000154>
- 109) VAILAYA, A., HORVÁTH, C.: Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption? *Journal of Chromatography A* [online]. 1998, **829**(1-2), 1-27 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/S0021-9673(98)00727-4. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967398007274>
- 110) GRITTI, F., GUIOCHON, G.: Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2005, **1099**(1-2), 1-42 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.09.082. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305018819>
- 111) WANG, HL., DUDA, JL., RADKE, CJ.: Solution adsorption from liquid chromatography. *Journal of colloid and interface science*. 1978, 66 (1), 153-165. Dostupné na: http://ac.els-cdn.com/0021979778901960/1-s2.0-0021979778901960-main.pdf?_tid=15262ca2-04e0-11e7-868f-00000aab0f26&acdnat=1489074793_55fb52eab0b7d8205decf02c572aec9
- 112) RIEDO, F., KOVATS, ES.: Adsorption from liquid mixtures and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*. 1982, 239,1.
- 113) KNOX, JH., PRYDE, A.: Performance and selected applications of a new range of chemically bonded packing materials in high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. 1975, 112: 171-188. Dostupné na: <http://www.sciencedirect.com/science/journal/00219673/112>
- 114) NEUE, UD., HUDALLA, ChJ., IRANETA, PC.: Influence of pressure on the retention of sugars in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, **33**(6-7), 838-840 [cit. 2017-03-12]. DOI:

- 10.1002/jssc.200900628. ISSN 16159306. Dostupné na:
<http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200900628>
- 115) KAZAKEVICH, YV., MCNAIR, HM.: Study of the excess adsorption of the eluent components on different reversed-phase adsorbents. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 1995, **33**(6), 321-327 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1093/chromsci/33.6.321. ISSN 0021-9665. Dostupné na:
<https://academic.oup.com/chromsci/article-lookup/doi/10.1093/chromsci/33.6.321>
- 116) BUSZEWSKI, B., KRUPCZYŃSKA, K., GADZAŁA-KOPCIUCH, RM., RYCHLICKI, G., KALISZAN, R.: Evaluation of HPLC columns: A study on surface homogeneity of chemically bonded stationary phases. *Journal of Separation Science* [online]. 2003, **26**(3-4), 313-321 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1002/jssc.200390037. ISSN 1615-9306. Dostupné na:
<http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200390037>
- 117) GRITTI, F., KAZAKEVICH, YV., GUIOCHON, G.: Effect of the surface coverage of endcapped C18-silica on the excess adsorption isotherms of commonly used organic solvents from water in reversed phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1169**(1-2), 111-124 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.08.071. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307014872>
- 118) BOCIAN, S., VAJDA, P., FELINGER, A., BUSZEWSKI, B.: Solvent excess adsorption on the stationary phases for reversed-phase liquid chromatography with polar functional groups. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1204**(1), 35-41 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.07.056. ISSN 00219673. Dostupné na:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308011886>
- 119) McCALLEY, DV., NEUE, UD.: Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1192**(2), 225-229 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.03.049. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308004883>
- 120) CHAMPION, B.: HILIC "A method of recent attention". Agilent Technologies. 2010. Dostupné na:
https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/PDF_Understanding%20HILIC%20Chromatography_042710.pdf
- 121) GRITTI, F., DOS SANTOS PEREIRA, A., SANDRA, P., GUIOCHON, G.: Comparison of the adsorption mechanisms of pyridine in hydrophilic interaction chromatography and in reversed-phase aqueous liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, **1216**(48), 8496-8504 [cit. 2017-03-09].

- DOI: 10.1016/j.chroma.2009.10.009. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309014848>
- 122) BERTHOD, A. Practice and mechanism of HPLC oligosaccharide separation with a cyclodextrin bonded phase. *Talanta* [online]. rok **47**(4), 1001-1012 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/S0039-9140(98)00179-9. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914098001799>
- 123) BUSZEWSKI, B., BOCIAN, S., DZIUBAKIEWICZ, E.: Zeta potential determination as a new way of stationary phases characterization for liquid chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, **33**(11), 1529-1537 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1002/jssc.200900466. ISSN 16159306. Dostupné na: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200900466>
- 124) KAZAKEVICH, YV., LOBRUTTO, R.: HPLC for pharmaceutical scientists. Wiley, Hoboken. 2007. ISBN-13: 978-0-471-68162-5. ISBN-10: 0-471-68162-8
- 125) KOH, HL., LAU, AJ., CHAN, ECY.: Hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry for the determination of underivatized dencichine (beta-N-oxalyl-L-alpha, beta-diaminopropionic acid) in Panax medical plant species. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005;19:1237–1244. DOI: 10.1002/rcm.1928. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15838924>
- 126) JANDERA, P., CHURÁČEK, J., TARABA, B.: Comparison of retention behaviour of aromatic sulphonic acids in reversed-phase systems with mobile phases containing ion-pairing ions and in systems with solutions of inorganic salts as the mobile phases. *Journal of Chromatography A* [online]. 1983, **262**, 121-140 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)88093-6. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301880936>
- 127) KOBAYASHI, J., KIKUCHI, A., SAKAI, K., OKANO, T.: Aqueous chromatography utilizing pH-/temperatures-responsive polymer stationary phases to separate ionic bioactive compounds. *Anal Chem.* 2001;73:2027–2033. DOI: 10.1021/ac0013507 Dostupné na: <http://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ac0013507#citing>
- 128) ŠKEŘÍKOVÁ, V., JANDERA, P.: Effects of the operation parameters on hydrophilic interaction liquid chromatography separation of phenolic acids on zwitterionic monolithic capillary columns. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, **1217**(51), 7981-7989 [cit. 2017-03-09]. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.07.061. ISSN 00219673. Dostupné na: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967310009970>