

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

**Stanovení vitamínu C a dehydroaskorbové kyseliny s využitím metody
UHPLC-MS**

(diplomová práce)

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

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

Hradec Králové 2010

Zuzana Proroková

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové 29.4.2010

Zuzana Proroková

Poděkování:

Děkuji Lucii Novákové za cenné rady, informace a čas při vypracovávání této diplomové práce.

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 vícekový 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.

Abstract

A coupling of Ultra High Performance liquid chromatography with mass spectrometry provides a technique, which is rapid and sensitive. This thesis is focused on the use of UHPLC-MS for the determination of ascorbic acid (AA) and dehydroascorbic acid (DHA).

AA is a small polar molecule that acts as an antioxidant. After oxidation AA creates DHA. AA/DHA ratio is an indicator of a redox state of organism. For the determination of AA and DHA several methods have been developed, which usually do not allow the simultaneous analysis, but require multistep subtraction procedure.

The optimization of UHPLC-MS method for the determination of AA and DHA include the choice of mobile and stationary phase and mass spectrometry detector set-up.

The choice of appropriate conditions depended mainly on retention time and the detector response. The effect of stationary phase, concentration, pH, composition of mobile phase on retention of AA and DHA was observed. Effect of mobile phase on stability of AA and DHA was observed as well.

BEH Shield RP C18, BEH HILIC and BEH Amide column were compared. The best results were achieved on column BEH Shield RP C18. Measurements with 0.1%, 0.05%, 0.01% formic acid, 0.1%, 0.05%, 0.01% acetic acid, ammonium formate at pH 3.5 and ammonium acetate at pH 4.4 and 6.8 as a water component were carried out. The best results were achieved with ultrapure water. Organic part of mobile phase was 65:35 acetonitrile (ACN).

Repeatability test was performed at optimized conditions using SIM experiment. Relative standard deviation of peak area for AA was 1.63% and for DHA was 8.95%. Calibration curve was measured in the range 1-500 µg/ml. Correlation coefficient of calibration curve was for AA 0.9955 and for DHA was 0.9985.

Obsah

Obsah.....	6
1. Úvod a cíl práce	10
1.1 Úvod	11
1.2 Cíl práce	12
2. Teoretická část.....	13
2.1 Chromatografické metody	14
2.1.1 Princip chromatografických metod	14
2.1.2 Kapalinová chromatografie	15
2.2 Hmotnostně spektrometrické detektory.....	22
2.2.1 Iontový zdroj	23
2.2.2 Hmotnostní analyzátor	25
2.2.3 Hmotnostní spektrometr-detektor	27
2.2.4 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí.....	27
2.3 Retenční data v HPLC	28
2.4 Test způsobilosti systému (SST)	29
2.5 Validace analytických metod	31
2.6 Stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové.....	32
2.6.1 Kyselina askorbová	32
2.6.2 Kyselina dehydroaskorbová	33
2.6.3 Současné stanovení AA a DHA	34
3. Experimentální část.....	44
3.1 Použité chemikálie	45
3.2 Přístrojové vybavení.....	45
3.3 Příprava mobilní fáze a analytů.....	45
3.3.1 Příprava mobilní fáze	45
3.3.2 Příprava analytů a vzorků.....	46
3.4 Optimalizace metody.....	46
3.5 Test způsobilosti.....	47
3.6 Validace metody - Linearita a citlivost	47
4. Výsledky a diskuse	48
4.1 Optimalizace podmínek stanovení AA a DHA	49
4.1.1 Výběr ionizační techniky	49
4.1.2 Volba mobilní a stacionární fáze.....	54
4.1.3 Optimalizace MS metody.....	69

4.1.4 Měření v módu MS/MS.....	74
4.2 Test způsobilosti systému.....	76
4.3 Validace metody - Linearita a citlivost	77
5.Závěr.....	80
6. Použitá literatura.....	83

Seznam použitých zkratk

ACN	-acetonitril
AMF	-mravenčan amonný
APCI	-chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	-fotoionizace za atmosférického tlaku
DHA	-kyselina dehydroaskorbová
ED	-elektrochemická detekce
EDTA	-etylendiamin-tetraoctová kyselina
ESI	-ionizace elektrosprejem
FD	-fluorescenční detekce
GLUT	-glukosový transportér
HILIC	-Hydrophilic Interaction Chromatography
H ₂ O	-ultračistá voda
HPLC	-vysoko účinná kapalinová chromatografie
LOD	-limit detekce
LOQ	-limit kvantifikace
MALDI	-ionizace desorpcí laserem za účasti matrice
MDA	-monodehydroaskorbát
MPA	-kyselina m-fosforečná
MS	-hmotnostní spektrometrie
NP-HPLC	-vysokoúčinná kapalinová chromatografie na normální fázi
OPA	-kyselina o-fosforečná
rec	-výtěžnost
RP-HPLC	-vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RSD	-relativní směrodatná odchylka
SIM	-monitorování vybraného iontu
SRM	-monitorování vybrané reakce
TCA	- kyselina trichloroctová
TFA	-kyselina trifluoroctová
UPLC, UHPLC	-ultra vysoko účinná kapalinová chromatografie
UV	-ultrafialová

1. Úvod a cíl práce

1.1 Úvod

Kyselina askorbová, známá jako vitamin C, je malá polární molekula. Její oxidací vzniká kyselina dehydroaskorbová. Biologicky aktivní isomer vitamínu C je L-askorbová kyselina. Většina zvířat i rostlin si dokáže tento vitamin syntetizovat sama. Člověk, primáti, morčata, netopýr si jej sami syntetizovat nedokáží a tak jej musí přijímat z vnějších zdrojů. Mezi rostlinné zdroje s nejvyšším obsahem tohoto vitamínu patří šípek, rakytník, citrusové plody, černý rybíz a brusinky.

Vitamin C je důležitý pro řadu pochodů v lidském těle. Je potřebný pro metabolismus aminokyselin. Podílí se na syntéze kolagenu a na tvorbě mezibuněčné hmoty, je nezbytný pro správnou funkci všech buněk. Je nutný pro správnou stavbu kostí, cév, svalů, šlach a kůže. Ovlivňuje také tvorbu hormonů hypofýzy a nadledvin. Účastní se tvorby imunoglobulinů, má vliv na aktivitu fagocytů a leukocytů a tím je naprosto nezbytný pro obranyschopnost organismu. Je důležitý jako antioxidant, který chrání organismus před působením volných radikálů.

Nedostatek vitamínu C se projevuje únavou, krvácivostí a zvýšeným sklonem k infekcím.

Kyselina askorbová je velice nestabilní. Rozkládá se za vysoké teploty, působením kyslíku a rozklad katalyzují kovy (např.měď). Při extrakci se stabilizuje zajištěním nízkého pH, přidávkem komplexotvorných a redukujících látek.

AA se stanovuje zejména pomocí HPLC. Jako detektor se využívá UV detektor nebo elektrochemický detektor.

Tato diplomová práce je zaměřena na současné stanovení vitamínu C a kyseliny dehydroaskorbové pomocí UHPLC s využitím detekce pomocí hmotnostního spektrometru. Jedná se o relativně novou separační techniku v oblasti kapalinové chromatografie. Separační proces využívá sorbentů připravených patentovou sub-2-mikronovou technologií, která umožňuje vznik částic, které jsou mechanicky pevné s mimořádnou separační účinností. Proces probíhá za velmi vysokých tlaků. Od HPLC se technika UHPLC liší kratší dobou analýzy, vyšší účinností a citlivostí.

1.2 Cíl práce

Tato diplomová práce je zaměřena na optimalizaci metody pomocí níž lze stanovit AA a DHA ve směsi s využitím UHPLC a detekce hmotnostním spektrometrem. Předmětem této diplomové práce je zajistit optimální podmínky stanovení jako je volba stacionární i mobilní fáze a nastavení detektoru tak, aby byla získána metoda rychlá a citlivá. Jedná se o současné stanovení AA a DHA, které je velice náročné.

2. Teoretická část

2.1 Chromatografické metody

2.1.1 Princip chromatografických metod

Chromatografické metody jsou separační metody, které slouží k oddělení analyzovaných složek ze směsi a zároveň umožňují jejich kvantitativní i kvalitativní analýzu [1].

Během chromatografického procesu dochází k postupnému, mnohokrát opakovanému ustavování rovnováh mezi stacionární a mobilní fází. Mezi stacionární fází, mobilní fází a složkami dělené směsi dochází k interakcím, kdy na základě různé afinity složek k oběma fázím dochází k jejich oddělení [2].

Stacionární fáze je nepohyblivá a má schopnost různou měrou zadržovat jednotlivé složky směsi. Mobilní fáze je pohyblivá a vymývá složky směsi z nepohyblivé fáze a odnáší je ve směru toku různou rychlostí, tím dojde k jejich oddělení.

K dělení látek dochází v závislosti na brzdící síle neboli retenci, ta působí selektivně. Čím pevněji se látka váže na stacionární fází, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje [1].

Podle charakteru mobilní fáze rozlišujeme plynovou chromatografii, kde je mobilní fází plyn a kapalinovou chromatografii, kde je mobilní fází kapalina.

Kapalinová chromatografie může být realizována v plošném uspořádání (tenkovrstvá a papírová chromatografie) nebo v kolonovém uspořádání (HPLC). Podle podstaty chromatografického procesu rozlišujeme adsorpční, rozdělovací, iontové výměnnou, gelovou a afinitní chromatografii [2].

Mezi nejpoužívanější metody pro analýzu sloučenin patří RP-HPLC (vysoko účinná kapalinová chromatografie na reverzní fází). RP-HPLC je chromatografie s obrácenými fázemi. Stacionární fází je zde nepolární matrice a mobilní fází je polární kapalina. Na reverzní fází dochází k oddělení složek rozpustných v polárních rozpouštědlech. Jako mobilní fáze se většinou používá voda s organickým rozpouštědlem jako je methanol, isopropanol, dioxan, ethanol, tetrahydrofuran, voda a acetonitril. Nejčastěji se jako stacionární reverzní fáze využívají oktyl (C8) a oktadecyl (C18) modifikované fáze. Adsorbenty na bázi oxidu křemičitého modifikované

trimethylchlorsilanem (C1) a butyldimethylchlorsilanem jsou využívány jen málo a to zejména pro separaci [3].

Další typ je chromatografie na normálních fázích (NP-HPLC), kde je stacionární fáze polární [4].

2.1.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie byla první chromatografickou metodou. Byla objevena již na počátku 20.století a do popředí se dostala v 70.letech [5].

Kolonová chromatografie využívá k dělení látek chromatografickou kolonu. Chromatografická kolona je skleněná, plastová nebo ocelová trubice naplněná drobnými částicemi vhodného materiálu-sorbent. Kolonou protéká mezi částicemi sorbentu kapalina (mobilní fáze, eluent). Na začátek kolony je nadávkován vzorek. Mobilní fází je vzorek unášen kolonou a při kontaktu složek vzorku se sorbentem dochází k jejich částečnému přechodu do stacionární fáze ve snaze dosáhnout termodynamické rovnováhy. Mobilní fáze postupuje kolonou směrem k detektoru, ten na základě změny fyzikální nebo fyzikálně-chemické veličiny zaznamenává přítomnost separovaných složek [6].

2.1.2.1 HPLC

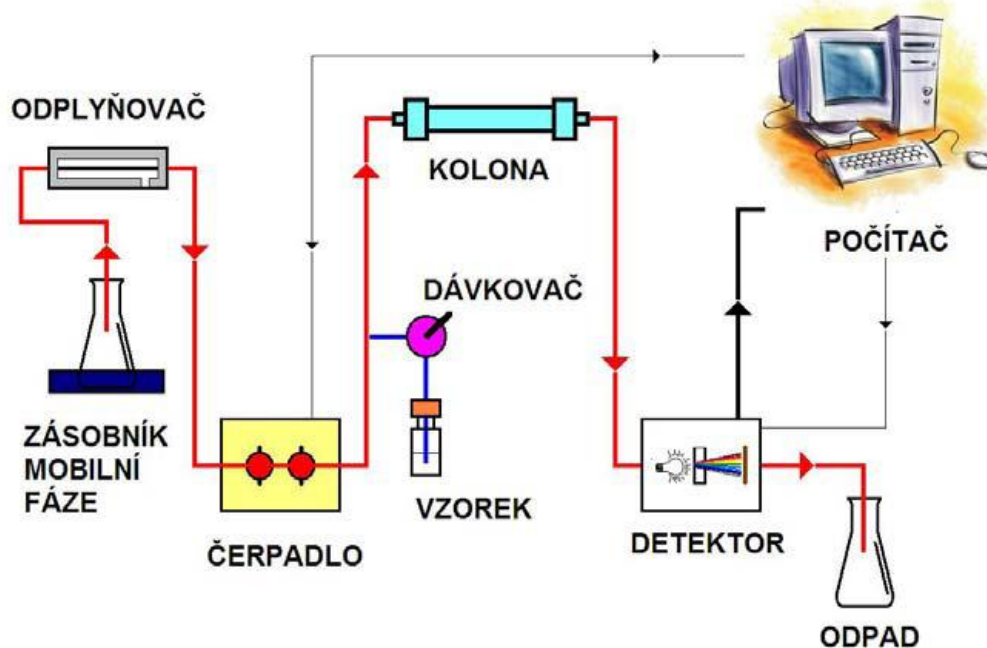
HPLC je vysoko účinná kapalinová chromatografie. HPLC se stále častěji uplatňuje ve všech oblastech analýzy léčiv a je využívána ve všech moderních lékopisných monografiích [2].

Výhodou HPLC je, že umožňuje kvalitativní i kvantitativní analýzu, je to metoda poměrně rychlá a citlivá, kdy k analýze postačuje jen minimální množství vzorku. Navíc lze metodu automatizovat [2]. HPLC umožňuje analýzu tepelně nestálých látek, netěkavých látek i polymerů [1].

Separční účinnost HPLC závisí na velikosti částic stacionární fáze. Čím menší a stejnoměrnější jsou částice stacionární fáze, tím je větší účinná plocha a tedy i separční účinnost. Rozlišujeme dva typy eluce: izokratickou a gradientovou eluci. U izokratické eluce se složení mobilní fáze nemění a používá se pro separaci u látek

jejichž chemické vlastnosti se příliš neliší. Při gradientové eluci se složení mobilní fáze plynule mění, kdy pomalu roste koncentrace druhé složky mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se koncentrační gradient mobilní fáze. Gradientová eluce se používá u látek, jejichž eluční parametry se významně liší. Lze využít i gradient pH [1].

Zařízení pro kapalinovou chromatografii se nazývá kapalinový chromatograf. Hlavní součásti kapalinového chromatografu jsou zásobníky mobilní fáze, odplyňovací zařízení, zařízení pro tvorbu gradientu, vysokotlaké čerpadlo, dávkovací zařízení, kolona, detektor a počítač (obr.1) [7].



Obr.1:Schéma kapalinového chromatografu [8]

Chromatografická kolona je trubice nebo kapilára rovnoměrně naplněná nebo pokrytá stacionární fází. Plášť kolony má za úkol držet stacionární fazi pohromadě. Kolona musí být chemicky inertní, musí odolávat vysokým tlakům a vnitřní povrch kolony musí být dostatečně hladký [9].

2.1.2.2 UHPLC

V dnešní době je potřeba zpracovávat velké množství vzorků. Proto bylo jedním z hlavních cílů analytických laboratoří vyvinout rychlý a účinný postup pro provádění jak kvalitativní tak kvantitativní analýzy. V tomto ohledu zůstává metodou volby kapalinová chromatografie. Nicméně konvenční čas analýzy je většinou delší než 10

minut. Z toho důvodu bylo nutné vyvinout metodu, která by byla rychlá s dobou analýzy pod 5 nebo i pod 1 minutu.

Jeden ze způsobů, jak snížit čas analýzy je využití kratších kolon (3-5 cm) a vysokého průtoku. Takovéto kolony s velikostí částic 3 nebo 3,5 μm jsou komerčně dostupné již od devadesátých let [10]. UHPLC systém využívá krátké kolony s velikostí částic stacionární fáze pod 2 μm a to vede k vyšší účinnosti separace. Celý proces probíhá za velmi vysokých tlaků [11]. Tlak dosahuje 400 – 1000 bar, ale i více. Čím vyšší tlak, tím vyšší je účinnost [10].

Metoda UHPLC byla odvozena od HPLC [12]. Tato separační technika je poměrně nová v oblasti kapalinové chromatografie [8]. Oproti HPLC má UHPLC několik výhod a těmi jsou: kratší doba analýzy, nižší spotřeba rozpouštědel a tím nižší náklady, vyšší separační účinnost, vyšší citlivost a více kvalitativních informací [8].

Stacionární fáze pro HPLC a UHPLC

UHPLC kolony bývají poměrně krátké. Mezi technologicky nejvyspělejší patří kolony dlouhé pouhých 5 mm [13].

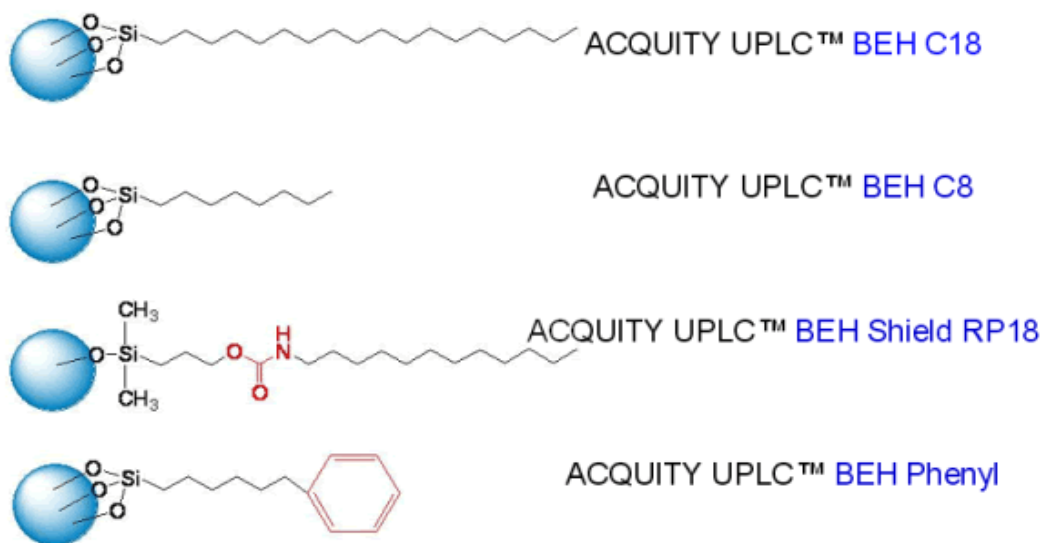
U UHPLC kolon se oproti HPLC kolonám mění podstatně hardware. Jedná se o patentovou technologii plnění za vysokého tlaku (20 000 psi), která zaručuje optimální uchování sorbentu v těle kolony a jejich stabilitu. Koncové spoje kolony jsou přizpůsobeny dosahovanému vysokému tlaku [8]. V současné době je k dispozici velký výběr analytických kolon. Mezi základní typy stacionárních fází (obr.2) patří zejména C18, C8, RP18 a fenylová kolona a HILIC [13]. Každá stacionární fáze poskytuje rozdílné kombinace hydrofobicity, silanolové aktivity, hydrolytické stability a chemické interakce s analytem [8].

Kolony pro Acquity UHPLC systém jsou opatřeny mikročipem, který zaznamenává historii kolony. Můžeme tak zjistit celkový počet nástřiků, provedené nástřiky a tlakovou historii kolony [8].

V poslední době bylo vyvinuto mnoho nových stacionárních fází za účelem snížení doby analýzy při zachování vysokého rozlišení a selektivity. Došlo k získání stacionárních fází o vysoké chemické a mechanické stabilitě [14].

Rozlišujeme dva typy sorbentů. Buď se používá anorganický nosič – silikagel nebo nosič organický – uhlík nebo polymer. Silikagelové sorbenty jsou poměrně mechanicky odolné a vykazují vysokou účinnost a dobře se dají predikovat retence

analytů. Jejich nevýhodou je limitovaný rozsah pH mobilní fáze, chemická nestabilita a chvostování bazických analytů.



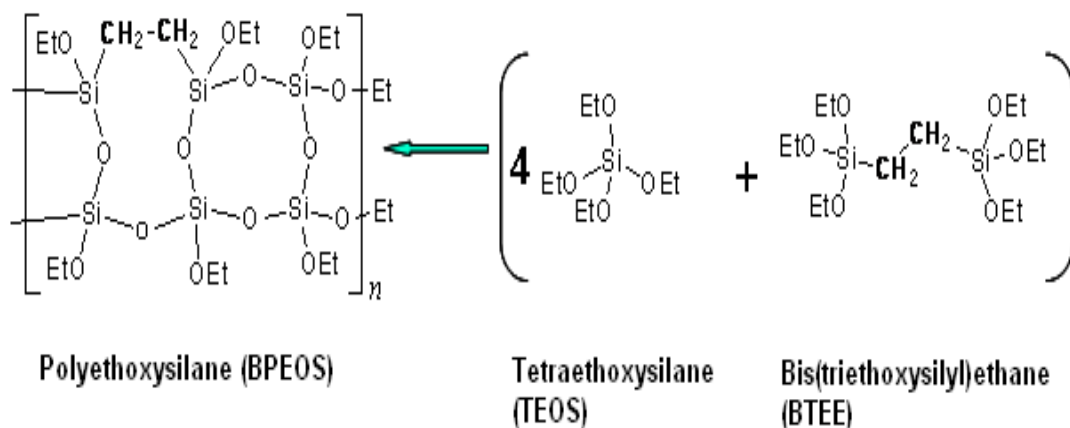
Obr.2 : Typy stacionárních fází pro Acquity UHPLC systém [8]

Polymerní sorbenty naopak mohou pracovat v širokém rozmezí pH, jsou chemicky stabilní a nedochází k iontovým interakcím. Tyto kolony jsou ale méně mechanicky odolné, jsou méně účinné a je zde horší předvídatelnost retence analytů. Spojením výhod obou typů sorbentů bylo dosaženo výhodných vlastností sorbentu, o to se pokouší technologie "Hybrid (silicon-carbon) Particle Technology".

K zamezení vlivu volných hydroxylových skupin a ke zvýšení mechanické odolnosti bylo použito např. tzv. ethylenových můstků (obr.3).

Velikost částic UHPLC kolon se pohybuje okolo 1,7 μm . Dalším zmenšováním velikosti by docházelo ke zvyšování zpětného tlaku, ale ke zvyšování separační účinnosti by docházelo už jen minimálně [8].

V posledních 5 letech bylo vyvinuto obrovské množství sub-2-mikronových stacionárních fází. Jedná se hlavně o hybridní a silikagelové fáze. Tyto fáze byly chemicky upraveny včetně C8, C18, Phenyl, Kyano, Shield a další. Výhodou hybridní fáze je vysoká chemická stabilita v celém rozmezí pH (běžně 1-12, Acquity BEH columns nebo Pathfinder). To umožňuje analýzu bazických látek při pH i 2 jednotky nad jejich pKa.



Obr.3 : Princip vzniku ethylenových můstků [8]

Při porovnání sub-2-mikronových neporézních a porézních fází bylo zjištěno, že neporézní částice poskytují vyšší účinnost při vyšší lineární rychlosti. Nicméně, při snížení velikosti částic ze 3 na 1,5 μm se rozdíl v účinnosti výrazně snížil. Nosnost porézních C18 částic byla 15 \times vyšší než pro neporézní C18 částice. Kromě toho byl průměrný retenční čas pro porézní C18 částice významně vyšší [14].

