

Abstrakt

Spojení ultra vysoko účinné kapalinové chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního spektrometru (UHPLC-MS) poskytuje metodu, která je velice rychlá a citlivá. Tato diplomová práce byla zaměřena na využití UHPLC-MS ke stanovení kyseliny askorbové (AA) a dehydroaskorbové (DHA).

AA je malá polární molekula, která působí jako antioxidant. Oxidací AA vzniká DHA. Poměr AA a DHA je ukazatelem redoxního stavu organismu. Pro stanovení AA a DHA již bylo vyvinuto několik metod, které však většinou neumožňují současné stanovení, ale vyžadují vícekrokový postup subtrakce.

Optimalizace UHPLC-MS metody pro stanovení AA a DHA zahrnuje volbu mobilní a stacionární fáze a nastavení hmotnostního detektoru. Volba vhodných podmínek závisela především na retenčním čase a odezvě detektoru. Byl sledován vliv stacionární fáze a dále koncentrace, pH a složení mobilní fáze na retenci AA a DHA. Byl sledován i vliv mobilní fáze na stabilitu AA a DHA.

Porovnávanými stacionárními fázemi byly kolona BEH Shield RP C18, BEH HILIC a BEH Amide kolona. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na koloně BEH Shield RP C18. Pro zjištění vhodné mobilní fáze byla provedena měření s 0,1%, 0,05%, 0,01% kyselinou mravenčí, 0,1%, 0,05%, 0,01% kyselinou octovou, mravenčanem amonným o pH 3,5 a octanem amonným o pH 4,4 a 6,8 jako vodnou složkou. Nakonec bylo dosaženo nejlepších výsledků s ultračistou vodou. Organickou složkou mobilní fáze byl acetonitril (ACN) v poměru 65:35

Po optimalizaci podmínek v módu SIM byl proveden test opakovatelnosti, kdy relativní směrodatná odchylka plochy pro AA byla 1,63% a pro DHA 8,95%. Byly změřeny kalibrační křivky v rozmezí 5 – 500 µg/ml. Korelační koeficient kalibrační křivky byl pro AA 0,9955 a pro DHA 0,9985.