Novějším typem kolon jsou také kolony s pevným jádrem. Při použití těchto kolon dochází ke zvýšení separační účinnosti díky povrchově porézním částicím. První použití těchto kolon se datuje do šedesátých let 20. století. Kolony s pevným jádrem jsou známy např. pod komerčním názvem HALO. HALO silikagelové částice obsahují 1,7 μm pevné jádro a 0,5 μm porézní vrstvu silikagelového povlaku, který vytváří celkový průměr částice 2,7 μm . HALO se dají použít při RP-HPLC i HILIC v gradientové i izokratické eluci. Cunliffe a Maloney porovnávali sub-2-mikronové částicové porézní kolony. Výsledky ukázaly, že kolony s porézními částicemi dosáhly 80% účinnosti Acquity kolon při 45% zpětném tlaku [14].

Alternativou RP-HPLC je HILIC. HILIC využívá stacionární fáze polárního charakteru. Často obsahují hydroxyetylové skupiny, diolové skupiny, aminoskupiny nebo se může jednat o speciální druh „zwitteriontovou“ stacionární fázi a další [14].

2.1.2.3 Detekce v chromatografii

Složení eluátu v kapalinové chromatografii monitoruje detektor a zaznamenává ho graficky. Detektor musí splňovat určité podmínky: musí poskytovat odezvu

dostatečně rychle a měl by mít co nejmenší vnitřní objem [15]. Další podmínky, které musí detektor splňovat jsou: vysoká citlivost, linearita odezvy, nízký šum, stabilita signálu, malá citlivost na změnu průtoku a tlaku, možnost gradientové eluce a malý mimokolonový příspěvek k mrtvému objemu [7]. Detektor může být univerzální, který reaguje na vlastnosti systému jako celku nebo selektivní, který reaguje na určitou selektivní vlastnost analytu [15]. Detektor může být destruktivní (analyt se nevratně mění) nebo nedestruktivní (nedochází k chemické změně detekovaného analytu) a pro vícenásobnou detekci je lze i kombinovat [16]. Citlivost a selektivita chromatografické analýzy závisí na použitém detektoru.

Kapalinová chromatografie se používá v kombinaci se spektrofotometrickými detektory, fluorimetrickými detektory, elektrochemickými detektory a refraktometrickými detektory, které měří rozdílný index lomu mezi čistou mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony, obsahujícím dokazovanou látku. Dalším typem je hmotnostní spektrometr, který patří mezi velice selektivní a citlivé detektory, který poskytuje řadu informací pro identifikaci látek [2].

Výsledný záznam odezvy chromatografického detektoru na čase se nazývá chromatogram. Separované látky prochází detektorem a jsou zaznamenávány jako koncentrační profily (chromatografické píky). V ideálním případě je chromatografický pík symetrický a má tvar Gaussovy křivky [2].

UV-VIS DETEKTOR

Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na platnosti Lambert-Beerova zákona.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A – absorbance

ε – molární absorpční koeficient

c – koncentrace

l – tloušťka absorbované vrstvy

Podle konstrukčního typu rozlišujeme 4 typy detektorů:

- Detektory s fixní vlnovou délkou.
- Detektory s měnitelnou vlnovou délkou – pouze předem danými vlnovými délkami.

- Detektory s programovatelnou vlnovou délkou – vlnovou délku lze nastavovat v určitém rozmezí, lze ji měnit v průběhu analýzy.
- Detektory diodového pole – snímají celé spektrum v reálném čase. Zaznamenávají údaje o absorpci při jakékoliv zvolené vlnové délce. Tyto detektory umožňují porovnávat naměřená spektra s knihovnou spekter a vypočítat čistotu píku [8].

FLUORIMETRICKÝ DETEKTOR

Fluorimetrický detektor je velice selektivní a citlivý. Jeho použití je ale omezené, pouze pro látky, které vykazují fluorescenci [9]. Látky, které nefluoreskují lze často derivatizací převést na fluoreskující deriváty [2].

Fluorimetrické detektory jsou založeny na principu měření sekundárního záření, které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitační). Absorpcí elektromagnetického záření přecházejí molekuly látek ze základního elektronového stavu do různých vibračních hladin excitovaného elektronového stavu. Absorbovanou energii může molekula opět vyzářit jako fluorescenci nebo ji přeměnit jiným mechanismem na energii vibrační nebo ji předat jiným molekulám. Ztrátou vibrační energie přejde molekula nejprve do základního vibračního stavu a pak emituje fluorescenční záření, které má stejnou vlnovou délku jako absorbované záření nebo je vlnová délka emitovaného záření větší v důsledku vibrační relaxace [17].

ELEKTROCHEMICKÝ DETEKTOR

Elektrochemický detektor využívá dějů, které souvisí s elektrochemickou reakcí na rozhraní elektroda – eluent. Schopnost elektrochemické redukovatelnosti a oxidovatelnosti látek využívá ampérometrický a coulometrický detektor. Elektrochemické detektory jsou velice citlivé (10^{-9} – 10^{-12} g/ml). Jejich nevýhodou je, že je většinou nelze použít pro gradientovou eluci. Tyto detektory měří určitou elektrickou veličinu (proud, kapacita nebo elektrodový potenciál) vyvolanou průchodem látky průtokovou celou detektorem. Měřený elektrický signál je úměrný látkovému množství detekované složky [8].

Amperometrický detektor

Amperometrické detektory (polarografické) měří proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou detektoru. Jako měrné elektrody se používají elektrody ze skelného uhlíku, grafitových vláken, zlata a platiny, mědi nebo jiného kovu. Jako srovnávací elektroda se používá kalomelová nebo argentschloridová elektroda [8].

Coulometrické detektory

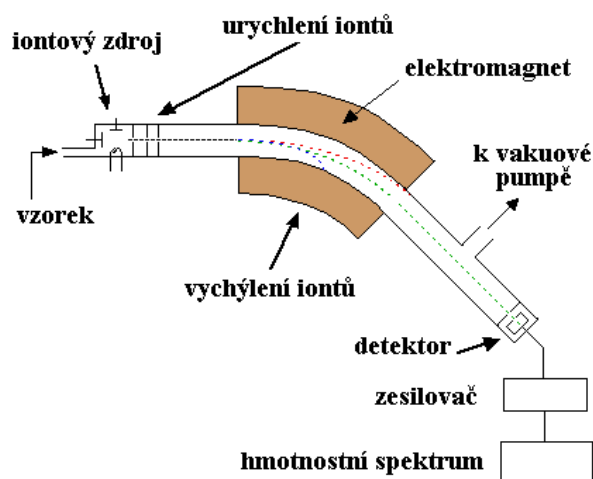
Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci nebo redukci celkového množství látky při jejím průtoku měrnou celou detektoru. Coulometrické detektory jsou citlivější než amperometrické detektory [8].

2.2 Hmotnostně spektrometrické detektory

MS (hmotnostní spektrometrie) je analytická metoda, která zaznamenává molekulovou hmotnost nabitých částic. Výhodou MS je, že lze odvodit i strukturu molekuly. MS slouží jak ke kvantitativní, tak ke kvalitativní analýze. MS poskytuje informace o čistotě vzorku [4]. MS je metoda mimořádně citlivá, destruktivní s minimální spotřebou vzorku [18]. Proces identifikace látek se odehrává ve třech krocích. Nejprve dochází k ionizaci vzorku v iontovém zdroji, poté rozdělení a urychlení iontů v analyzátoru a nakonec k detekci iontů a zesílení signálu v detektoru. Přístroj (obr.4) se skládá z několika částí:

- zařízení pro zavádění vzorku – vpraví vzorek do iontového zdroje
- iontový zdroj – z neutrální molekuly vzniká v plynném prostředí nabitá částice
- hmotnostní analyzátor – dochází k rozdělení iontů podle poměru hmotnosti a náboje
- detektor – zaznamenává separované ionty
- počítač – slouží k ovládání přístroje, sbírá a uchovává data
- vakuový systém – udržuje nízký tlak [4]

Záznam MS se nazývá hmotnostní spektrum [4]. Hmotnostní spektrum znázorňuje zastoupení jednotlivých iontů podle poměru m/z . [19].



Obr.4 : Schéma hmotnostně spektrometrického detektoru [20]

2.2.1 Iontový zdroj

V iontovém zdroji dochází k prvnímu kroku analýzy. Dochází k převodu atomů a molekul na nabitě částice v plynné fázi. V této fázi dochází k přidání nebo odebrání elektronu nebo protonu. Přebytek energie ale může vést až k fragmentaci molekul a to může vést ke snížení citlivosti. Ionizace probíhá ve vakuu nebo za atmosférického tlaku.

Princip ionizace měkkými technikami: Dochází ke vzniku protonované molekuly $[M + H]^+$ nebo deprotonované molekuly $[M - H]^-$. Když nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci molekul, jedná se o ionizační techniky měkké. Mezi měkké ionizační techniky patří např. ESI (ionizace elektrosprejem), APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku), APPI (fotoionizace za atmosférického tlaku), MALDI (ionizace desorpce laserem za účasti matrice). Mezi tvrdé ionizační techniky patří elektronová ionizace (EI). Podstatou této metody je ovlivnění elektromagnetických polí, tím dochází k uvolnění valenčních elektronů a ke vzniku molekulárního iontu M^+ (radikál-kation) [4].

IONIZACE ELEKTROSPREJEM (ESI)

ESI je typ ionizace, která probíhá za atmosférického tlaku. Eluent je rozprášen do komory za přítomnosti silného elektrostatického pole a teplého sušícího plynu.

Elektrostatický náboj způsobí disociaci molekul analytu a teplý sušící plyn vede k odpaření rozpouštědla. ESI se používá hlavně pro analýzu velkých biomolekul jako jsou proteiny, peptidy a oligonukleotidy [21].

CHEMICKÁ IONIZACE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU (APCI)

APCI je typ chemické ionizace, která probíhá za atmosférického tlaku [4]. Eluent je vstříkván do komory, kde je vysoká teplota. To vede k vypařování rozpouštědla. Molekuly jsou ionizovány pomocí jehly, na kterou je vloženo vysoké napětí. APCI lze použít u polárních i nepolárních molekul, ale nelze ji použít u termolabilních molekul [21].

FOTOIONIZACE ZA ATMOSFÉRICKÉHO TLAKU (APPI)

APPI je novou technikou, která využívá fotonu k ionizaci v plynné fázi. Výhodou metody je, že dochází k minimální ionizaci molekul rozpouštědla. APPI se používá u polárních i nepolárních molekul, ale opět není vhodná u termolabilních molekul. U vysoce polárních molekul a za použití nízkého průtoku dochází k poklesu citlivosti [21].

ELEKTRONOVÁ IONIZACE (EI)

EI je nejstarší způsob ionizace. EI se používá pro tepelně stabilní a relativně těžké sloučeniny. Celý proces probíhá ve vakuu. Při EI dochází k odpaření molekul vzorku a následnému bombardování molekul proudem elektronů za nízkého tlaku. Proud elektronů má takovou energii, že dochází až k fragmentaci molekul [4].

IONIZACE DESORPCÍ LASEREM ZA ÚČASTI MATRICE (MALDI)

Metoda se používá především pro velké biomolekuly s molekulovou hmotností nad 200 kDa. Vzorek se připraví smícháním roztoku s molárním přebytkem hostitelské matrice. Po odpaření rozpouštědla jsou molekuly vzorku – krystalky matrice ozářeny laserovým paprskem, tím dojde k ionizaci. Matrice je důležitá, protože dokáže absorbovat velké množství energie. Základní podmínky, které musí matrice splňovat je silná absorpce při vlnové délce použitého laserového záření, kompatibilita se vzorkem, tak aby vznikaly dobře definované mikrokrystaly správné velikosti, nízká teplota sublimace. Používají se pevné organické matrice, kapalné organické matrice, anorganické matrice a kapalné ionty [4].

2.2.2 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor plní dvě základní funkce. Rozděluje všechny ionty na základě poměru hmotnosti a náboje a soustřeďuje ionty o určité hmotnosti na jednom místě.

Hmotnostní analyzátoři jsou hodnoceny na základě těchto rysů:

- Rozmezí hmot – maximální přípustný poměr hmotnosti a náboje, který je přístupný pro analýzu. Vyšší hodnota je přínosem pro analýzu látek s vyšší molekulární hmotností.
- Rozlišení – schopnost rozdělení iontů s podobnou hmotností.
- Přesnost hmoty – vyjadřuje chybu v měření poměru m/z .
- Lineární dynamický rozsah – rozpětí, ve kterém je koncentrace přímo úměrná odezvě.
- Rychlost – počet získaných spekter za jednotku času. Rychlá analýza je nutná pro rychle se měnící podmínky a pomalá pro přesné měření hmotnosti.
- Citlivost – citlivost detekce je nejmenší množství analytu, které je detekováno s určitou spolehlivostí.
- Adaptabilita - možnost vybavení jako jsou některé ionizační techniky a jiná pomocná zařízení (vícekanálové pole detektoru nebo chromatografické zařízení) [4].

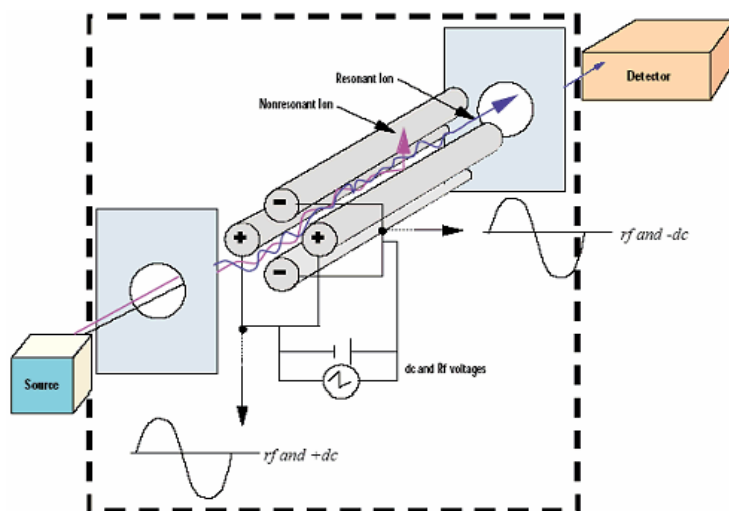
Magnetický analyzátor

Magnetický analyzátor je nejstarší typ analyzátoru. Rozlišujeme dva typy magnetického analyzátoru a to s jednoduchým nebo dvojitým zaměřením. Analyzátor s jednoduchým zaměřením využívá pouze magnetického pole a analyzátor s dvojitým zaměřením je elektrostatický analyzátor s využitím magnetického pole. Pracuje na principu zakřivení drah iontů, kdy míra zakřivení je závislá na poměru hmotnosti a náboje iontů. Dráhy těžších iontů se tolik nezakříví v důsledku větší odstředivé síly [4].

Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor je jeden z nejvíce využívaných typů analyzátoru. Analyzátor se skládá ze čtyř paralelně uložených kovových tyčí. Na tyto tyče je přiváděno napětí, které vytváří elektromagnetické pole. Elektromagnetické pole pak

určuje, které ionty na základě poměru hmotnosti a náboje propustí v daném čase. Kvadrupólový analyzátor je nejjednodušší a nejméně nákladný typ analyzátoru (obr.5) [21].



Obr.5 : Schéma kvadrupólového analyzátoru [22]

Kvadrupólový analyzátor může pracovat ve dvou režimech, skenování (SCAN) a selektivně monitorující (SIM). Při SCAN režimu se plynule mění napětí a postupně projdou na detektor ionty se všemi hodnotami m/z [21]. Při SIM režimu dochází k postupné změně napětí, střídavé elektrické pole působí oscilaci iontů a v daný okamžik jsou oscilace stabilní pouze pro určitou hodnotu m/z a tento iont projde analyzátozem zatímco ionty s jinými hodnotami m/z mají nestabilní oscilace a jsou na tyčích kvadrupólu zachyceny [4]. SIM režim je citlivější než SCAN režim, ale poskytuje informace o menším počtu iontů. SCAN režim se dá použít ke kvantitativní i kvalitativní analýze i když neznáme přesné složení vzorku. SIM režim se používá ke kvantitativní analýze a sledování cílových sloučenin [21].

Průletový analyzátor

Průletový analyzátor patří mezi nejjednodušší hmotnostní analyzátozy. V kombinaci s MALDI se jedná o hlavní techniku pro analýzu biomolekul. Skládá se z částí, kde ionty volně letí a jsou odděleny na základě poměru m/z , kdy ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii letí rychleji a tak se dostanou dříve na detektor. Průletový analyzátor je pulzní typ hmotnostního analyzátozu [4].

Iontová past

Tři elektrody vytváří kruhovou strukturu a dvě identické tvoří koncovku. Jedna z koncových elektrod má malý otvor, který může být branou pro paprsek elektronů. Druhá elektroda má několik otvorů, které slouží pro průchod iontů směrem k detektoru. Dochází ke změnám napětí a na základě toho jsou ionty vypuzovány z prostoru z tzv. iontové pasti na detektor [4].

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací

Jedná se o další typ záchytového analyzátoru. Ionty vstupují do komory, kde jsou zachyceny pomocí silného elektrického a magnetického pole, zde se pohybují po cyklotronové trajektorii s určitou frekvencí. Tyto frekvence se přepočtou pomocí Fourierovy transformace do škály hmotnostního spektra [21].

2.2.3 Hmotnostní spektrometr-detektor

Funkce detektoru je převést paprsek iontů na elektrický signál, který může být zesilován, skladován, zobrazován v podobě, ve které je snadno vnímán [11]. Detektor poskytuje informace o iontech, které vychází z analyzátoru [4]. Nejběžněji se používá detektor elektrický. Tento detektor musí být odstíněn od magnetického pole a udržován ve vakuu. K výhodám elektrického detektoru patří rychlost detekce [23]. Jako další typ detektoru se používá fotonásobič nebo Faradayova klec [4].

2.2.4 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí

Spojení MS s chromatografickými metodami bylo vždy žádoucí, vzhledem k citlivé a velmi specifické analýze pomocí MS ve srovnání s jinými detektory.

První pokusy o spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem se uskutečnily před 30 lety. V současné době je spojení kapalinové chromatografie s detekcí pomocí hmotnostního detektoru rutinní metodou. Toto spojení lze využít pro kvalitativní i kvantitativní analýzu složitých směsí biologicky aktivních látek [4]. S rozvojem ionizace pomocí elektrospreje poskytuje LC-MS jednoduché a robustní rozhraní. Nevýhodou LC-MS je vysoká pořizovací cena. Výhodou LC-MS je schopnost

analýzy několika vzorků během jediné analýzy a vysoká citlivost. Z toho důvodu jsou LC-MS analýzy nejvýznamnější pro laboratoře klinické biochemie, kde se provádí skriningové analýzy složitých vzorků [24].

2.3 Retenční data v HPLC

Retenční čas

Měření retence v eluční chromatografii může být vyjádřeno retenčním časem (t_R) přímo definovaným polohou vrcholu píku na chromatogramu. Jedná se o vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce [16].

Hmotnostní distribuční poměr

Hmotnostní distribuční poměr je známý také jako kapacitní faktor k' nebo retenční faktor k . Hmotnostní distribuční poměr (D_m) je definován jako:

$$D_m = n_s / n_m = K_c \times V_s / V_M$$

n_s – množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi

n_m – množství rozpuštěné látky v mobilní fázi

K_c – rovnovážný distribuční koeficient

V_s – objem stacionární fáze

V_M – objem mobilní fáze

Hmotnostní distribuční poměr může být určen z chromatogramu s použitím vzorce:

$$D_m = t_R - t_M / t_M$$

t_R – retenční čas (nebo objem)

t_M – mrtvý retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce [16].

2.4 Test způsobilosti systému (SST)

Test způsobilosti slouží k ověření přiměřené účinnosti chromatografického systému. Pro hodnocení účinnosti kolony se užívají tyto parametry: zdánlivá účinnost, kapacitní faktor, rozlišení, relativní retence a faktor symetrie. Mezi faktory, které mohou ovlivnit chromatografické chování patří: složení mobilní fáze a její iontová síla, teplota, zdánlivé pH, průtoková rychlost, délka kolony, teplota, tlak a vlastnosti stacionární fáze (porozita, velikost, typ částic, specifický povrch). U chromatografie s obrácenými fázemi ovlivňuje účinnost kolony také rozsah chemické modifikace [16].

Faktor symetrie

Faktor symetrie píku (A_s) (nebo faktor chvostování píku) se vypočítá ze vztahu:

$$A_s = w_{0,05} / 2d$$

$w_{0,05}$ – šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky;

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku [16].

Účinnost kolony

Účinnost kolony se charakterizuje jako její schopnost separovat složky směsi. Čím je kolona účinnější, tím lépe dokáže složky směsi od sebe oddělit. Mírou účinnosti kolony je počet teoretických pater kolony. Teoretické patro je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. Délka této části kolony se nazývá výškový ekvivalent teoretického patra H . Proto kolona o délce L má výškový ekvivalent teoretického patra: $H = L / N$. Kolona je tím účinnější, čím více má teoretických pater a čím menší má výškový ekvivalent teoretického patra. Počet teoretických pater lze určit z chromatogramu z šířky píku v základně Y_T nebo z šířky píku v polovině jeho výšky $Y_{1/2}$ a retenčního času t_r [25] :

$$N = 16(t_r / Y_T)^2 \quad \text{nebo} \quad N = 5,54(t_r / Y_{1/2})^2$$

N – počet teoretických pater

t_r – retenční čas

Y_T – šířka píku v základně

$Y_{1/2}$ – šířka píku v polovině

Podle van Deemterovy teorie vedou k rozšiřování zóny v koloně a tím k růstu výškového ekvivalentu teoretického patra tři děje:

- Vířivá difúze – molekuly mobilní fáze protékají kolem zrnec stacionární fáze, různé molekuly tak urazí různou vzdálenost. Hlavní vliv na tento faktor má velikost a tvar částic stacionární fáze a rovnoměrnost jejich uložení.
- Molekulární difúze – molekuly složky se snaží pronikat z míst s vyšší koncentrací do míst s nižší koncentrací.
- Odpor proti převodu hmoty – různé molekuly pronikají různě hluboko do stacionární fáze, čím hlouběji molekula pronikne, tím déle se v ní zdrží [25].

Rozlišení

Rozlišení mezi píky dvou složek, které mají podobnou výšku, lze získat ze vzorce:

$$R_s = 1,18(t_{r2} - t_{r1}) / w_{h1} + w_{h2}$$

kde $t_{r2} > t_{r1}$

t_{r1}, t_{r2} – retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholu dvou sousedních píků

w_{h1}, w_{h2} - šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. Pro píky, které vzájemně značně liší svými výškami, nemusí být výše uvedený vzorec vhodný [16].

Opakovatelnost

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku a vypočítá se ze vztahu [16] :

$$RSD\% = \frac{100}{y} \sqrt{\frac{\sum (y_i - y)^2}{n-1}}$$

y_i – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch

y – průměr jednotlivých hodnot

n – počet jednotlivých hodnot

2.5 Validace analytických metod

Validace je proces, kterým se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody. Cílem validace je určit podmínky, za kterých je daná metoda použitelná, vhodná a spolehlivá při opakovaném použití v jedné i v různých laboratořích.

Správnost

Vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Správnou hodnotu lze zjistit jinou nezávislou metodou nebo se připraví modelový vzorek ze všech složek přípravku a přesně přidaného standardu. Správnost se obvykle zjistí analýzou nejméně šesti vzorků a vyjádří se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost [26]:

$$\text{výtěžnost} = 100 \times \text{nalezená hodnota} / \text{správná hodnota}$$

Přesnost

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Obvykle se vzorek nezávisle šestkrát analyzuje kompletním postupem včetně přípravy vzorku. Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka šesti měření [26].

Linearita

Linearita je schopnost poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle se stanovuje minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150% deklarovaného obsahu. Pokud je metoda lineární, lze určit směrnici z jednoho kalibračního bodu. Pokud není, musí se výsledky vyhodnocovat z celé kalibrační křivky [26].

Robustnost

Vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. U HPLC se sledují zejména vlivy: složení mobilní fáze, pH vodné složky mobilní fáze, teplota na koloně, rychlost průtoku, stabilita analyzovaných vzorků, atd [26].

Selektivita

Selektivita je schopnost metody změřit správně a specificky stanovovanou látku v přítomnosti jiných látek [27].

2.6 Stanovení kyseliny askorbové a dehydroaskorbové

2.6.1 Kyselina askorbová

AA je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Působením vzduchu a vlhkosti mění barvu. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v 96% lihu a prakticky nerozpustná v etheru. Taje při asi 190°C za rozkladu. Skladuje se v nekovových obalech chráněna před světlem [16].

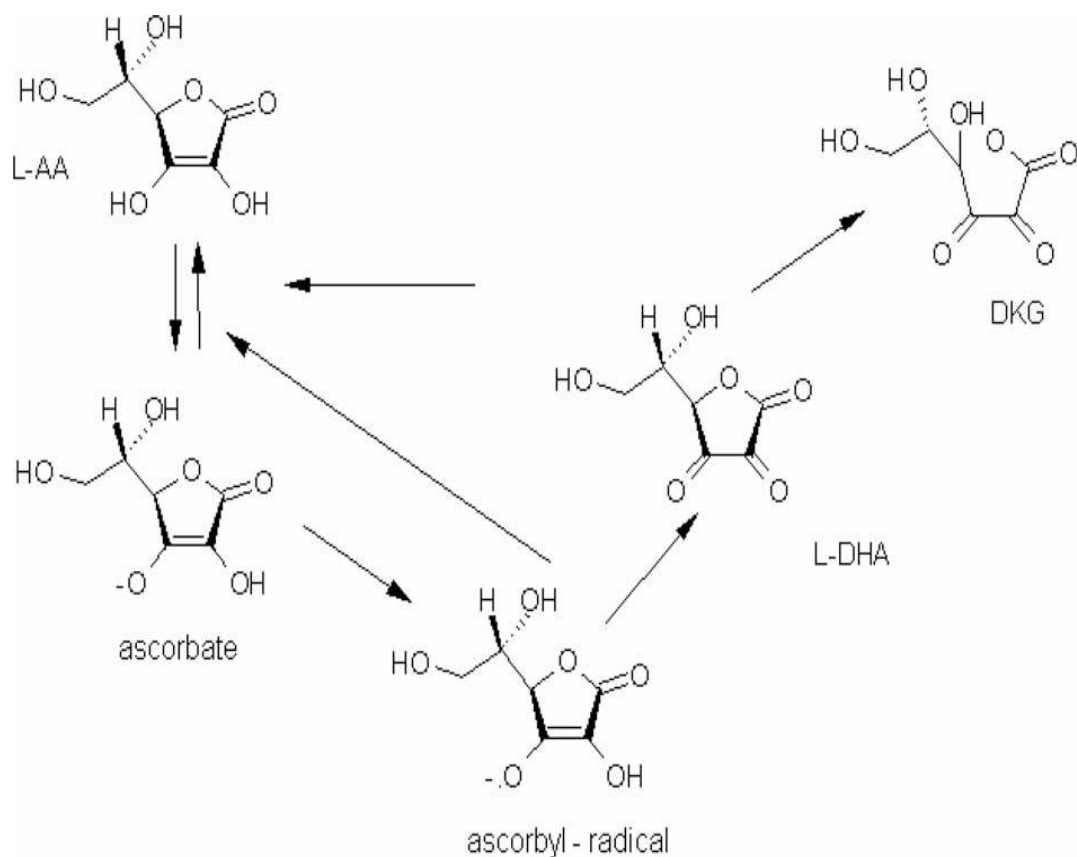
AA je velice důležitý antioxidant v našem těle a hraje nezbytnou úlohu v prevenci nemocí. AA a její oxidační produkt, DHA, jsou biomarkery, které chrání buňky před oxidačním stresem [15]. Lidské tělo vitamín C syntetizovat nedokáže a proto jej musíme přijímat v potravě. Hlavním zdrojem vitamínu C je ovoce a zelenina. Kyselina askorbová je rychle oxidována na DHA, díky přítomnosti dvou hydroxylových skupin. DHA má však pouze 5% účinku AA. Oxidační reakce je podmíněna především působením vysokých teplot, vysokého pH, světla, přítomnosti kyslíku a kovových iontů. Tato reakce je vratná a je podmínkou antioxidantního působení AA. Úloha AA v metabolismu je komplexní. Ochrana před působením volných radikálů je nejdůležitější. Dále je vitamín C potřebný pro aktivitu dopamin β -hydroxylasy, pro syntézu kolagenu, ochranu před onemocněním srdce a cév i před rakovinou. Poměr AA a DHA je ukazatel redoxního stavu organismu. Z tohoto důvodu je důležitá metoda pomocí níž lze stanovit jak AA, tak DHA v biologických materiálech. Mnoho metod je založených na vratných redoxních reakcích AA a DHA,

jsou ale málo specifické a výsledek může být ovlivněn přítomností redukčních činidel [17].

2.6.2 Kyselina dehydroaskorbová

DHA i AA jsou známé jako biomarkery oxidativního stresu. In vivo existuje vitamín C především v redukované formě, kdy po oxidaci dochází ke vzniku semidehydroaskorbylového radikálu a konečným produktem oxidace je DHA, která se dostává do buněk (obr.6) [28]. DHA je tedy oxidovanou formou vitamínu C. Vitamín C se uplatňuje v mnoha funkcích uvnitř buněk, kam se dostává specifickým membránovým transportem. Tento transportní systém je vysoce specifický pro AA a druhý transportní systém je specifický pro DHA. DHA je přenášena pomocí GLUT transportního systému pro glukosu. U přenosu DHA se uplatňují zejména isoformy GLUT1, GLUT3 a GLUT4 [29]. Poměr AA a DHA je ukazatelem redoxního stavu organismu [17]. Koncentrace DHA jsou udržovány na poměrně nízkých hladinách, proto i malé zvýšení její hladiny vede k odpovědi na environmentální stres.

K redukci DHA zpět na AA může dojít několika způsoby: pomocí ferredoxinu, který se nachází v chloroplastech rostlin, pomocí NADPH dependentní MDA reduktasy nebo pomocí dehydroaskorbátreduktasy [30].



Obr.6 : AA a její rozkladné produkty [17]

2.6.3 Současné stanovení AA a DHA

Hlavním problémem stanovení AA a DHA je jejich nestabilita ve vodném roztoku. Negativně působí na stabilitu AA a DHA vysoká teplota, přítomnost kyslíku, vysoké pH, světlo a kovové ionty. Proto je důležité snížit působení těchto faktorů na minimum [28]. Překážkou při současném stanovení AA a DHA je také skutečnost, že AA velice snadno přechází na DHA a DHA se rychle mění na inaktivní sloučeninu. Dále je potíž při výběru vhodné detekce. AA a DHA vykazují maximum absorbance při různých vlnových délkách, nevykazují fluorescenci a vzorek se tak musí upravit derivatizací, čímž mohou vznikat chyby v měření [17].

2.6.3.1 Stabilita AA a DHA

AA je stabilní ve formě pevné krystalické látky nebo v kyselém roztoku [31]. Naopak je velice nestabilní v biologickém materiálu, kde snadno dochází k degradaci nebo oxidaci. Z toho důvodu se ke vzorku přidávají stabilizační přísady jako je EDTA, MPA (kyselina m-fosforečná) a další látky, které vedou ke srážení proteinů. Dalším způsobem je zmrazení vzorku na velmi nízké teploty, aniž by byla přidána stabilizační látka [32]. Na stabilitu AA a DHA působí:

- Vliv světla – AA i DHA snadno podléhají degradaci působením světla. Byla porovnáвана stabilita roztoku AA v hnědých a průhledných baňkách bez zátky za pokojové teploty. Bylo zjištěno, že nejvíce stabilní je roztok AA chráněný před světlem [33].
- Vliv teploty – Teplota je jeden z klíčových faktorů, které ovlivňují stabilitu AA a DHA v roztoku. Byla testována stabilita roztoku AA při teplotě 4 °C, 10 °C a 25 °C. S rostoucí teplotou stabilita roztoku AA klesala. Při teplotách 60 a 80 °C klesla koncentrace AA během jedné hodiny na 20 % původního obsahu [33].
- Vliv pH – Roztok AA je stabilnější v kyselém prostředí. Při nízkém pH nedochází k rozkladu AA na askorbát. Byla porovnáвана různá extrakční činidla o různých hodnotách pH, následně byla sledována stabilita roztoku AA. Obecně platí, že kyselé pH kolem 2,1 bylo dostatečné pro stabilitu roztoku AA. Nejčastěji se jako rozpouštědlo použila metafosforečná kyselina, někdy v kombinaci s EDTA nebo organickými přísadami jako je metanol a ACN [33].
- Vliv koncentrace – Stabilitu AA a DHA ovlivňuje i koncentrace jejich roztoků. Byla studována stabilita AA při různých koncentracích a následně bylo zjištěno, že stabilita roste s rostoucí koncentrací. Stabilita se výrazně snižuje při koncentraci nižší než 0,1 mg/l [33].
- Vliv stabilizátorů – Pro zvýšení stability se často používají stabilizační přísady. Jako stabilizační činidlo se používá např. kyselina trichloroctová, kyselina o-fosforečná, homocystein, kyselina šřavelová, trifluoroctová kyselina, ditiotritol nebo kombinace trichloroctové kyseliny s EDTA [33].

- Vliv kovových iontů – Kovy výrazně snižují stabilitu AA v roztoku, z toho důvodu se přidávají chelatační činidla. Jako chelatační činidlo lze použít EDTA, která kovové ionty váže a tím stabilitu zvýší. Byla posuzována přítomnost různých iontů na stabilitu roztoku AA. Bylo zjištěno, že největší vliv na degradaci AA měly ionty měďnaté [33].

2.6.3.2 Metody stanovení AA a DHA

Stanovení AA a jejích produktů je poměrně náročné, protože AA je velice nestabilní. V posledních letech bylo vyvinuto mnoho metod pro stanovení AA a DHA založených na různých analytických principech. Řada metod byla založena na vratné redoxní reakci AA-DHA. Tyto metody byly málo specifické, často ovlivněné jinými redukčními činidly. Spektrofotometrické a enzymatické metody byly ovlivnitelné jinými analyty jako jsou ionty mědi a železa, cukry nebo kyselina glukuronová.

Nejvíce preferovanou metodou je HPLC, protože poskytuje nejvyšší selektivitu a je vysoce citlivá. Nejvíce se využívá UV detektor nebo ED (elektrochemická detekce) [15]. UV detekce je ale málo citlivá metoda pro stanovení AA a DHA v biologických materiálech. AA má maximum absorpance v rozmezí 244 – 265 nm. Pro DHA je maximum absorpance při vlnové délce 185 nm, ale určitou absorpanci vykazuje i nad 220 nm. Pro současné stanovení AA a DHA je nezbytná derivatizace DHA. Chromatogram je zaznamenáván při 360 nm. Další způsob stanovení AA a DHA s využitím UV detekce je subtrakční postup. Pomocí redukce DHA, dojde k přeměně DHA na AA a stanoví se celkový obsah AA. V původním vzorku se stanoví obsah počáteční AA. Množství DHA se vypočítá jako rozdíl původní AA a celkové AA po redukci DHA [17]. Méně se využívá detektor fluorescenční [15]. Nevýhodou použití fluorescenčního detektoru pro stanovení AA a DHA je, že AA a DHA nemají fluorescenční vlastnosti a proto se před stanovením musí upravit derivatizací [17]. Nejvyšší citlivost a selektivitu poskytuje MS detektor, ale pro vysokou pořizovací cenu a provozní náklady je pro mnoho laboratoří nedostupný. HPLC-ED poskytuje vysokou citlivost a selektivitu a eliminuje interference mezi složkami. AA je poměrně reaktivní a snadno detekovatelná pomocí coulometrických a amperometrických systémů. DHA je ale elektrochemicky inaktivní, a proto musí být stanovena pomocí postupu subtrakce [33]. Základní přístupy pro stanovení AA a DHA pomocí LC jsou: RP-HPLC, iontově

výměnná, iontově párová a iontově vylučovací chromatografie. Mobilní fáze, které se u těchto metod používají jsou často složité, obsahují více než dvě složky s různými modifikátory nebo činidly a proto je v poslední době oblíbená HILIC chromatografie pro svou jednoduchost [17]. Přehled chromatografických stanovení AA a DHA v letech 2005 – 2010 je podrobněji rozepsán v Tab.1.

Reverzní fáze

Chromatografie na reverzní fázi se využívá k analýze AA a DHA velice často. Dochází však ke špatnému oddělení AA od mrtvého retenčního času. Pro získání dostatečné retence se používá vysoké procento vodné složky často ve formě anorganické/organické kyseliny nebo anorganického pufru v kombinaci s nízkým pH. Pro potlačení vzniku iontů je nutné použít hodnotu pH mobilní fáze o 2 jednotky nižší než pKa AA. Pro svou kyselost je často používána v RP-HPLC kyselina chloristá, má silnou potlačovací aktivitu již při nízkých koncentracích, používá se pro stanovení organických kyselin.

Pro stanovení AA a DHA se jako mobilní fáze používá kyselina trifluoroctová, sírová a fosforečná při pH 2. Jedna ze dvou hlavních nevýhod je použití 100% koncentrace vody jako mobilní fázi. Vodná mobilní fáze neobsahující organické modifikátory může negativně ovlivnit separační účinnost stacionární fáze C₁₈ a při dlouhodobém používání může dojít až k tzv. hydrofobnímu kolapsu stacionární fáze [17]. Druhým problémem je nízké pH, které urychluje rozpad silikagelových kolon. Tento problém může být vyřešen použitím presaturační kolony nebo použitím stabilního nosiče jako je oxid zirkoničitý nebo polymer, které mají vyšší chemickou stabilitu [17].

Iontově párová chromatografie

Iontově párová chromatografie je separační metoda, která zlepšuje nebo umožňuje separaci sloučenin iontové povahy. Jako iontově párová činidla se používají sodné soli alkylsulfonových kyselin k separaci sloučenin kationtového typu a N-alkyl kvartérní amoniové soli k separaci sloučenin aniontového typu [8].

Tab.1 : chromatografické metody použité pro stanovení AA a DHA – 1. část [33]

látko	zdroj	stacionární fáze	mobilní fáze	detekce	AA t _R	validační data	rok
		analytická kolona					
AA	vína	lontově vylučovací PLRP- S 100A (150x4,6 mm, 5 µm)	A: voda-trifluoroctová kyselina (99:1) B: ACN-A (80:20)	UV 243 nm	2,3	r ² =0,999 rec>95% RSD=0,8-2,2% LOD=1mg/l LOQ=5mg/l	2006
AA AA-2G a další deriváty AA	enzymové hydrolyzáty	Interstill CN-3 (250x4,6 mm, 5µm)	metanol 28,6mM H ₃ PO ₄ -NaH ₃ PO ₄ pH 2,1 (65:35) 20mg/l ditiotritol	UV 240 nm	4,5	r ² =1,000 rec=97,3-106,3% RSD=0,5-2,9%	2006
AA,DHA redukce Dtt	banán,papaya mango,ananas	lontově vylučovací Shodex Rspak KC-811 (250x4,6 mm, 5µm)	0,2% o-fosforečná kyselina	UV 245 nm	6	rec=99±6% LOD=0,1 mg/l	2006
AA,iso-AA	potraviny obohacené alkoholem	lontově párová LiChrospher RP-18 (250x4,6 mm, 5µm)	ACN octan sodný pH 5,4 decylamin, TCEP	UV 265 nm	12,8	r ² =0,9999 rec=99,7-105% LOD=0,1µm/100g	2006
AA cukry, organické kyseliny	ostružiny	Ultrasphere ODS (250x4,6 mm, 5µm)	0,5% m-fosforečná kyselina	DAD 200-360 nm		r ² >0,99	2006
AA,acetaminofen,DHA derivatizace OPDA	léčiva	lontově párová Phenomenex Synergie 4u hydro RP (150x4,6 mm, 5 µm)	5mM CTMAB 0,04% Na ₃ PO ₄ pH 3,5 ACN (90:10)	UV 245 nm 360 nm	4	RSD≥1,40% rec=99,7-101,8% LOQ=50pmol	2007
AA,DHA redukce DTT nebo BAL	jahody, rajčata jablka	1.C18Spherisorb ODS2 (250x4,6 mm, 5µm) 2.NH ₂ -Spherisorb S5 (250x4,6 mm, 5µm)	1.0,01% H ₂ SO ₄ pH 2,6 2.10mM KH ₂ PO ₄ pH 3,5 ACN (60:40)	UV 245 nm		rec=93,6-104,4% RSD=0,6-3,9% LOQ<0,61mg/100g LOD<0,18mg/100g	2007
AA,iso-AA AA-2G,AA-2βG	potraviny nápoje	HILIC Interstil Diol (250x4,6 mm, 5µm)	ACN:66,7 mM octan amonný (85:15)	UV 260 nm	8	r ² =0,996 RSD intra=0,5-2,8% RSD inter=0,5-2,1% Výtěžnost inter=98,7-105,8% Výtěžnost intra=99,1-104,1% LOD=0,3 µg/ml	2007

Tab.1 : Chromatografické metody pro stanovení AA a DHA – 2. část [33]

látka	zdroj	stacionární fáze	mobilní fáze	detekce	AA t _R	validační data	rok
		analytická kolona					
L-AA, L-DHA derivatizace OPDA	potraviny	NovaPak C18 (150 x 3,9 mm, 4 μm)	80mM fosfátový pufr pH 7,8 metanol (84-16%)	FD 355 nm 425 nm	1,89	r ² =0,9997 LOQ=0,82 μg/ml LOD=0,27 μg/ml	2007
AA, kys.šřavelová, kys. citrónová, kys. maleová kys.cis-akónitová,kys. chinová,kys,fumarová	castanea sativa	Iontově vylučovací Nucleogel Ion 300 OA (300 x 7,7 mm, 7 μm)	0,01M H ₂ SO ₄	UV 214 nm	30	neposkytnuto	2007
AA	polotuhá kosmetika	LiChospher 100-RP 18	0,2% <i>m</i> -fosforečná kys. (90:8:2)	UV 254 nm	3,5	rec=95,46-101,54% RSD inter=1,22% LOD=0,05 μg/ml LOQ=0,17 μg/ml	2007
AA,UA,iso-AA=IS	plasma	Iontově párová Supelco LC 18DB (250 x 4,6 mm, 5 μm)	40 mM octan sodný 1,3 mM Na ₂ EDTA 1,5 mM DTEAP 7,5% metanol pH 4,65 upravené CH ₃ COOH	ECD 280 mV	3,2	výsledky uvedeny pro stabilitu	2007
AA, DHA-redukce DTT vitamin E mastné kyseliny	lidské mléko	Spherisorb ODS2 C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)	metanol octová kyselina (95:5)	UV 254 nm		rec=95,06±1,12% RSD=2,44% RSD=3,63%	2008
AA vitaminy E a A železo, selen	kojenecké mléko v prášku	Spherisorb ODS2 C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm)	metanol octová kyselina (95:5)	UV 254 nm		rec=95,06±1,12% RSD=2,44% RSD=3,63%	2008
AA IS=chlorogenová kyselina	tablety	ZIC-HILIC	ACN:50mM octan amonný pH 6,8 (78:22)	UV 268 nm	4,6	rec=98,81±104,45% RSD=3,04-3,72% r ² =0,9995	2008

Tab.1 : Chromatografické metody pro stanovení AA a DHA – 3. část [34,35,36,37,38]

látka	zdroj	stacionární fáze	mobilní fáze	detekce	AA t _R	validační data	rok	citace
		analytická kolona						
AA,DHA	tablety	Luna HILIC (100x3,0 mm, 5 μm) Obelisc N (100x3,2 mm, 5 μm) Obelisc R (100x3,2 mm, 5 μm)	ACN:75mM octan amonný pH 4,2 (15:85)	UV 268 nm 210 nm CAD	4	rec=98,50-100,72% RSD=2,23-4,63% LOQ=5,0 μg/ml LOD=1,5 μg/ml	2009	[34]
AA,DHA,UA IS=homogentisinová kyselina	lidská plasma	YMC ODS-AQ 3,0mm x 150mm, 3μm Hypersil Gold C ₁₈ 2,1mm x 20mm, 1,9 μm 2,1mm x 100mm, 1,9 μm	A:metanol B:150mM chloroctová kyselina 2mM edetan disodný pH 3 upravené NaOH	ED 450 mV		r ² =0,97-0,99	2009	[35]
AA,lykopen	šťáva z vodního melounu	Spherisorb ODS 2 4,6 mm x 250 cm, 5 μm	0,01% H ₂ SO ₄ pH 2,6	UV 245 nm		výsledky uvedeny pro stabilitu	2009	[36]
DHA	myší plasma, myší tkáň	Atlantis dC18 (150x4,6 mm, 5 μm) Atlantis dC18, předkolona (20x4?6 mm, 5 μm)	50 mM fosfátový pufr pH 2,8 540 μm EDTA 2% ethanol	ED 0,6 V	2,5	neposkytnuto	2010	[37]
L-AA	salát, mrkev, květák, zelí, rajčata, čekanka	Microsorb-MV C18 (250x4 mm, 5 μm)	H ₂ O s AMP pH 2,2:ACN s 10 mM tetrabutylbromid	UV-VIS 238 nm		neuveдено	2010	[38]

AA-2G	2-O-α-D-glukopyranosyl-L-askorbová kyselina	DAD	detektor s diodovým polem	GSSG	oxidovaný glutation	<u>lontově párová činidla</u>		
AA-2βG	2-O-β-D-glukopyranosyl-L-askorbová kyselina	DTT	dithiotreitol	OPDA	o-fenyldiamin	CTMAB	cetyltrimetylamonium bromid	
BAL	2,3-dimerkapto-1-propanol	IS	vnitřní standard	TCEP	[2-karboxyetyl]fosfan	DTEAP	dodecyltrietylamonium fosfát	
CAD	Charged Aerosol Detektor	GSH	glutation	UA	kyselina močová	DTMACI	dodecyltrimetylamonium chlorid	

Iontově párová chromatografie se často používá k analýze AA a DHA. Jako mobilní fáze se využívají hlavně anorganické pufrů. Anorganické soli mohou ucpat prvky průtokové linie vstupní a výstupní ventily a to může vést k jejich nesprávné funkci. Změna vodného pufru na mobilní fázi s vysokým obsahem organických rozpouštědel musí být prováděna opatrně a postupně, aby nedošlo k precipitaci pufru.

Další nevýhodou je, že anorganické pufrů nejsou kompatibilní s MS detekcí, protože nejsou těkavé. Mobilní fáze je komplexní a často se skládá z pěti i více složek. Reprodukovatelnost a selektivita těchto metod bývá nízká. Retence pak závisí na typu a koncentraci iontově párového činidla a typu analytické kolony. Tato činidla nejsou doporučena pro LC-MS, protože často zůstávají uvnitř iontového zdroje a poskytují falešně pozitivní výsledky i dlouho po jejich použití [17].

Další nevýhodou je, že snižují životnost kolon a proto se musí provádět optimalizace velice opatrně a s co nejnižšími koncentracemi. Iontově párová činidla často vedou ke snižování stability separace nebo mohou vést ke zvyšování tlaku s každým dalším nástřikem vzorku. Hrozí i možnost precipitace s ostatními složkami mobilní fáze. Z těchto důvodů není iontově párová chromatografie ideální metodou v moderní analytické laboratoři [17].

Iontově výměnná chromatografie

Iontově výměnná chromatografie využívá měniče iontů, což jsou nerozpustné látky. Tyto látky ve styku s vodnou fází uvolňují elektrostatickou disociací ionty, které mohou být nahrazeny ionty z roztoku, které mají k měniči větší afinitu. Proces iontové výměny je vratný děj, který závisí na afinitě iontů k měniči a hlavně na jejich koncentraci [39].

Tato metoda byla použita jako první k analýze AA. AA lze dobře zadržet na aniontové výměnné stacionární fázi typu SAX (silný aniont), protože se chová jako slabá kyselina. Jako mobilní fáze se využívají anorganické pufrů nebo kyseliny s nízkou hodnotou pH. Tato metoda se nestala příliš populární pro stanovení AA a DHA [17].

Iontově vylučovací chromatografie.

Stacionární fáze je založena na sulfonované sférické PS/DVB (polystyren/divinylbenzen) pryskyřici v různých iontových formách (Polypore H nebo Nucleogel Ion 300). Mobilní fází bývá často silná anorganická kyselina (kyselina sírová, fosforečná, sulfonová) bez organické modifikace. Retence je kontrolována na

základě elektrostatických repulzních sil, hydrofobních interakcí a velikostního rozdělení. Funkční skupina (SO_3^-) nebo (SO_3^{2-}) ionexu odpuzuje stejně nabitě ionty elektrostatickou silou a brání jim ve vstupu do PS/PVD (polystyren/polyvinylpyridin) systému. Silně ionizované rozpuštěné látky jsou pak z pórů systému vyloučeny.

Neutrální rozpuštěné látky nejsou ovlivněny elektrostatickými silami, k jejich separaci dochází na základě hydrofobních interakcí. Slabě ionizované látky jako jsou organické kyseliny včetně AA i DHA jsou eluovány někde mezi, díky elektrostatickým silám a částečné penetraci do pórů, kde dochází k hydrofobním interakcím. Velikostní rozdělení také ovlivňuje retenci, kdy větší molekuly jsou vyloučeny ze systému pórů.

Tento typ chromatografie je ve srovnání s RP nebo ionto-výměnou chromatografií elegantnější typ chromatografie. Stacionární fáze je stabilní i při nízkém pH díky polymernímu základu [8].

HILIC – chromatografie hydrofilních interakcí

Hydrofilní interakční chromatografie slouží k separaci hydrofilních polárních sloučenin [8]. Stacionární fáze je polárního charakteru, obvykle obsahuje hydroxyethyl, diolovou nebo amino skupinu. Výhodou HILIC je možnost využití LC-MS s vysokou citlivostí [17].

HILIC je alternativou ke konvenční RP-HPLC nebo NP-HPLC. Je výhodná pro malé polární molekuly, které jsou slabě zadržovány nebo vymývány s mrtvým objemem při použití RP-HPLC. NP-HPLC byla často nahrazována HILIC z důvodu špatné reprodukovatelnosti, nízké rozpustnosti analytů v NP-mobilní fázi a kvůli problémům při spojení s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie.

Retence analytu je založena na rozdělování mezi vrstvou hydrofilní stacionární fáze obohacené o vodu a poměrně velkým množstvím hydrofobního eluentu, tím bývá nejčastěji směs 5-40 % vody a ACN. Mobilní fáze obsahuje vysoké procento organických rozpouštědel a pouze malou část vody nebo těkavých pufrů [8]. Mezi pufrů, které jsou vhodné pro HILIC patří amonné soli, nejčastěji octanu nebo mravenčanu. Doporučované jsou i octová a mravenčí kyselina pro svou dobrou rozpustnost v organickém rozpouštědle i při vysokých koncentracích. Při použití fosfátů a jiných pufrů s nízkou rozpustností hrozí riziko srážení [12].

Primárním principem separace je rozdělování na základě vodíkových vazeb. Hydrofilnější stacionární fáze více poutá vodu z mobilní fáze a retence solutu se zvyšuje. Retenční mechanismus tak lze vysvětlit jako rozdělování solutu mezi na vodu

bohatší stacionární fázi a na vodu chudší mobilní fázi [8]. Eluce je umožněna zvyšováním polarit stacionární fáze, dochází tak ke zvyšování podílu vodné složky [17]. Retence se zvyšuje s polaritou analytu a snižuje se zvýšením polarit mobilní fáze. Sekundárním mechanismem, který může ovlivnit selektivitu jsou elektrostatické interakce s nabitou stacionární fází [8]. Nevýhodou elektrostatických interakcí je potřeba solí nebo pufrů v mobilní fázi, které mohou narušit interakce analytu. Vyšší koncentrace pufrů mohou vést ke snížení citlivosti hmotnostního detektoru [12].

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Acetonitril LC-MS Chromasolv, FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ČR

Kyselina mravenčí 98-100% puriss p.a., Riedel de Haen

Kyselina octová, FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ČR

Kyselina trifluoroctová, FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ČR

Roztok hydroxidu amonného, FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ČR

Kyselina L-askorbová, FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ČR

Kyselina dehydroaskorbová, FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ČR

Ultračistá voda Millipore MilliQRG, Millipore Corp., USA

3.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo

Laboratorní pH metr Microprocessor pH Meter pH 212, Hanna instruments, USA

Kapalinový chromatograf, ACQUITY ULTRA PERFORMANCE LC, WATERS

Sample manager, Binary solvent manager,

Detektor, Micromass QUATTRO Micro API, ESCI kombinovaný iontový zdroj

Kolony:

- ACQUITY UPLC BEH HILIC, (2,1 x 100 mm) 1,7 μm , WATERS
- ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (2,1 x 100 mm) 1,7 μm , WATERS
- ACQUITY UPLC BEH AMIDE (2,1 x 100 mm) 1,7 μm , WATERS

3.3 Příprava mobilní fáze a analytů

Pro ředění a přípravu všech roztoků byla použita výhradně ultračistá voda filtrovaná přes 0,20 μm membránový filtr.

3.3.1 Příprava mobilní fáze

Složení mobilní fáze mělo zásadní vliv na retenci analytů. Organickou složkou mobilní fáze byl ACN. Kromě ultračisté vody byly použity 0,1%, 0,05%, 0,01%

kyselina mravenčí, 0,1%, 0,05%, 0,01% kyselina octová, které byly připraveny přidáním daného množství kyseliny mravenčí nebo octové do vody.

Dalšími vodnými složkami byl 5 mM, 1 mM, 0,5mM mravenčan amonný o pH 3,5, dále 7,5 mM a 5 mM octan amonný o pH 4,4 a pH 6,8. Byly připraveny přidáním daného množství kyseliny octové nebo mravenčí do vody a následně titrovány hydroxidem amonným na předepsanou hodnotu pH. Roztoky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky a doplněny ultračistou vodou po rysku.

3.3.2 Příprava analytů a vzorků

Roztok AA byl připraven rozpuštěním 0,00085 g v 50 ml odměrné baňce ve směsi ACN:H₂O v poměru 50:50. Roztok DHA byl připraven rozpuštěním 0,00085 g v 50 ml odměrné baňce ve směsi ACN:H₂O v poměru 50:50. Bylo naváženo 0,00085 g AA i DHA z důvodu dostatečné odezvy detektoru. 100 µl AA a 100 µl DHA bylo vpraveno do vialky a doplněno na 1000 µl. Koncentrace AA a DHA byla 10⁻⁵M.

Dalšími použitými rozpouštědly standardů AA a DHA byly 0,1 % kyselina mravenčí, 0,1 % kyselina octová a 0,1 % kyselina trifluoroctová (TFA).

3.4 Optimalizace metody

Při vytváření LC-MS metody je mnoho podmínek, které musí být optimalizovány. Aktuální podmínky jsou vysoce závislé na povaze analytu, ale i na LC separaci. Každý analyt vyžaduje individuální optimalizaci. Citlivost je vysoce závislá na použitém přístroji a podmínkách stanovení. Povahou analytu bude do značné míry určena použitá technika ionizace. Podstatný vliv na kvalitu výsledků má čistota činidel a rozpouštědel [24].

Pro optimalizaci metody byly použity analytické kolony BEH Shield RP C18, BEH HILIC a BEH Amide. Průtoková rychlost byla nastavena na 0,3 ml/min a objem nástřiku byl 5 µl. V rámci optimalizace byl sledován vliv pH, koncentrace a složení mobilní i stacionární fáze na retenci a stabilitu AA a DHA. Dále bylo nutné zjistit vhodné parametry pro nastavení hmotnostního detektoru, jako je nastavení iontového zdroje a nastavení analyzátoru v jednotlivých módech jako je SIM (sledování

vybraného iontu-selected ion monitoring), SRM (sledování produktu rozpadu iontu-selected reaction monitoring) a skenu jednotlivých iontů.

3.5 Test způsobilosti

Byl proveden SST (system suitability test), test vhodnosti systému pro konkrétní analýzu (při MS detekci se sleduje pouze opakovatelnost nástřiků, byly sledovány retenční časy a plochy píků). Tento test zajišťuje přesnost a reprodukovatelnost měření. Bylo provedeno deset nástřiků standardu AA a DHA.

3.6 Validace metody - Linearita a citlivost

Validace metody byla pouze částečná, probíhala za použití metody vyvinuté na koloně BEH Shield RP C18 při průtoku 0,3 ml/min a nástřik byl 5 μ l. Jako mobilní fáze byla použita směs ACN:H₂O v poměru 65:35.

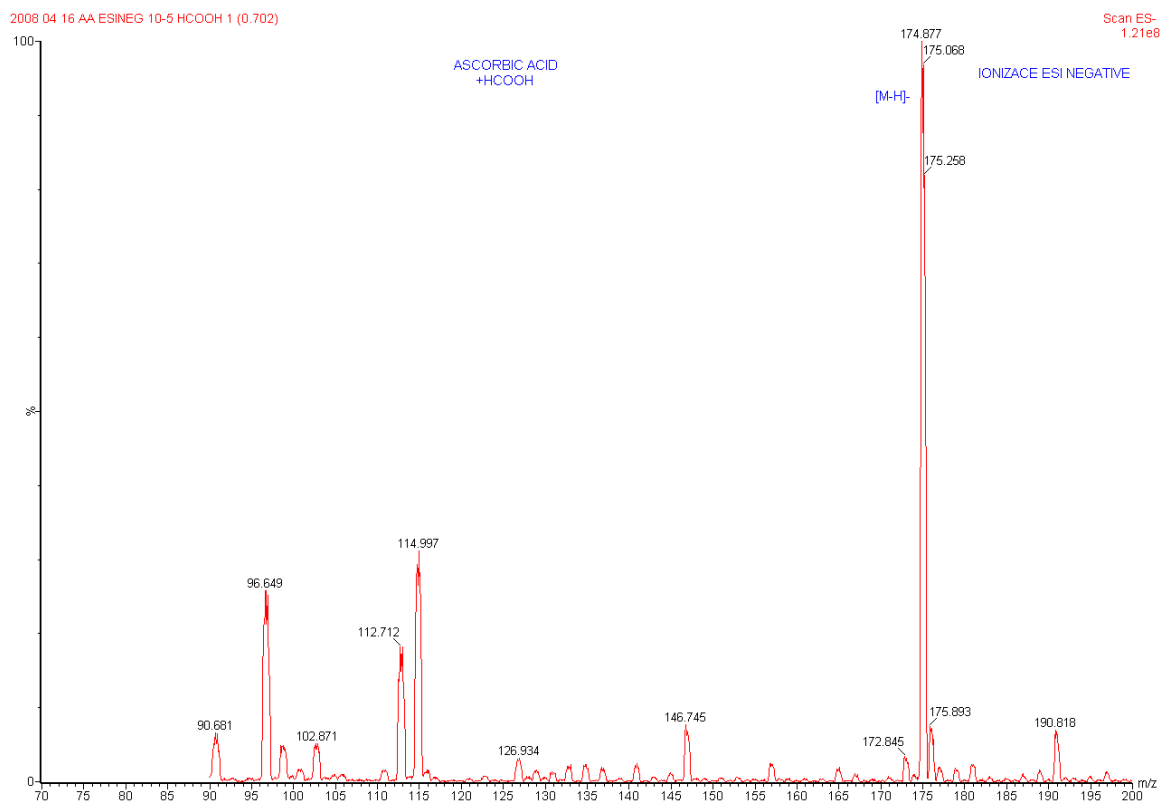
Kalibrační křivka byla sestavena na základě měření roztoků standardů AA a DHA v koncentračním rozmezí 5×10^{-6} – 5×10^{-9} g/ml. Jednotlivé roztoky byly připraveny zředěním na příslušné koncentrace (5 μ g/ml, 2 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0,5 μ g/ml, 0,2 μ g/ml, 0,1 μ g/ml, 0,05 μ g/ml, 0,02 μ g/ml, 0,01 μ g/ml, 0,005 μ g/ml, 0,002 μ g/ml, 0,001 μ g/ml). U každé koncentrace byly provedeny dva nástřiky. Aby byla metoda použitelná pro stanovení, je nezbytné, aby byla kalibrační křivka lineární. Dále byl stanoven limit detekce a limit kvantifikace.

4. Výsledky a diskuse

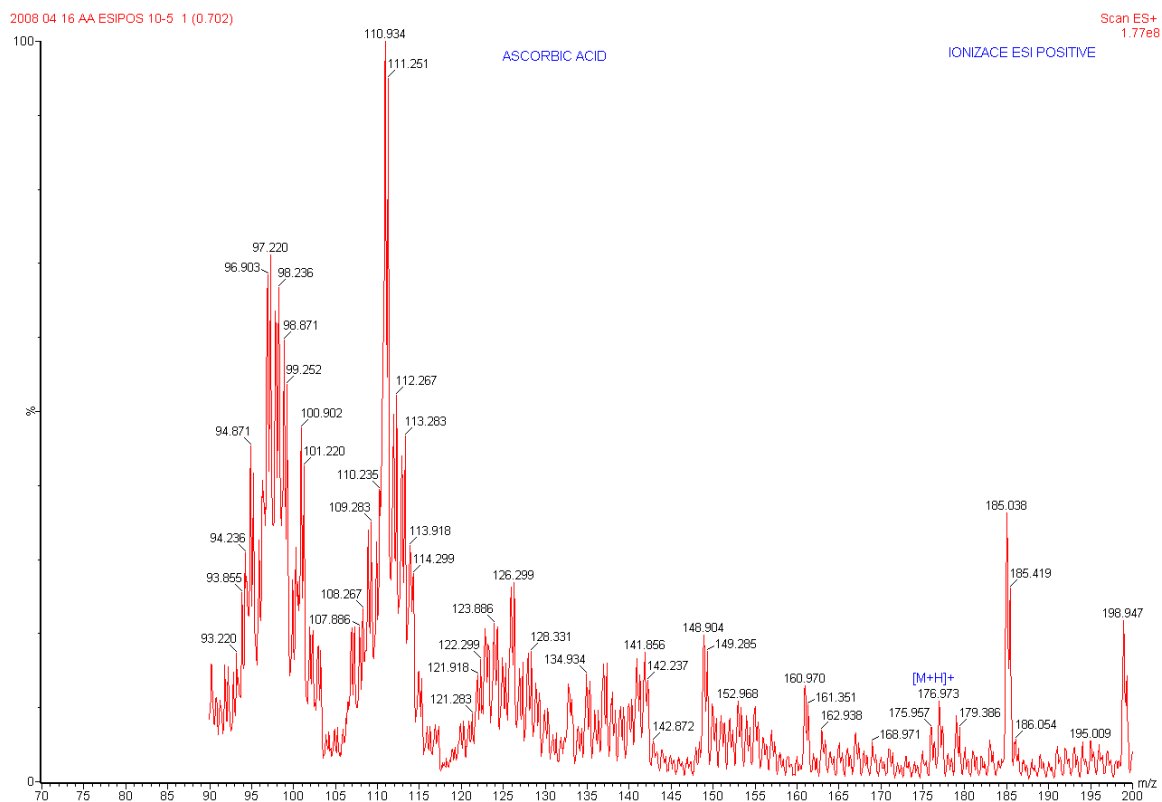
4.1 Optimalizace podmínek stanovení AA a DHA

4.1.1 Výběr ionizační techniky

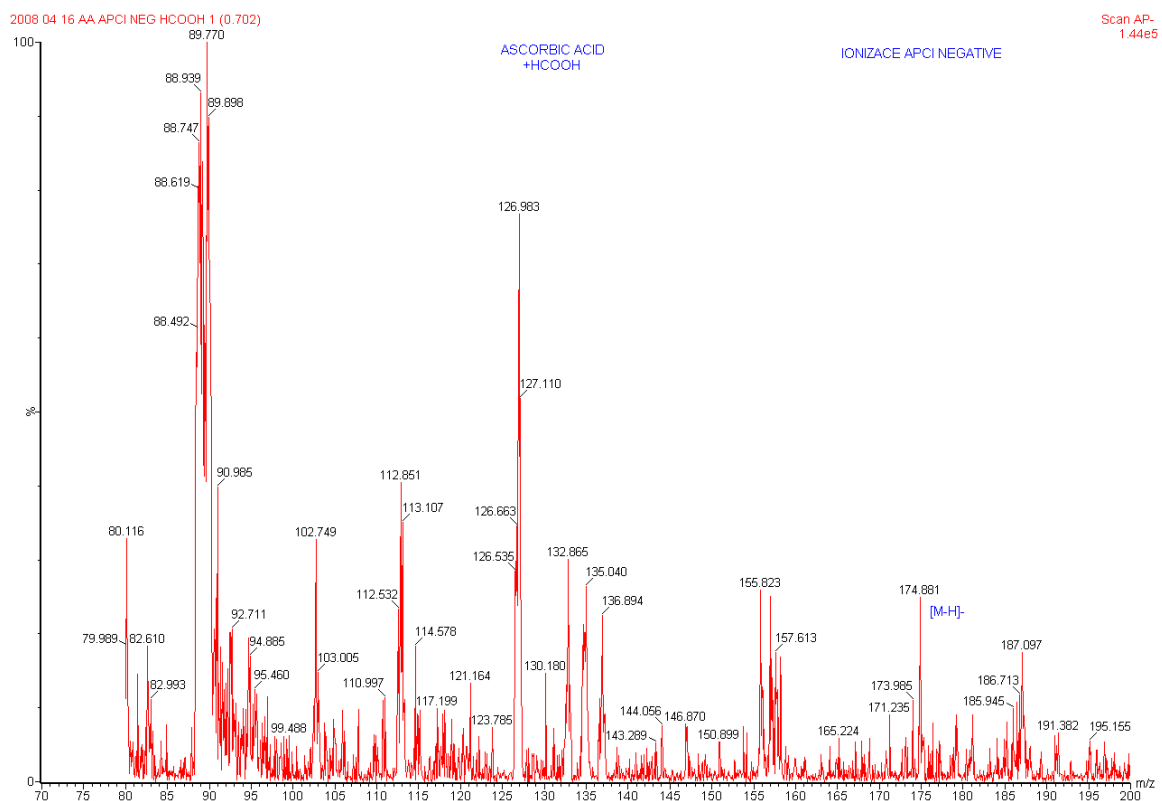
Byla provedena předběžná měření při dvou typech ionizace a to ionizace elektrosprejem a chemická ionizace za atmosférického tlaku a obě měření byly provedeny v pozitivním i negativním režimu (obr.7-14). Nejlepší výsledky byly získány při ionizaci elektrosprejem v negativním režimu (ESI-). ESI je technika, která je výhodná u látek termolabilních a polárních, proto ji lze využít pro ionizaci vitamínu C, který je citlivý na vysokou teplotu a má polární charakter. Pomocí tohoto typu ionizace došlo ke vzniku záporně nabitých molekul, kdy došlo k fragmentaci neutrálních molekul AA a DHA za vzniku záporných iontů. Došlo ke ztrátě protonu, kdy platí $[M-H]^- = x-1$. Pro AA $x=176,09$ a pro DHA $x=174,02$. $[M-H]^-$ pro AA=175,09 a $[M-H]^-$ pro DHA=173 ($x = M_r -$ relativní molekulová hmotnost). Další fragmentací AA pak vznikaly ionty o molekulové hmotnosti 131,12 a 115,2 a 87,9. Další fragmentací DHA vznikaly molekuly o molekulové hmotnosti 143,11 a 112,96 a 99,23.



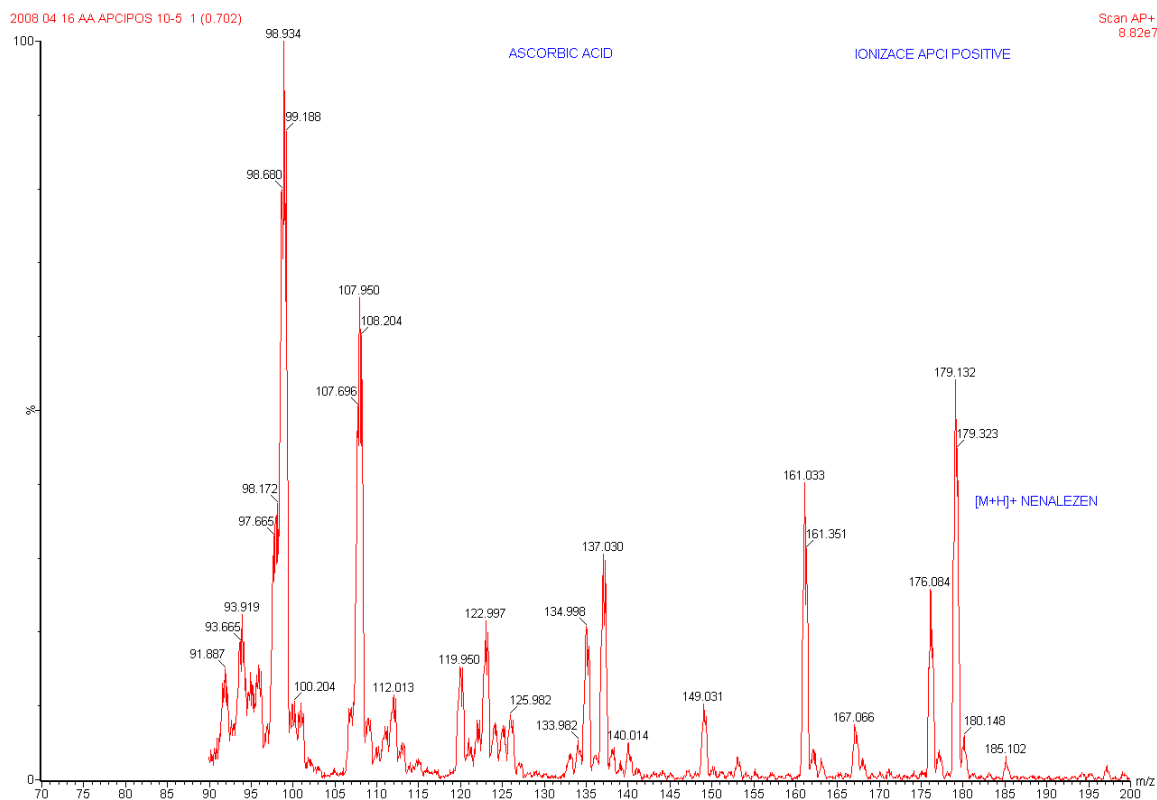
Obr.7 : MS sken AA při ESI negativním



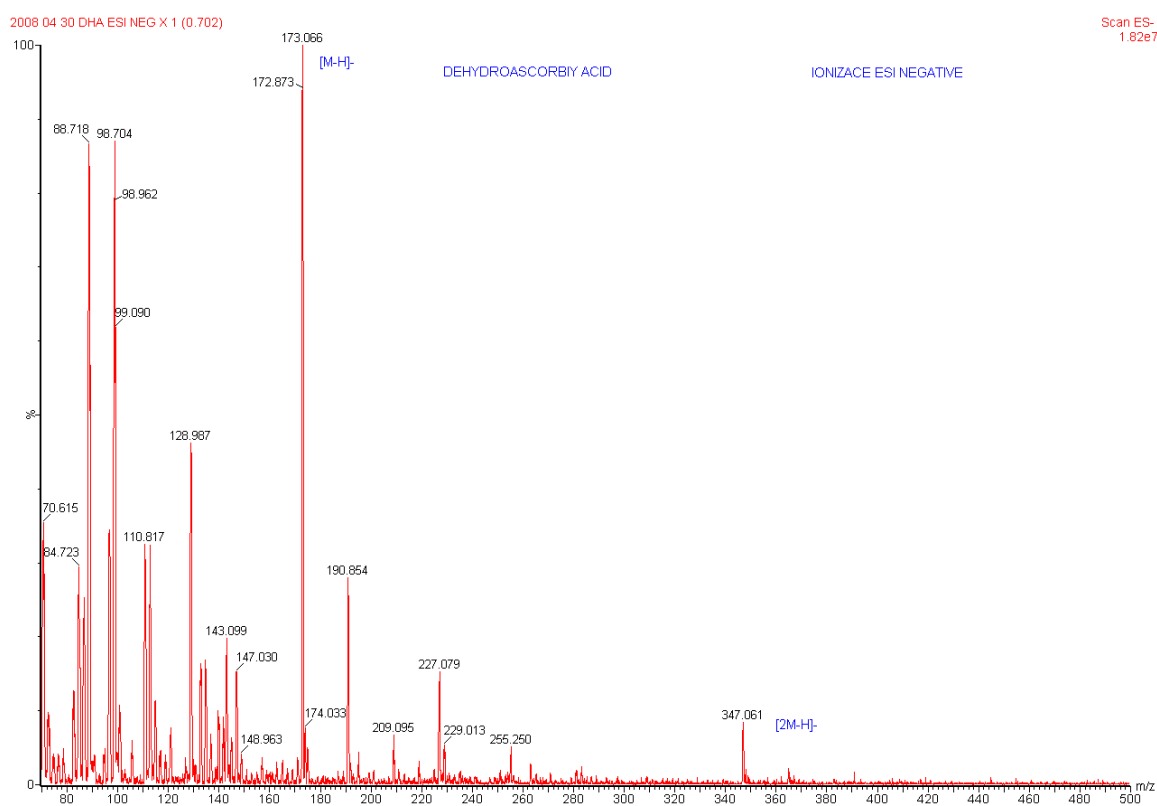
Obr.8 : MS sken AA při ESI pozitivním



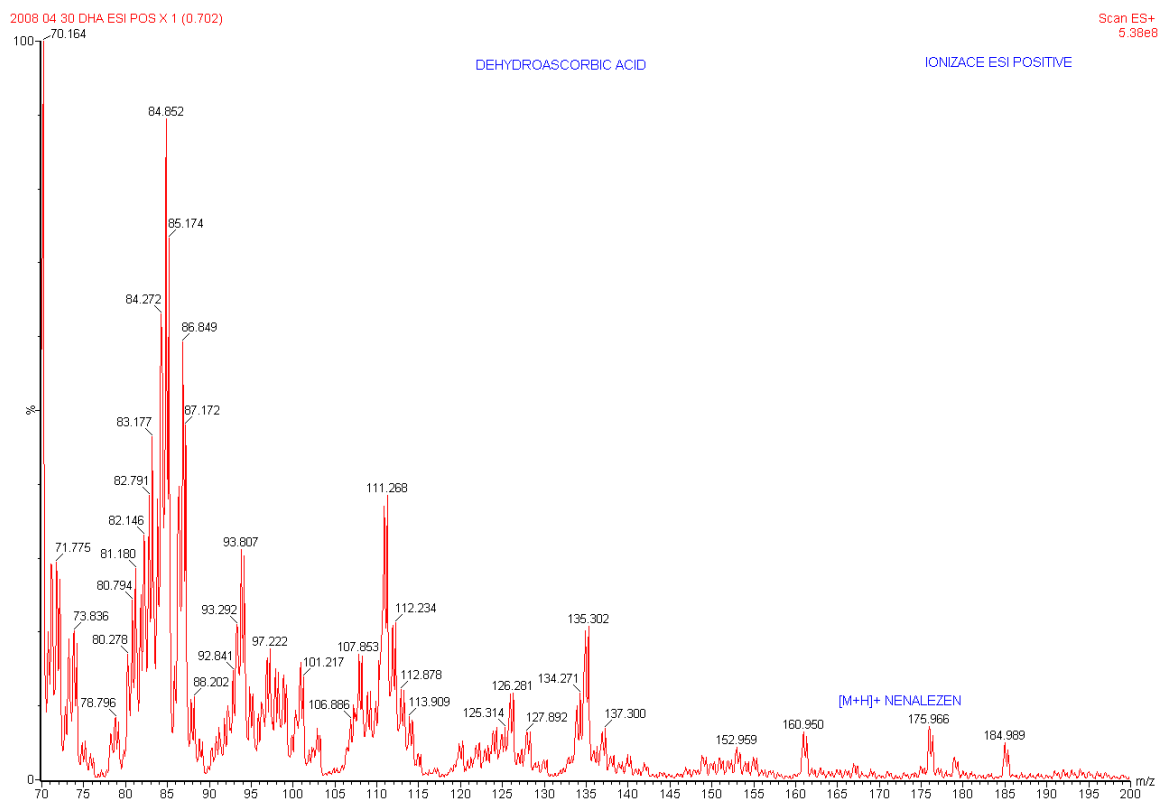
Obr.9 : MS sken AA při APCI negativním



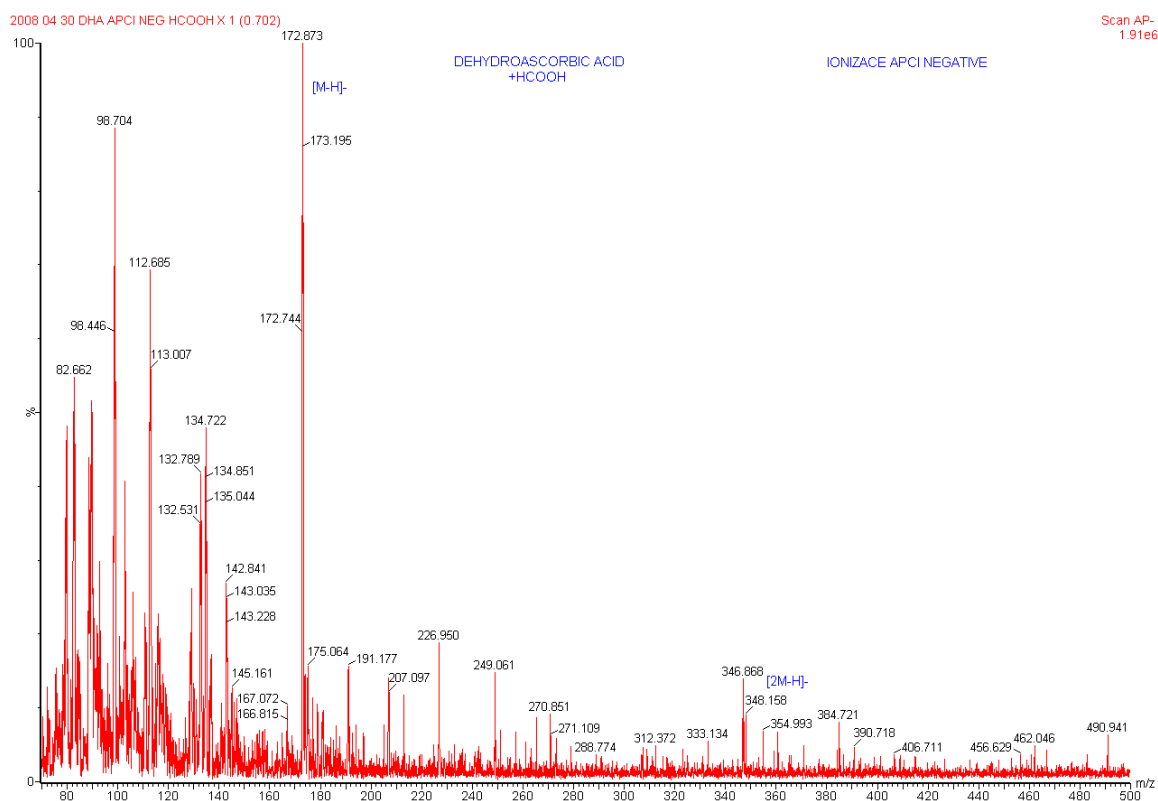
Obr.10 : MS sken AA při APCI negativním



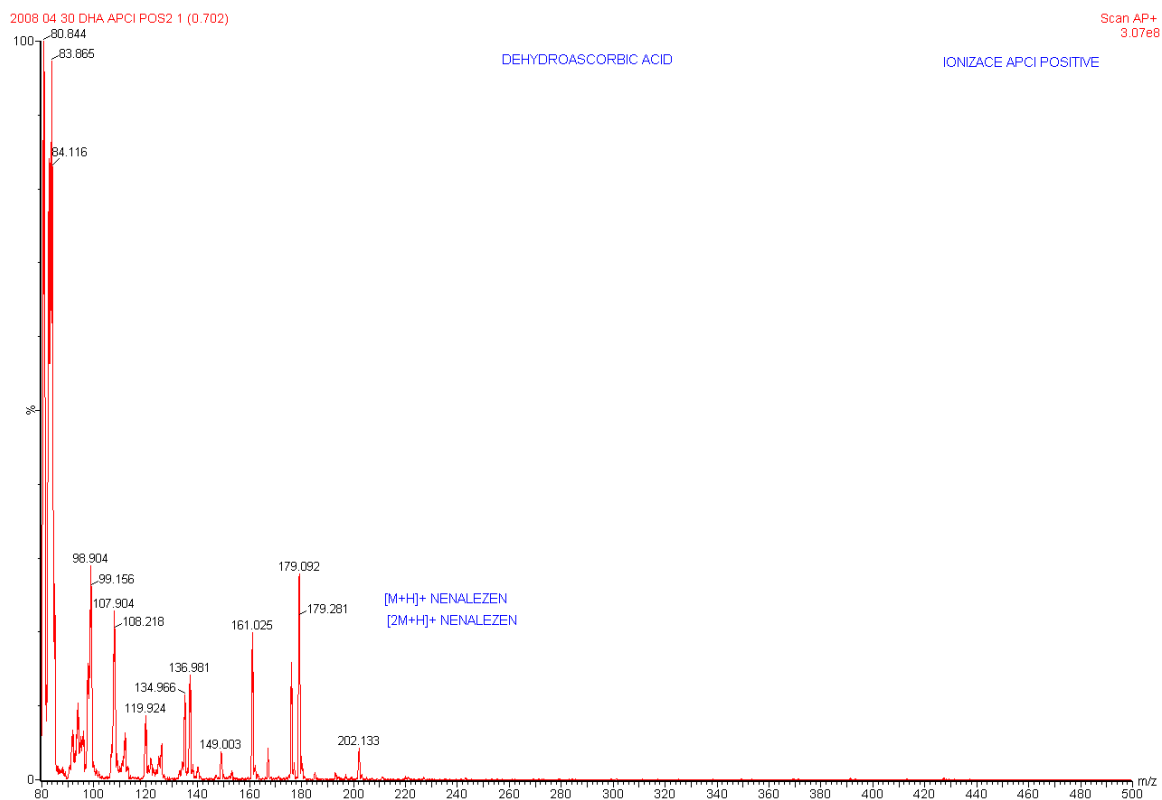
Obr.11 : MS sken DHA při ESI negativním



Obr.12 : MS sken DHA při ESI pozitivním



Obr.13 : MS sken DHA při APCI negativním

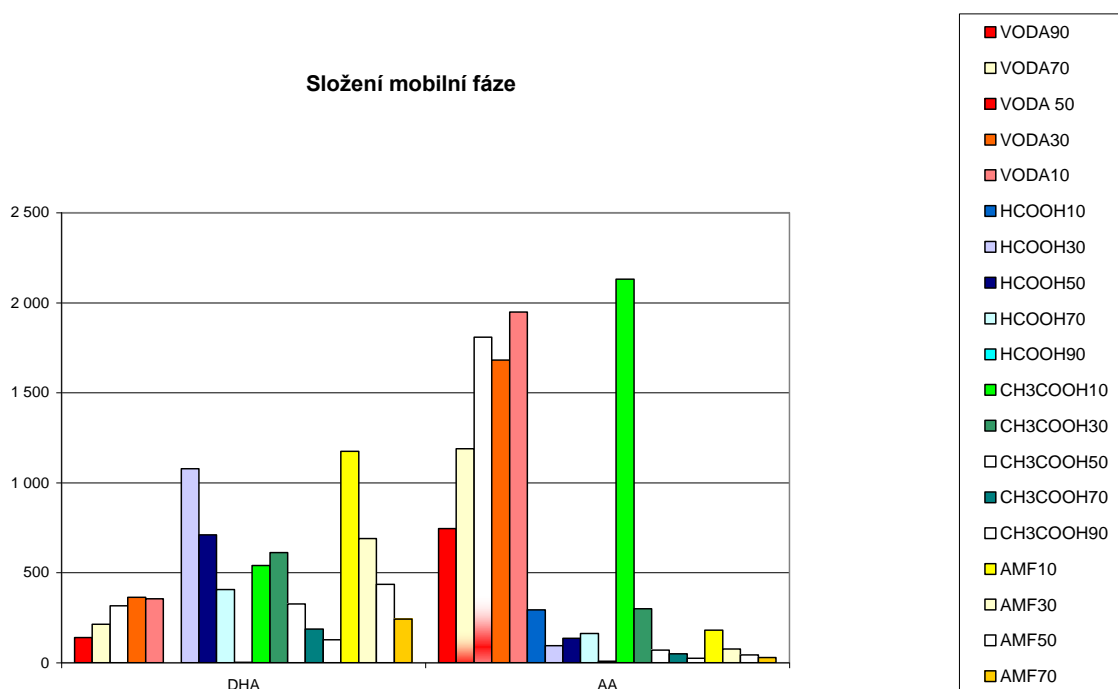


Obr.14 : MS sken DHA při APCI pozitivním

4.1.2 Volba mobilní a stacionární fáze

Výběr vhodné mobilní a stacionární fáze záležel především na tvaru, ploše píku a retenčním čase. Organickou složkou mobilní fáze byl ACN. Během vývoje metody pro současné stanovení AA a DHA byl sledován vliv vodné složky mobilní fáze a stacionární fáze na retenci. Vliv složení mobilní fáze na retenci je znázorněn na obr.15, při měření na koloně BEH Shield RP C18.

K nejlepší odezvě detektoru docházelo při použití kyseliny octové a ACN v poměru 10:90 jako mobilní fáze, ale citlivost byla nízká, docházelo také ke chvostování píků. Nízké citlivosti bylo dosaženo i s mobilní fází H₂O:ACN 10:90, i když tvar píku byl symetrický. Z toho důvodu byla jako mobilní fáze zvolena H₂O:ACN 35:65 s přijatelnou citlivostí i tvarem píku.



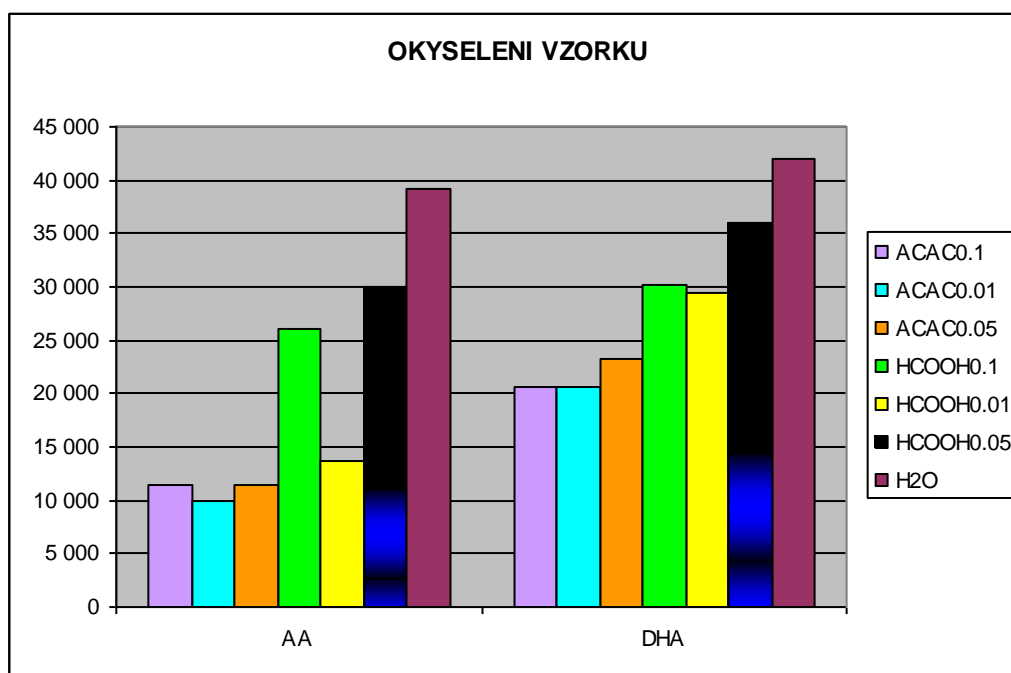
Obr.15 : Vliv složení mobilní fáze na retenci

AA je velice nestabilní v roztoku, kdy snadno dochází k její oxidaci na DHA nebo degradaci. Její stabilitu lze zvýšit snížením pH, proto bylo provedeno okyselení vzorku 0,1%, 0,05% a 0,01% kyselinou octovou a kyselinou mravenčí (obr.16). Při okyselení AA a DHA ale nedocházelo k jejich separaci, naopak lepších výsledků bylo dosaženo se snižující se koncentrací kyselin. Proto byla jako rozpouštědlo AA a DHA

zvolena H₂O a ACN v poměru 50:50. Složení rozpouštědla je podobné jako složení mobilní fáze, která se také skládala z ACN a H₂O.

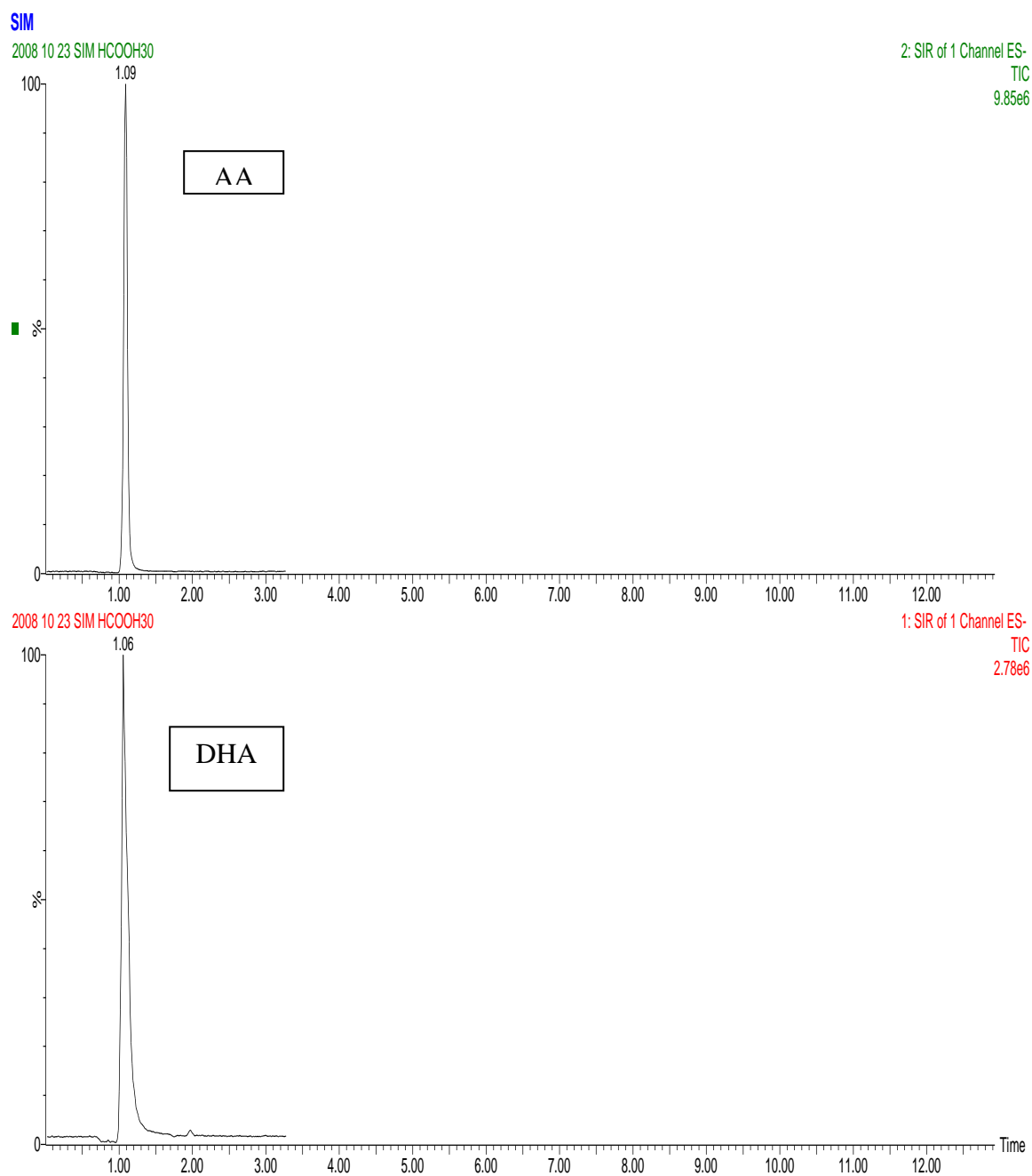
Měření probíhala na kolonách BEH HILIC, BEH Shield RP C18, BEH Amide. Při měření na koloně BEH HILIC nebylo dosaženo dobrých výsledků (obr.17-21). Nedocházelo k separaci AA a DHA. Na této koloně byla jako vodná složka mobilní fáze proměřována ultračistá voda v koncentracích 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 70%, 90%. Dále byla provedena měření s 0,1% HCOOH a 0,1% CH₃COOH a mravenčanem amonným o pH 3,5 ve stejném koncentračním rozmezí jako v předchozím případě.

Dalším typem stacionární fáze byla BEH Amide kolona (obr. 22-24). Pomocí této kolony nebylo dosaženo rozlišení AA a DHA, proto byla tato kolona pro stanovení nevhodná. Jako vodná složka mobilní fáze byly na této koloně použity 0,001% ACAC, 0,1% ACAC, 0,1% NH₄OH, octanový pufr o pH 4,4 a 6,8."

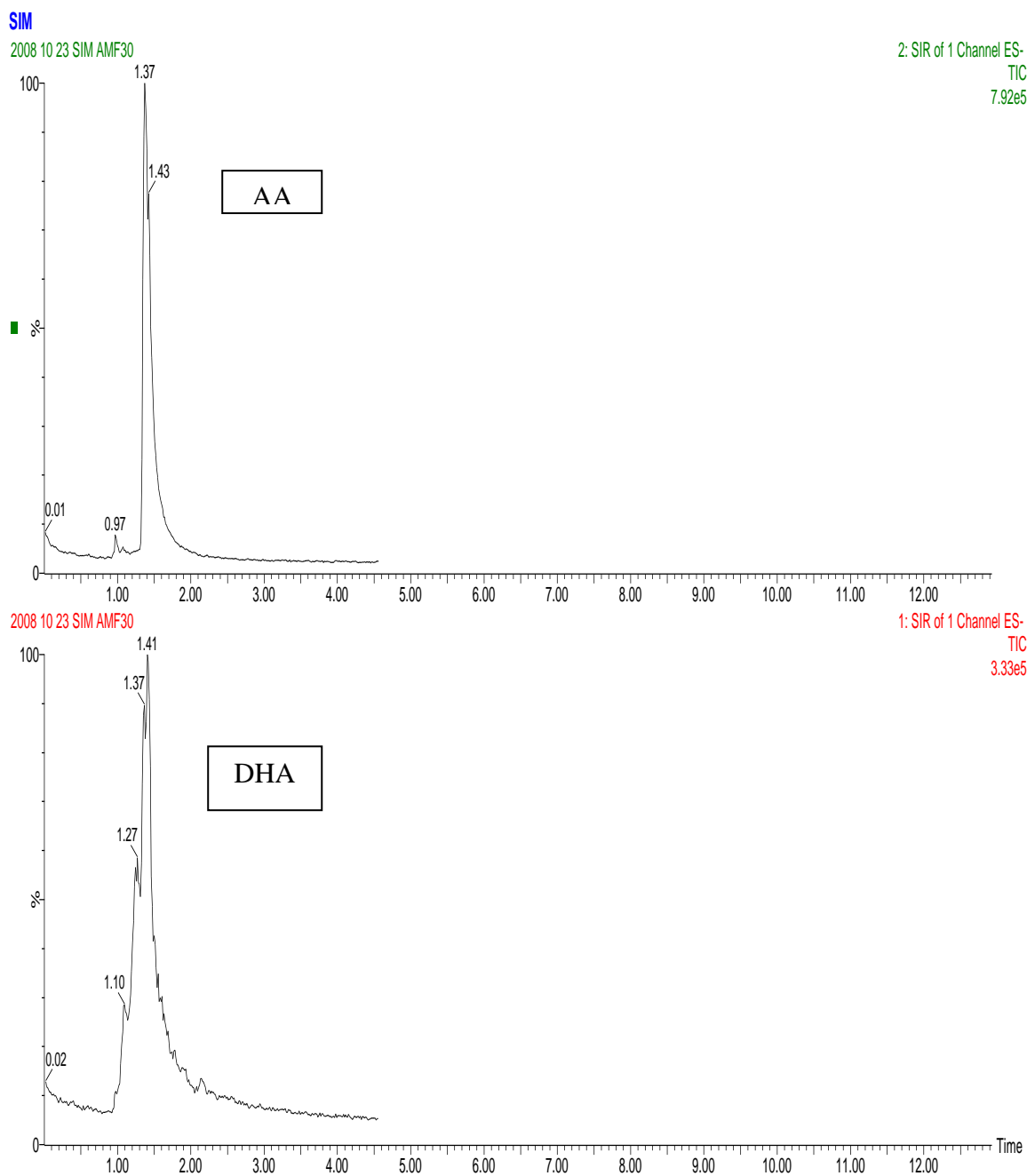


Obr.16 : Vliv okyselení vzorku na odezvu detektoru

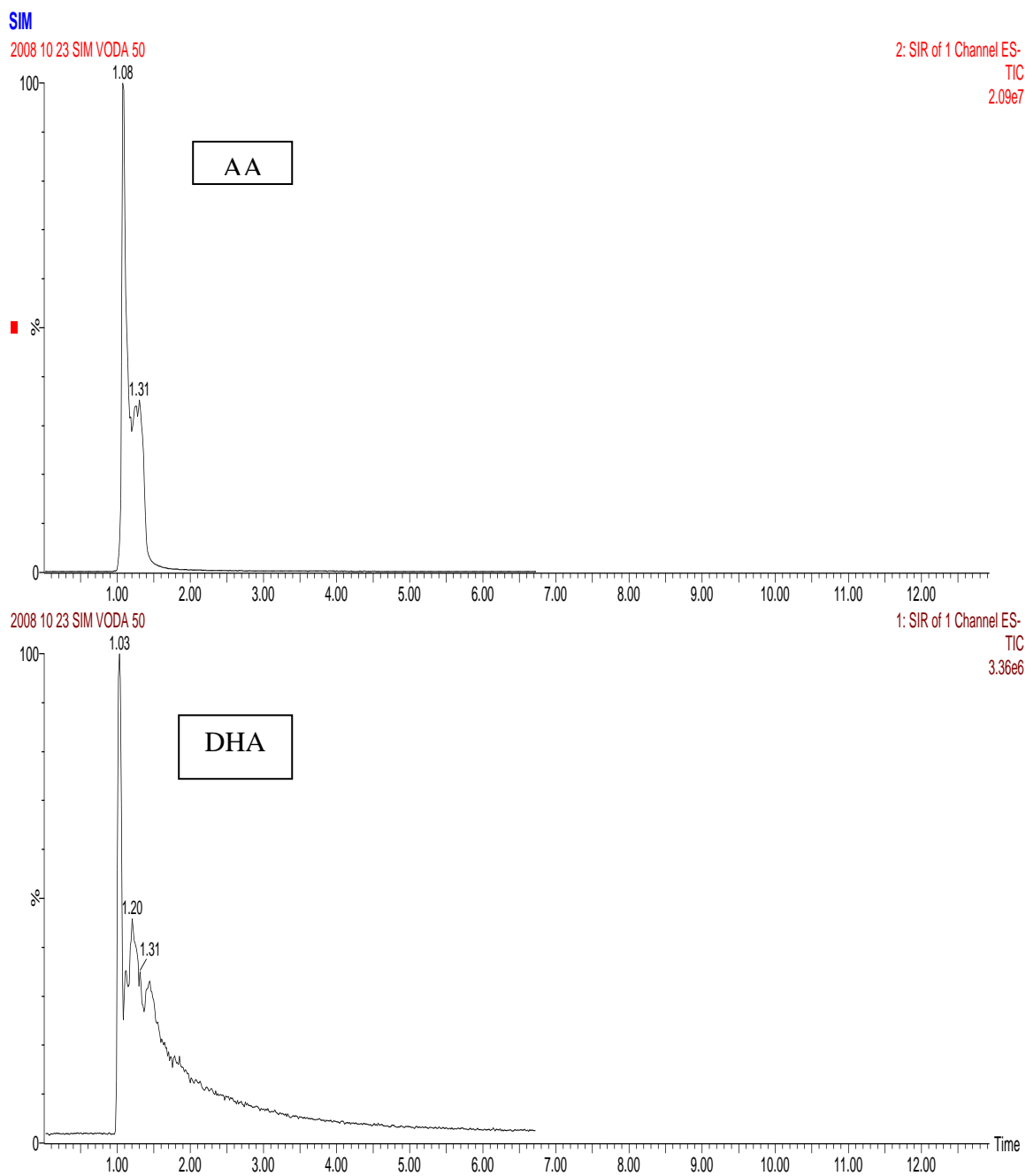
Záznamy separace AA a DHA na koloně BEH HILIC



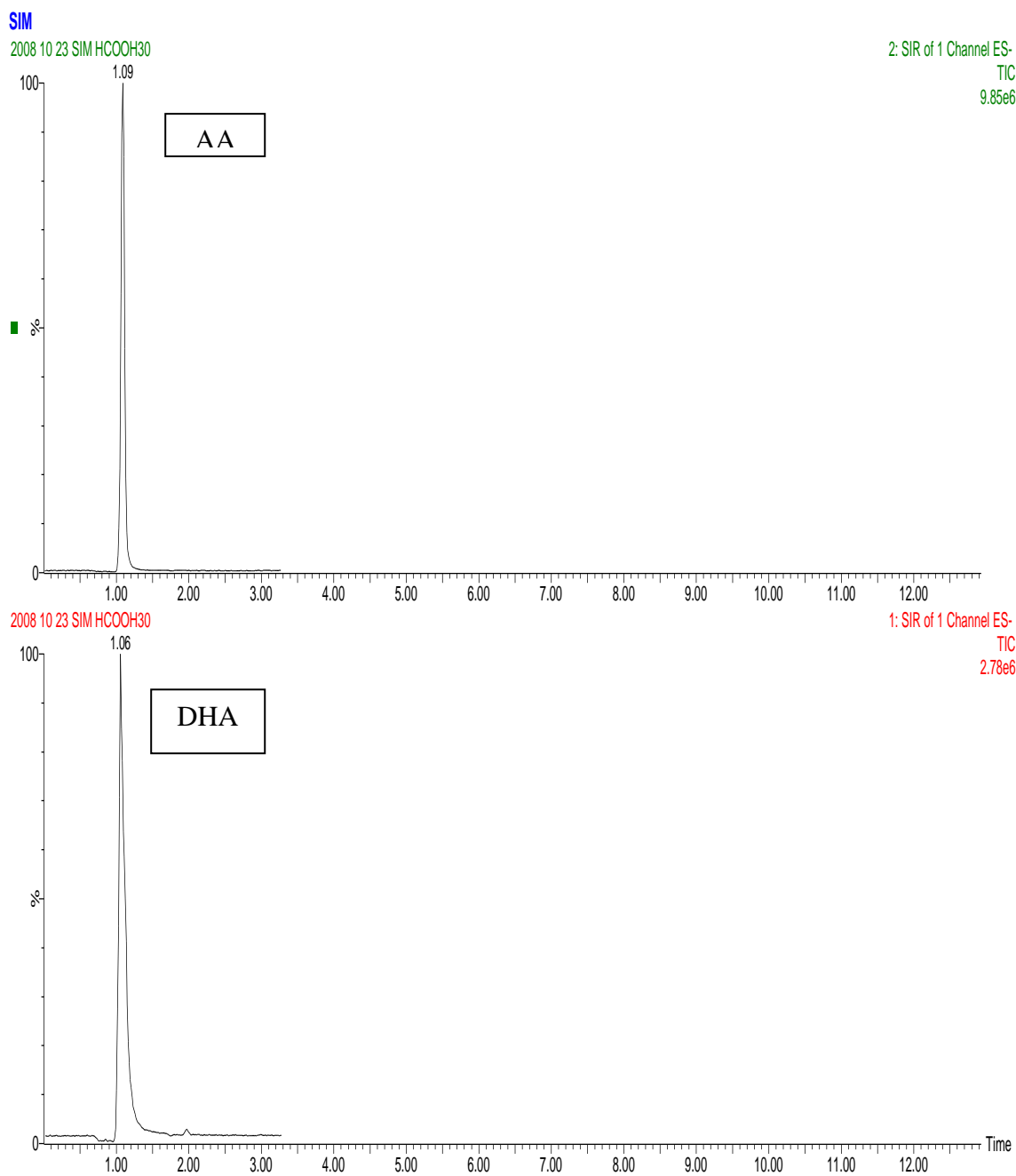
Obr.17 : Separace AA a DHA na koloně BEH HILIC se složením mobilní fáze
HCOOH:H₂O 30:70



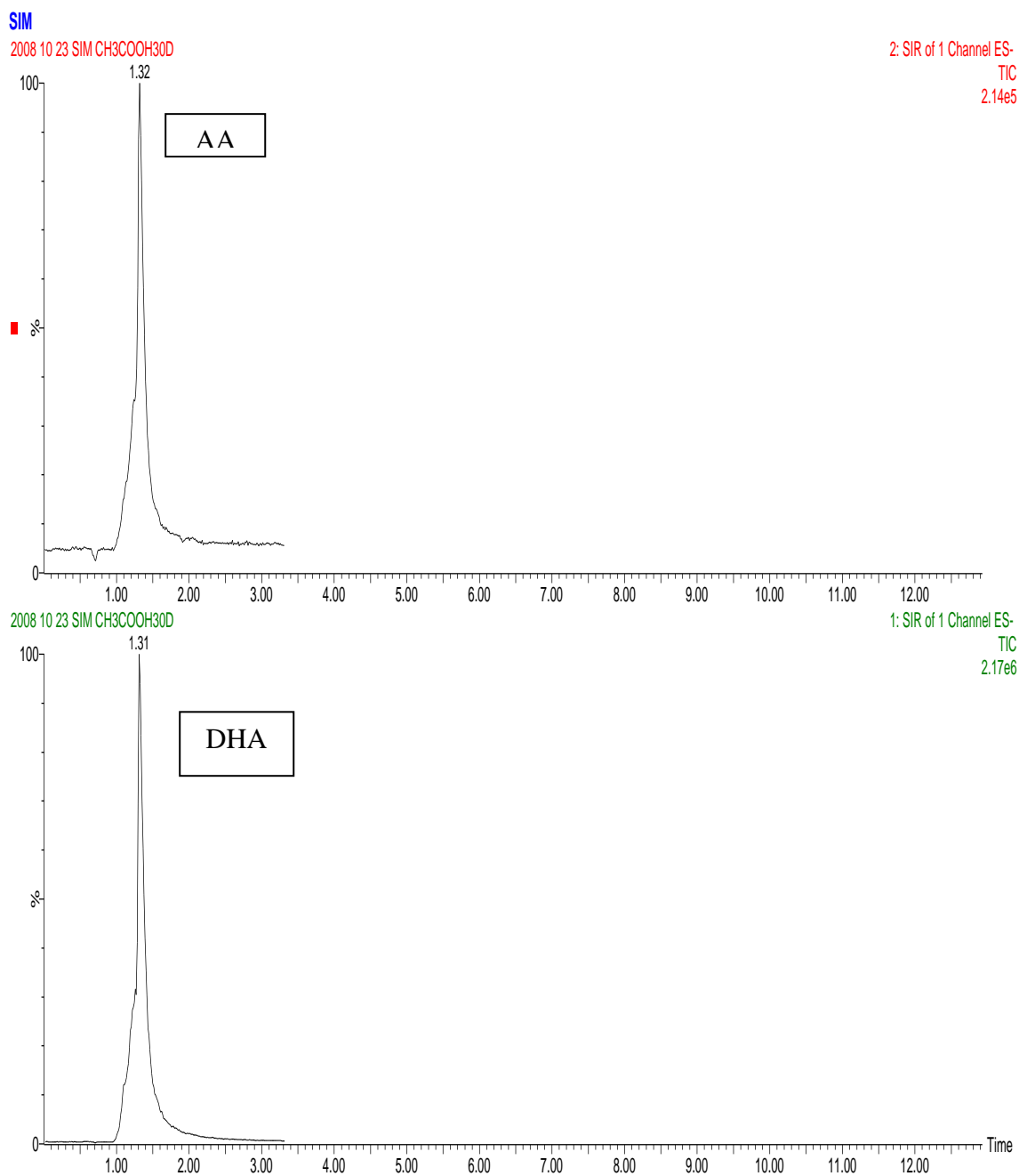
Obr.18 : Separace AA a DHA na koloně BEH HILIC se složením mobilní fáze AMF
 pufr:H₂O 30:70



Obr.19 : Separace AA a DHA na koloně BEH HILIC se složením mobilní fáze
ACN:H₂O 50:50



Obr.20 : Separace AA a DHA na koloně BEH HILIC se složením mobilní fáze
HCOOH:ACN 30:70



Obr.21 : Separace AA a DHA na koloně BEH HILIC se složením mobilní fáze
 $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{ACN } 30:70$

Na koloně BEH HILIC nedocházelo k separaci AA a DHA, pro stanovení byl tento typ kolony nevhodný.

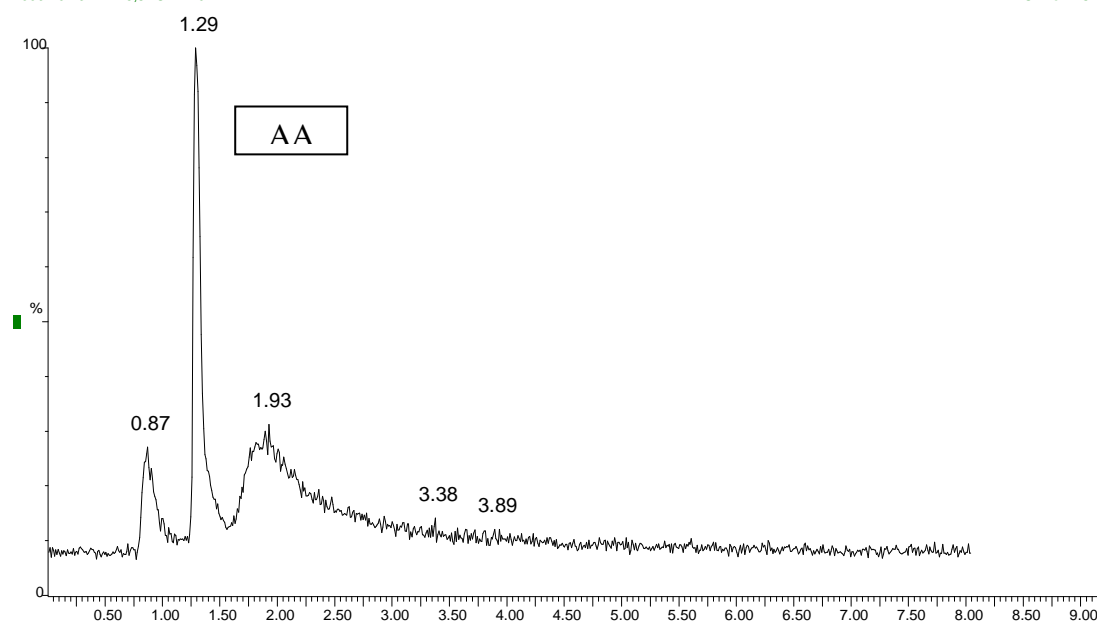
Záznamy separace AA a DHA na koloně BEH Amide

SIM

2009 10 19 DHA6,8PUFR 20

2: SIR of 1 Channel ES-

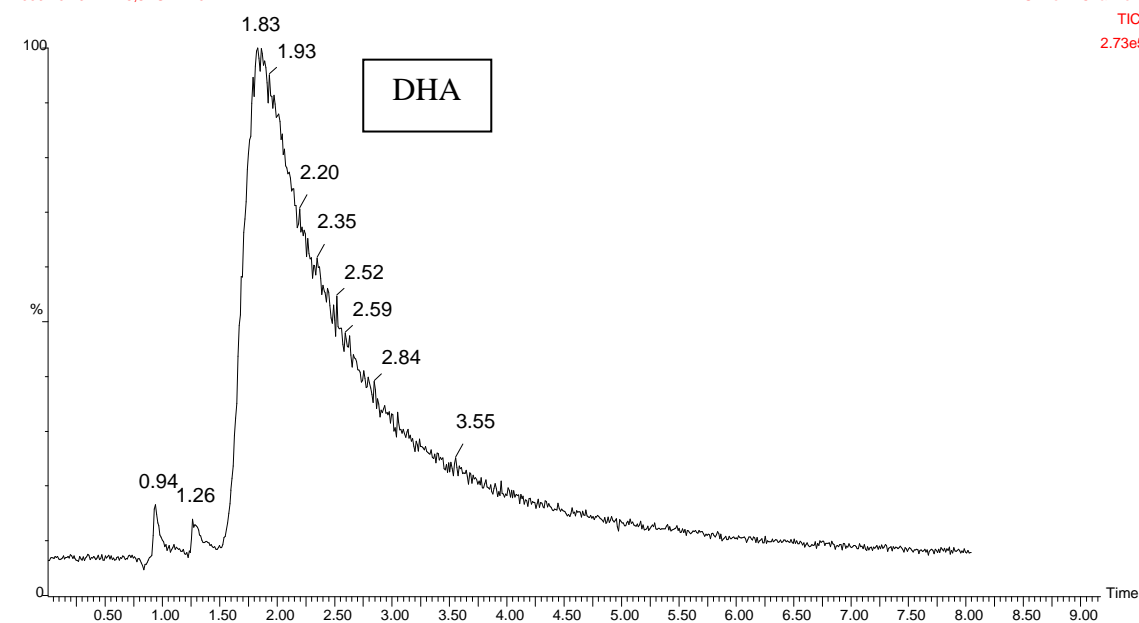
TIC
4.02e4



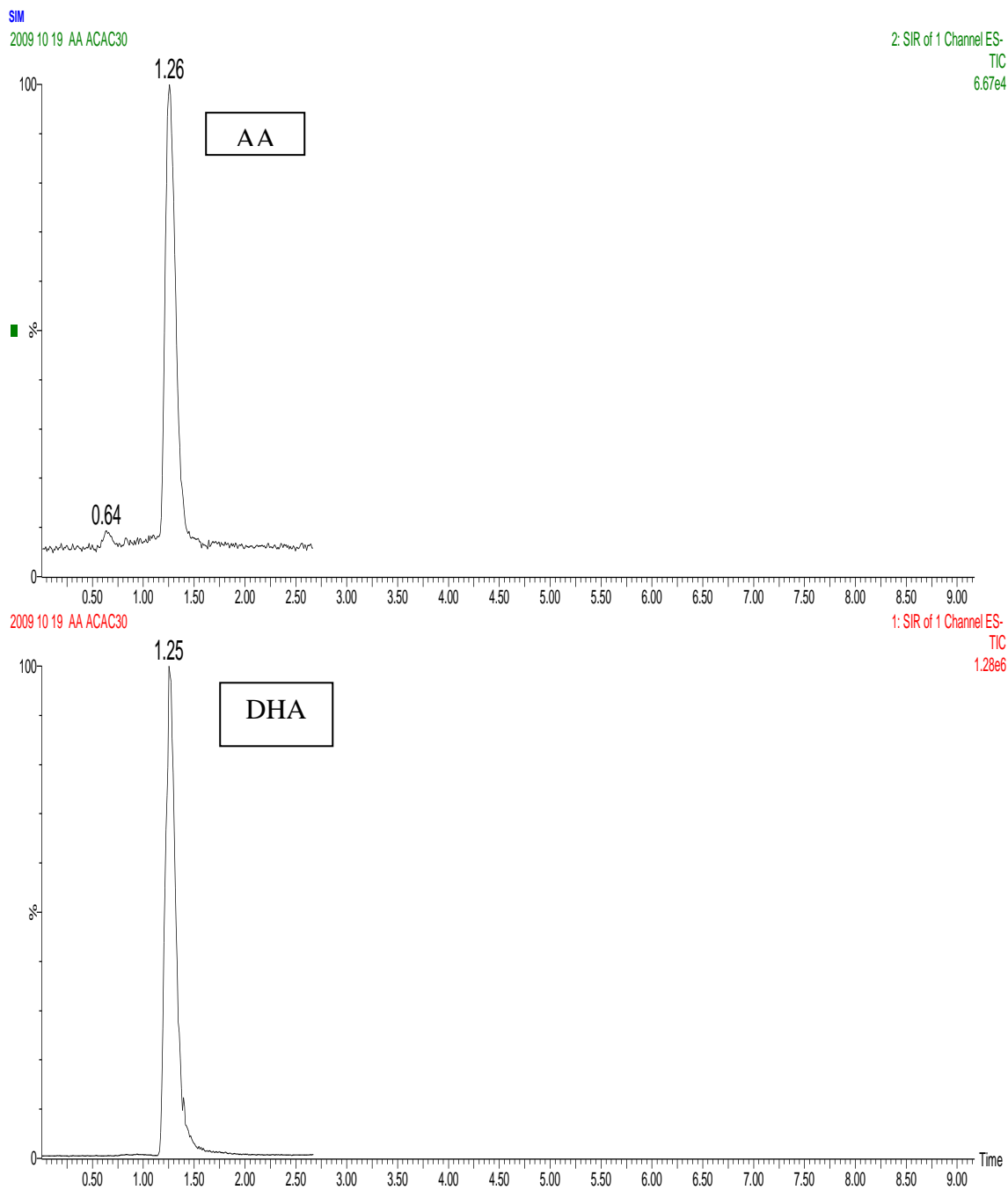
2009 10 19 DHA6,8PUFR 20

1: SIR of 1 Channel ES-

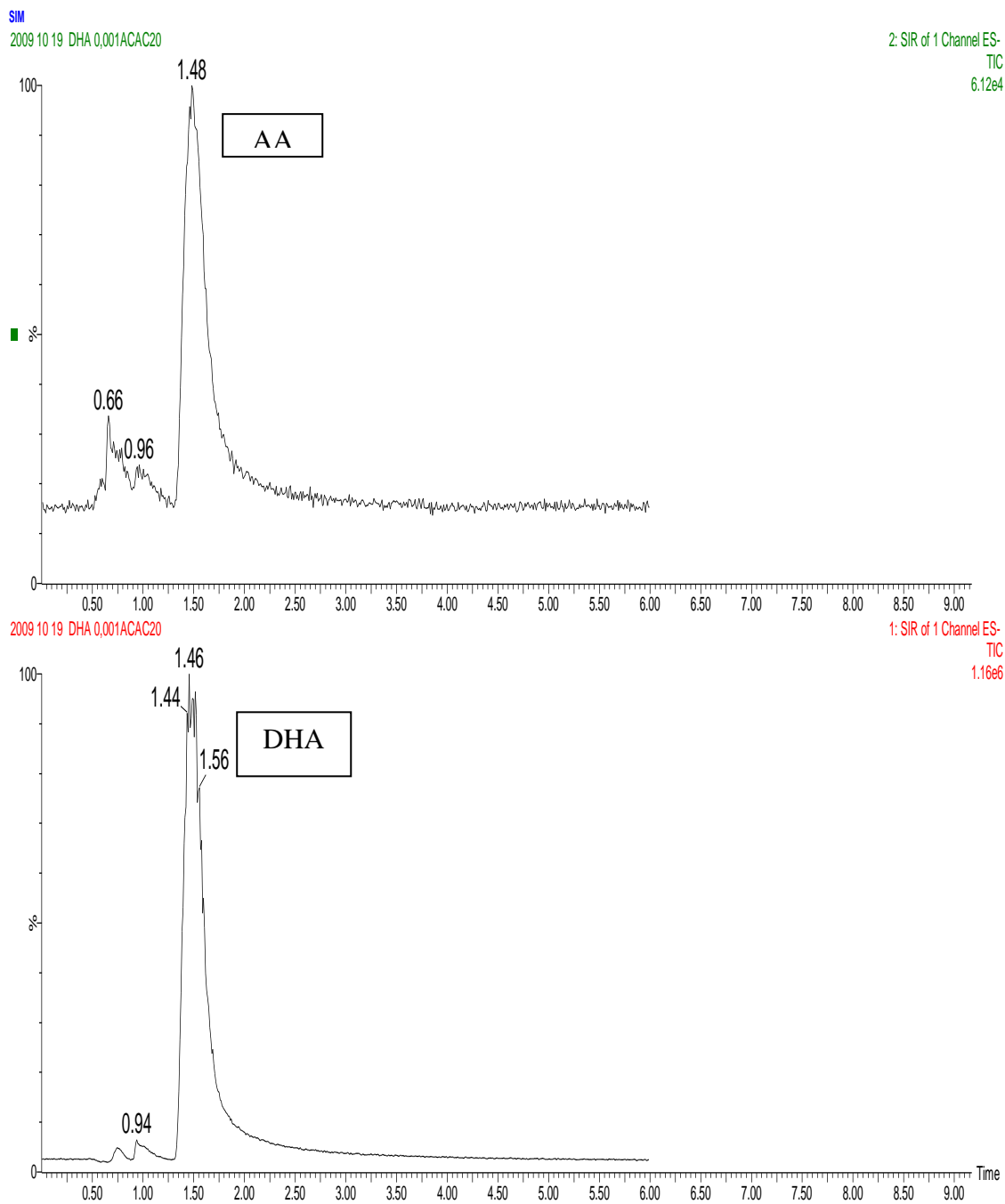
TIC
2.73e5



Obr.22: Separace AA a DHA na koloně BEH Amide se složením mobilní fáze ACAC pufr pH 6,8:ACN 20:80



Obr.23 : Separace AA a DHA na koloně BEH Amide se složením mobilní fáze
0,1% ACAC :ACN 30:70

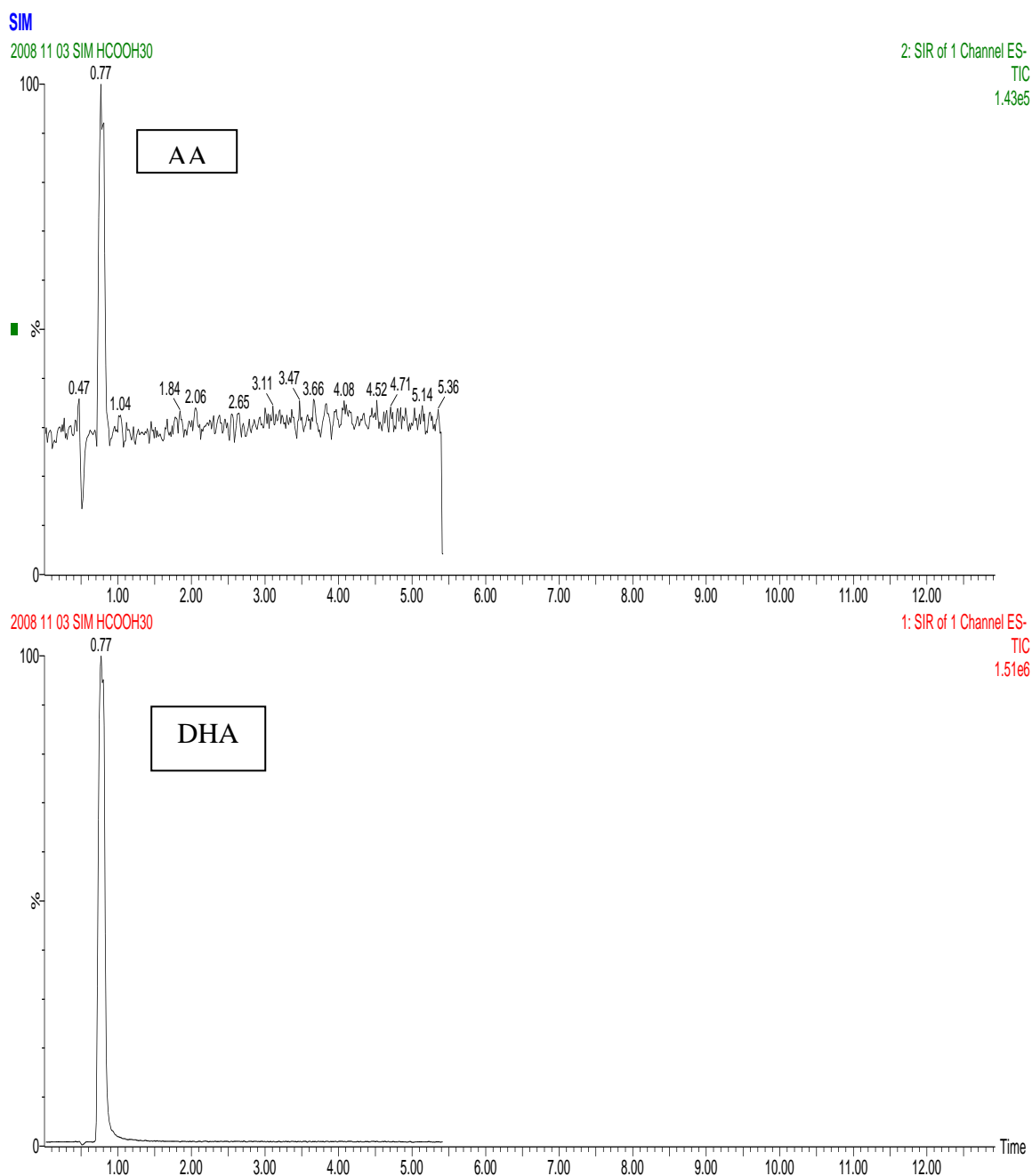


Obr.24 : Separace AA a DHA na koloně BEH Amide se složením mobilní fáze
0,001% ACAC :ACN 20:80

Kolona BEH Amide byla nevyhovující, nedošlo k rozlišení AA a DHA. Docházelo k chvostování píků.

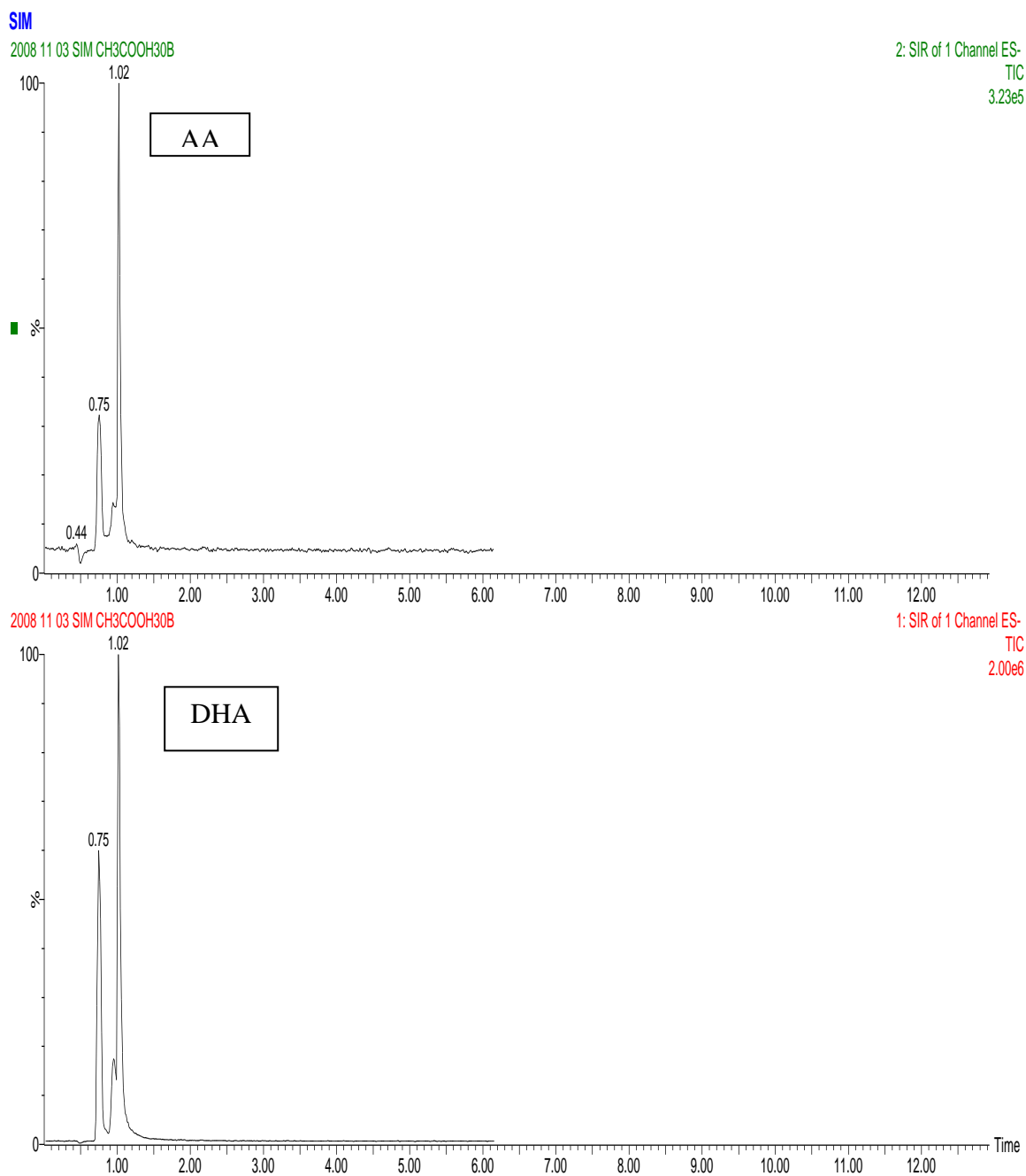
Nejlepších výsledků bylo dosaženo na koloně BEH Shield RP C18 (obr.25-28). Uspokojující záznamy byly získány při 65% koncentraci organické složky (ACN), kdy docházelo k nejlepší separaci AA a DHA. Z toho důvodu bylo při této koncentraci organické složky provedeno měření s pufrů, které jsou kompatibilní s HPLC-MS, jako je mravenčan amonný pH 3,5 a octan amonný o pH 4,2 a 6,8. Citlivost byla ale nízká, navíc nedocházelo k separaci AA a DHA. Dále bylo provedeno měření s 0,05% a 0,01% HCOOH a také s 0,05% a 0,01% CH₃COOH. Za použití těchto mobilních fází došlo k lepšímu rozlišení píků, ale citlivost byla stále nízká. U kyseliny octové i mravenčí jako vodné složky mobilní fáze se AA a DHA rozdělily, kdy se jejich rozlišení zvyšovalo se snižující se koncentrací kyselin. K optimálnímu rozdělení s vhodnými retenčními časy došlo při použití ultračisté vody a ACN v poměru 35:65.

Záznamy separace AA a DHA na koloně BEH Shield RP C18



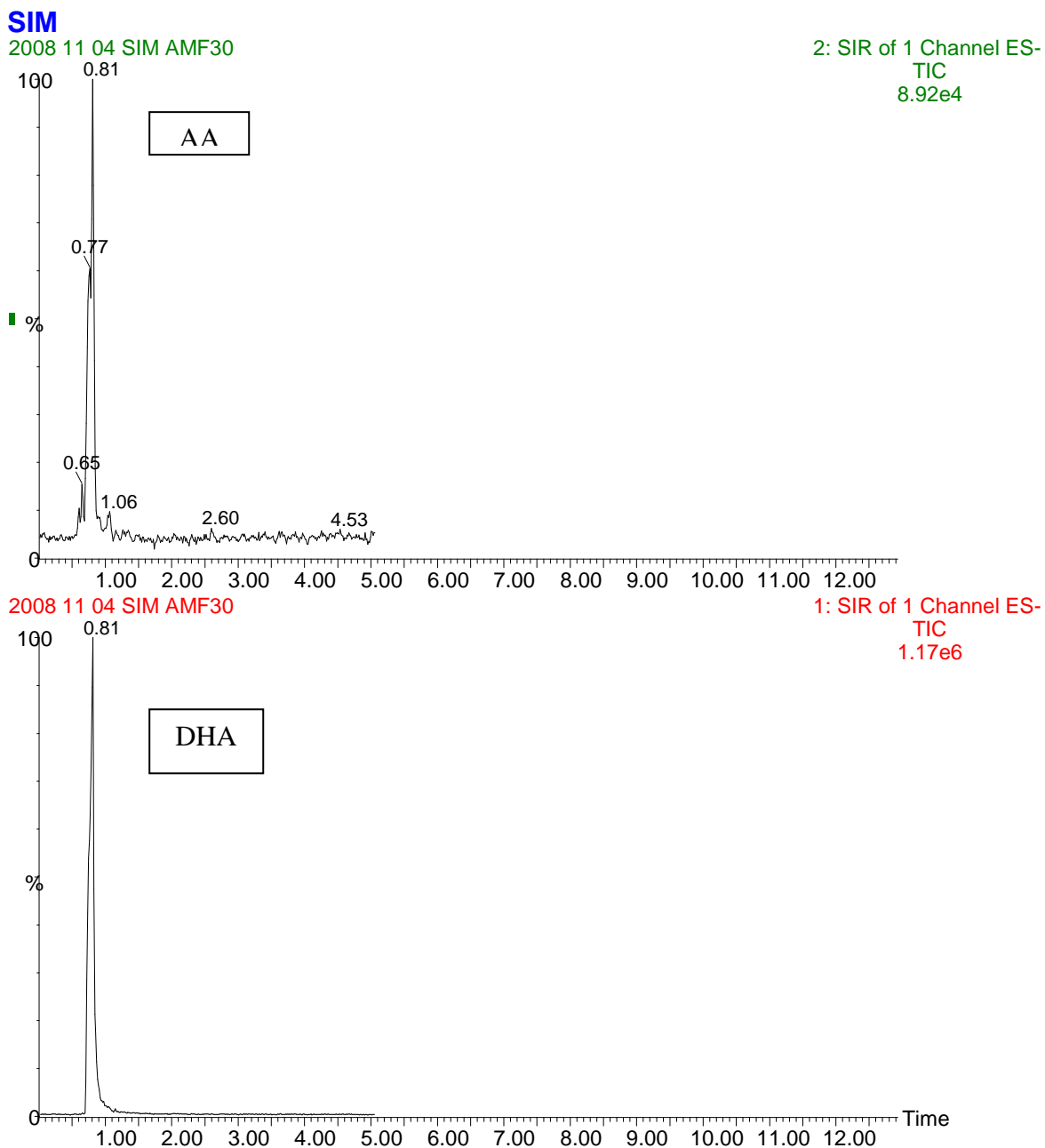
Obr.25 : Separace AA a DHA na koloně BEH Shield RP C18 se složením mobilní fáze
HCOOH:ACN 30:70

Kyselina mravenčí nebyla přijatelná mobilní fáze, nedocházelo k separaci stanovovaných složek. Píky byly symetrické.



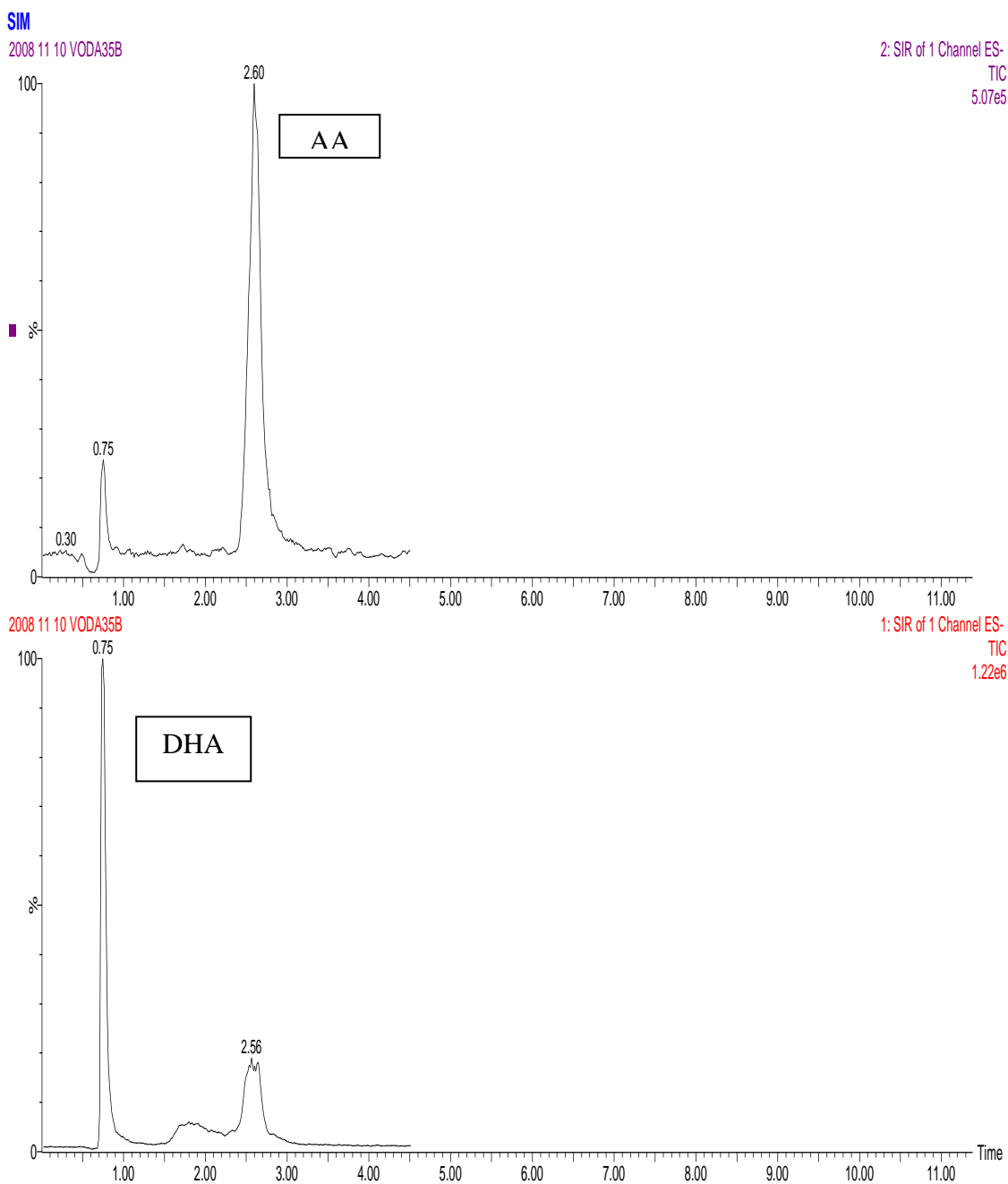
Obr.26 : Separace AA a DHA na koloně BEH Shield RP C18 s využitím mobilní fáze $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{ACN}$ 30:70

Při použití kyseliny octové a ACN v poměru 30:70 došlo k rozlišení AA a DHA, ale retenční časy byly nízké.



Obr.27 : Separace AA a DHA na koloně BEH Shield RP C18 se složením mobilní fáze AMF:ACN 30:70

Složení mobilní fáze AMF:ACN není přijatelné, nedošlo k oddělení separovaných složek.



Obr.28 : Separace AA a DHA za optimálních podmínek (H₂O:ACN 35:65).

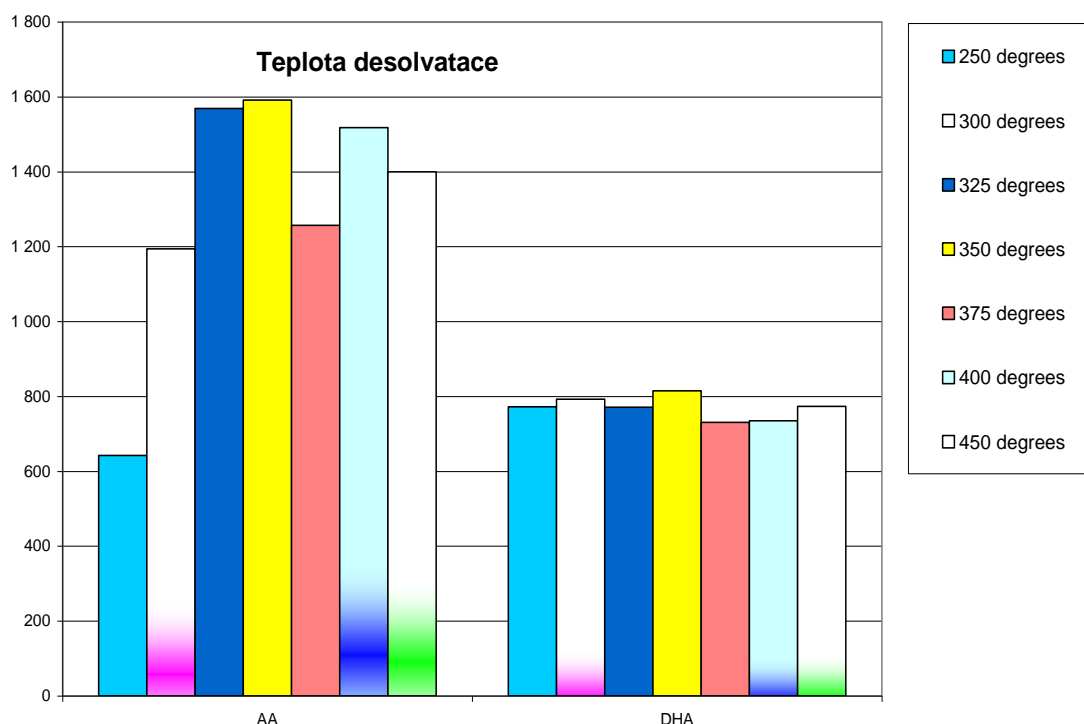
Nejlepších výsledků bylo dosaženo za použití kolony BEH Shield RP C18 s mobilní fází H₂O:ACN. Došlo k rozlišení obou složek s přijatelnými hodnotami retenčních časů i tvary píků. Optimální poměr mobilní fáze byl 35:65. Při zvyšování podílu vodné složky v mobilní fázi docházelo k snižování citlivosti.

4.1.3 Optimalizace MS metody

Nastavení iontového zdroje pro ESI⁻ bylo optimalizováno na základě plochy píků a poměru S/N.

4.1.3.1 Teplota desolvatace

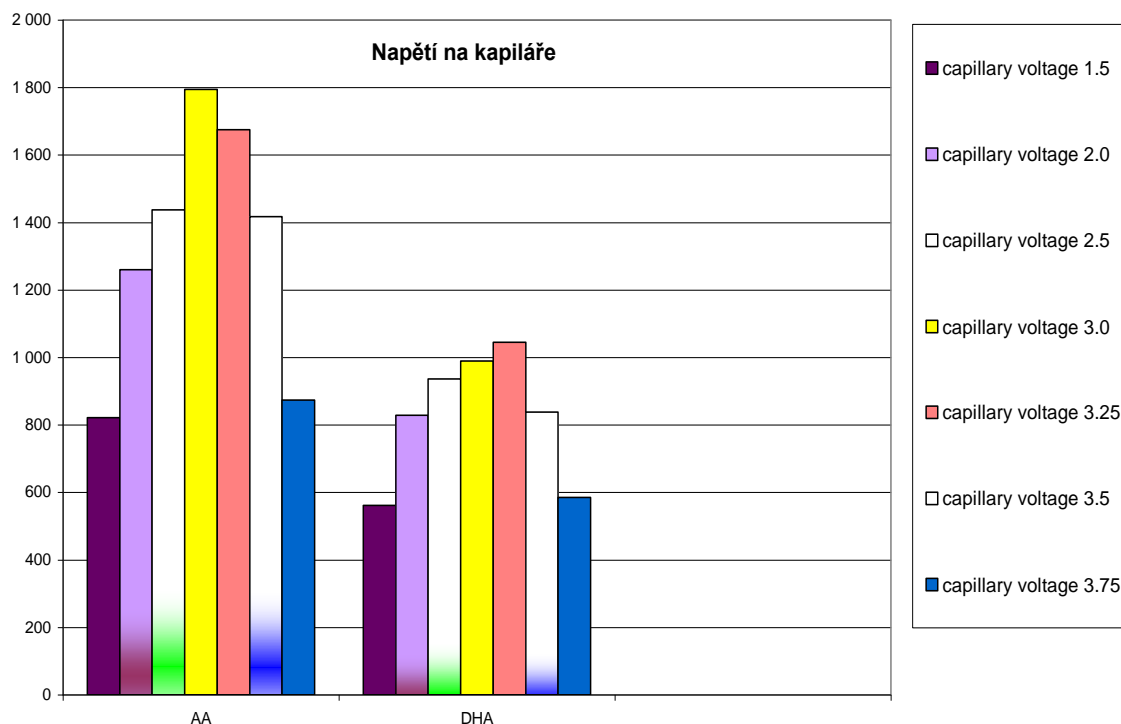
Důležitým parametrem, který ovlivňuje ionizaci je teplota. Byla provedena měření s rozmezím teplot od 250-450 °C. Optimální teplota při níž byla pozorována nejlepší ionizace pro obě látky byla 350 °C (obr.29).



Obr.29 : Vliv teploty desolvatace na odezvu detektoru

4.1.3.2 Napětí na kapiláře

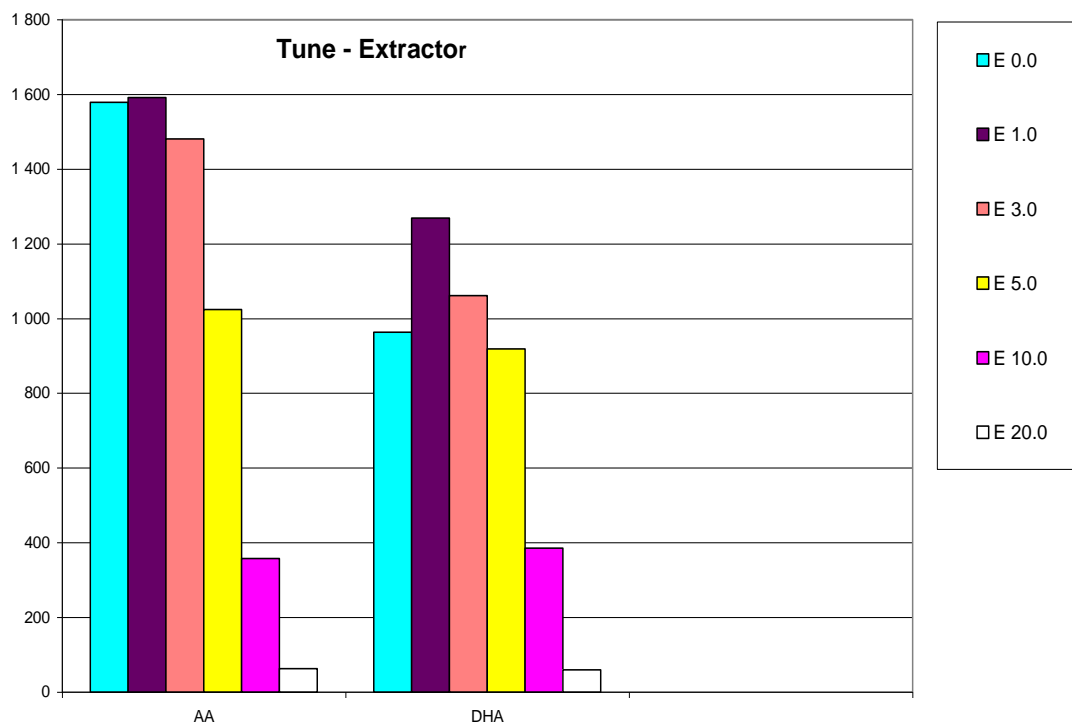
Pro zjištění optimálního napětí na kapiláře byla provedena měření s nastaveným napětím 1,5V, 2,0V, 2,5V, 3,0V, 3,25V, 3,5V a 3,75V. Nejlepší signál se pro AA a pro DHA liší. Pro AA byla pozorována nejlepší odezva při 3,0 V, pro DHA při 3,25V. Optimální napětí na kapiláře bylo kompromisem 3,0 V (obr.30).



Obr.30 : Vliv napětí na kapiláře na odezvu detektoru

4.1.3.3 Extraktor

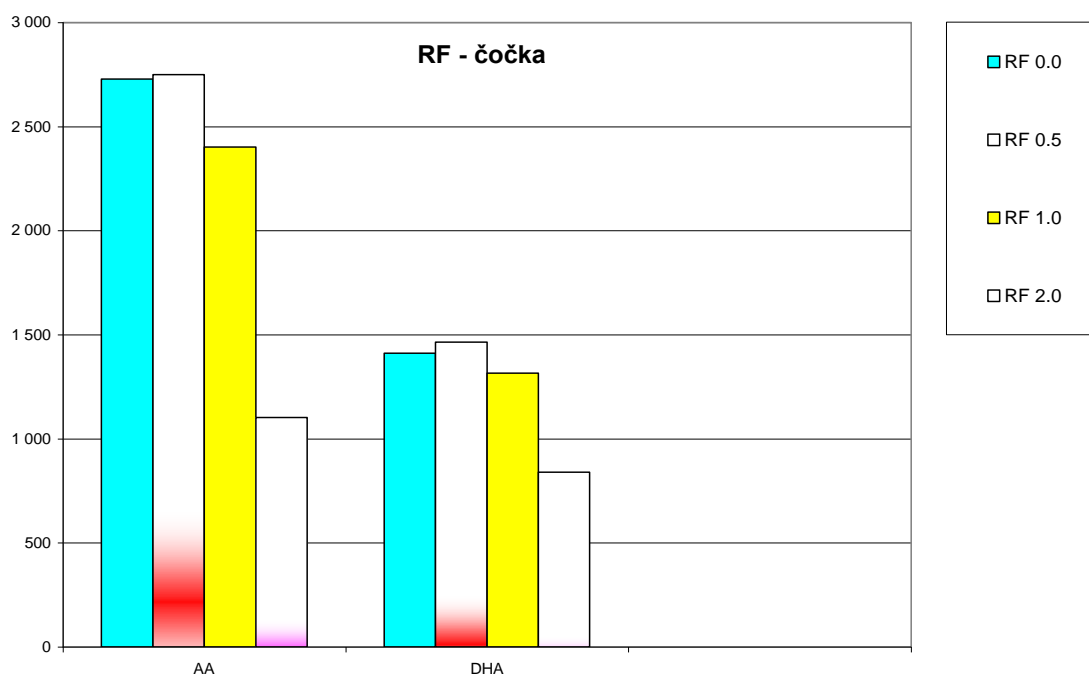
Další veličinou, kterou bylo třeba optimalizovat bylo nastavení extraktoru, součástí iontové optiky. Byla provedena měření s nastavením 0, 1, 3, 5, 10 a 20 V. nejlepší odezva pro AA i DHA byla pozorována při 1,0 V (obr.31).



Obr.31 : Vliv nastavení extraktoru na odezvu detektoru

4.1.3.4 RF čočka

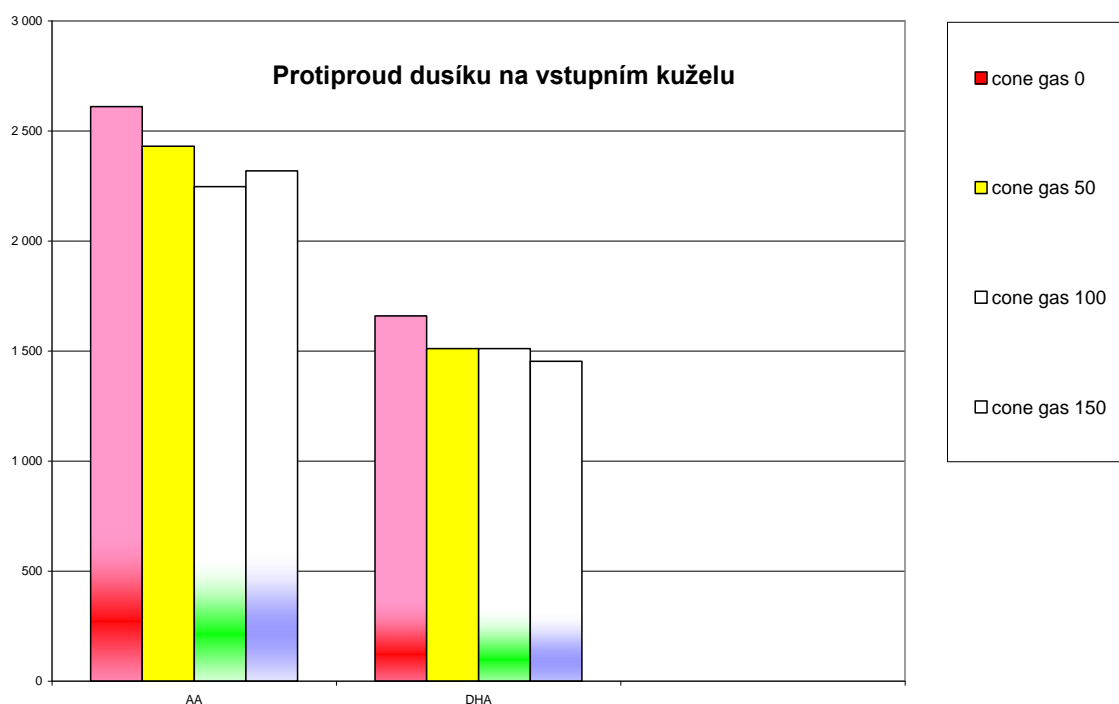
RF čočka směřuje ionty do středu kvadrupólu [40]. Měření probíhalo při 0, 0,5, 1 a 2 V. Nalezená optimální hodnota pro AA i DHA byla 0,5V (obr.32).



Obr.32 : Vliv nastavení RF čočky na odezvu detektoru

4.1.3.5 Protiproud dusíku na vstupním kuželu

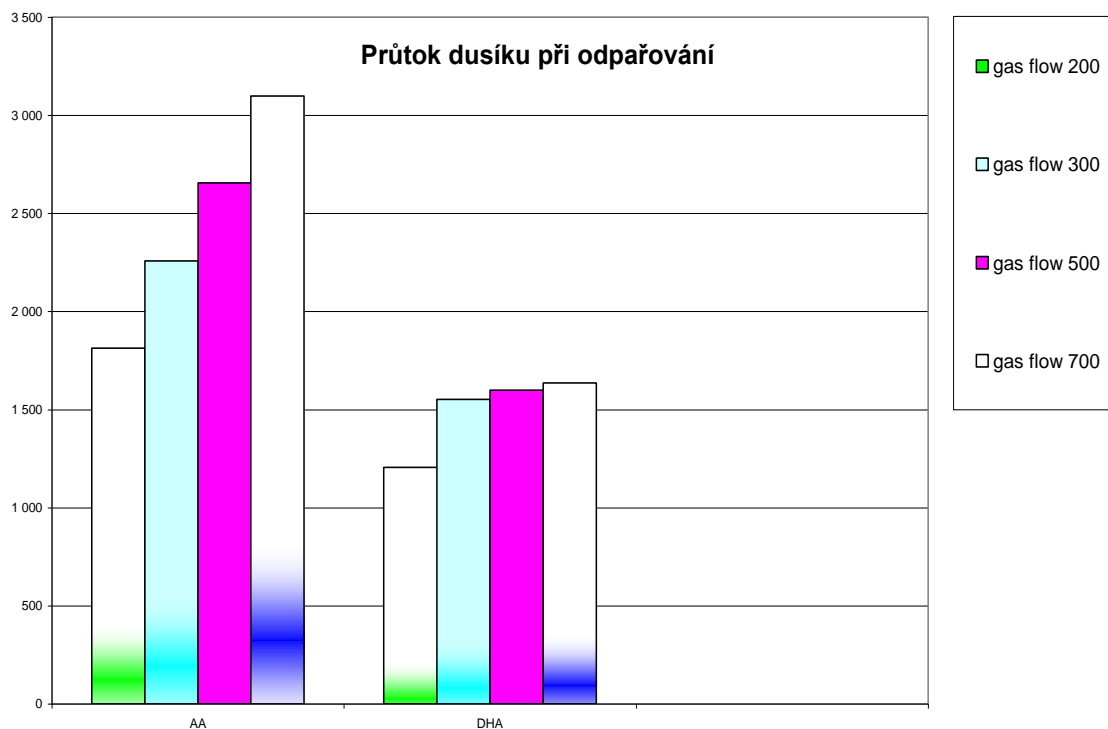
Byla provedena měření při průtoku 0, 50, 100 a 150 V. Ideální hodnota pro AA i DHA byla 50 V (obr.33).



Obr.33 : Vliv průtoku plynu na odezvu detektoru

4.1.3.6 Průtok dusíku při odpařování

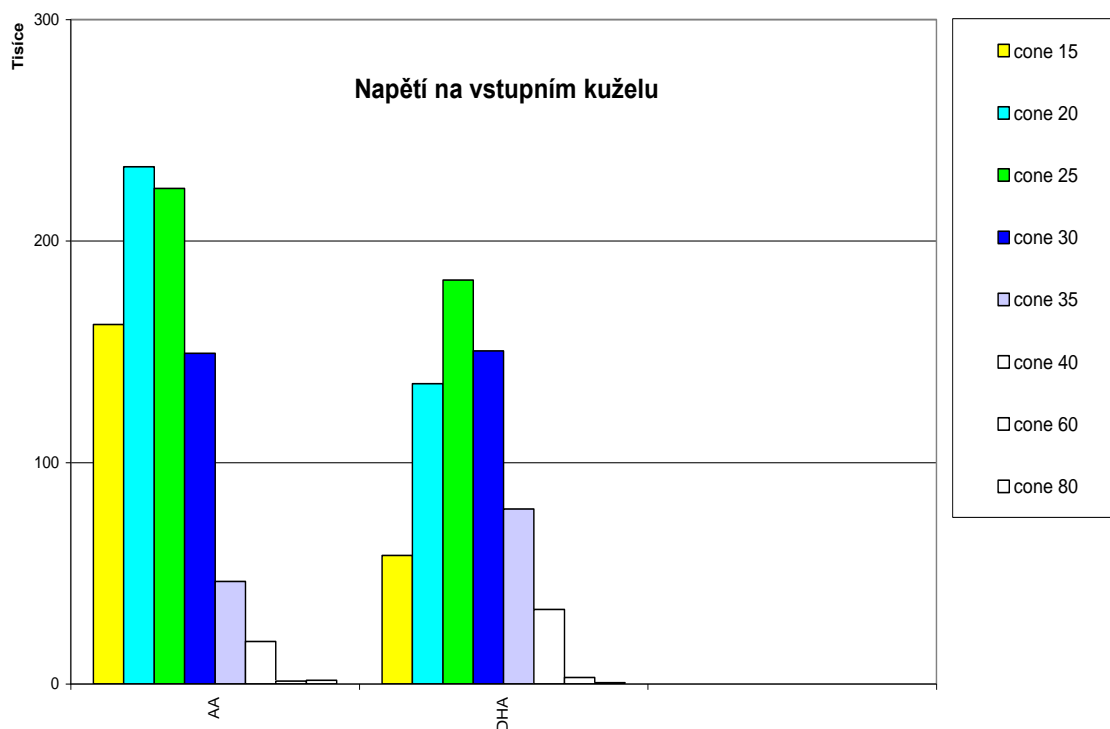
Byla provedena měření při průtoku 200, 300, 500 a 700V. Nejlepší citlivost byla pozorována při průtoku 700 V, ale z energetických důvodů byla jako optimální zvolena hodnota 500 V (obr.34).



Obr.34 : Vliv průtoku plynu na odezvu detektoru

4.1.3.7 Napětí na vstupním kuželu

Optimální hodnota napětí na vstupním kuželu se pohybuje v rozmezí 20-70V. Toto napětí je důležité pro transport iontů do oblasti vakua [38]. Byla provedena měření při 5, 20, 25, 30, 35, 40, 60, 80 V. Nejvyšší citlivost byla naměřena při hodnotách 25 V pro AA a 20 V pro DHA (obr.35).



Obr.35 : Vliv napětí na vstupním kuželu na odezvu detektoru

parametr	hodnota
teplota desolvatace	350°C
napětí na kapiláře	3,0 V
extraktor	1V
Rf čočky	0,5 V
průtok plynu na kuželu	50 V
průtok plynu při desolvataci	500 V
napětí na kuželu	AA - 20 V DHA - 25 V

Tab.2 : Souhrn optimálních parametrů pro ESI- ionizaci AA a DHA

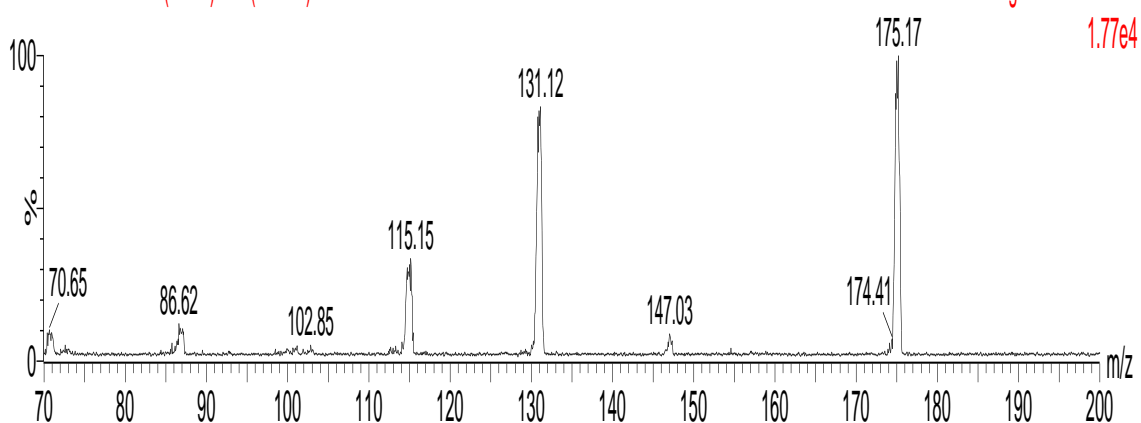
4.1.4 Měření v módu MS/MS

Tandemová spektrometrie (MS/MS) je vícestupňová hmotnostní spektrometrie. MS/MS se používá především pro určení struktury neznámých látek a identifikaci látek ve složitých směsích. MS/MS zahrnuje dva MS systémy. První MS systém provádí výběr požadovaného iontu z proudu iontů produkovaného v iontovém zdroji. Vybrané ionty procházejí oblastí, kde dochází k jejich fragmentaci nebo chemické reakci. Druhý MS systém zaznamenává vznikající produkty. Tandemová spektrometrie není omezena jen na dvě etapy, lze provést i vícestupňové MS. Mezi prekurzorovým a produktovým iontem je nepopíratelná souvislost, proto je to metoda velice specifická [4].

Při MS/MS o kolizní energii 10V došlo k fragmentaci AA o molekulové hmotnosti 175 na fragmenty o molekulové hmotnosti 131 a 115 a zaznamenána byla i původní AA (obr. 36). Při zvýšení kolizní energie na 20V došlo k rozsáhlejší fragmentaci za vzniku produktů o molekulové hmotnosti 131 a 87 a jen malého množství původní molekuly (obr. 37). Při fragmentaci DHA o molekulové hmotnosti 173 při kolizní energii 10V vznikly produkty o molekulové hmotnosti 143 a 113 (obr.38). Zvýšením kolizní energie na 20V byla DHA štěpena na produkty o molekulové hmotnosti 143, 129, 113 a 87 (obr.39). AA a DHA se zřejmě štěpí na produkty uvedené v obrázku 40 a 41. Byla provedena optimalizace kolizní energie a SRM přechody. Optimální kolizní energie pro AA i DHA byla 20V.

DG

2008 11 24 DG10 83 (1.398) Cm (28:195)

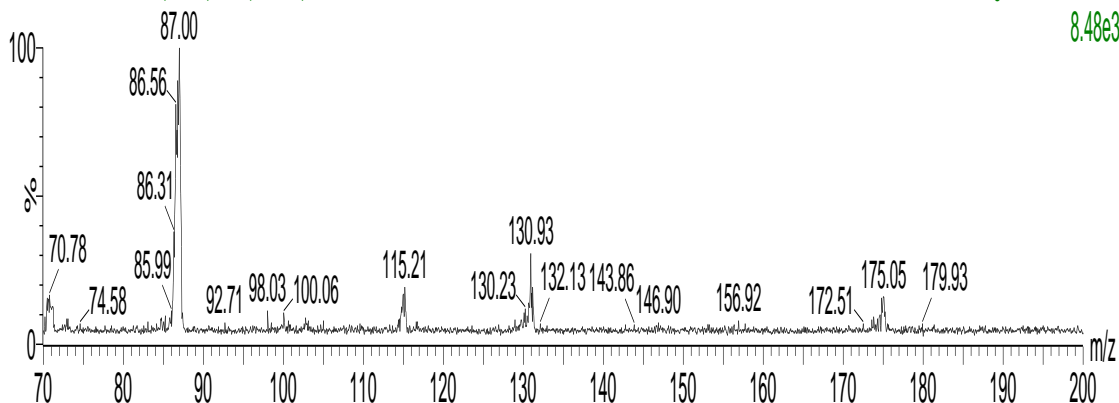


Obr.36 : Sken produktových iontů AA při kolizní energii 10 V

DG

2008 11 24 DG20 83 (1.398) Cm (30:177)

2: Daughters of 175ES-
8.48e3

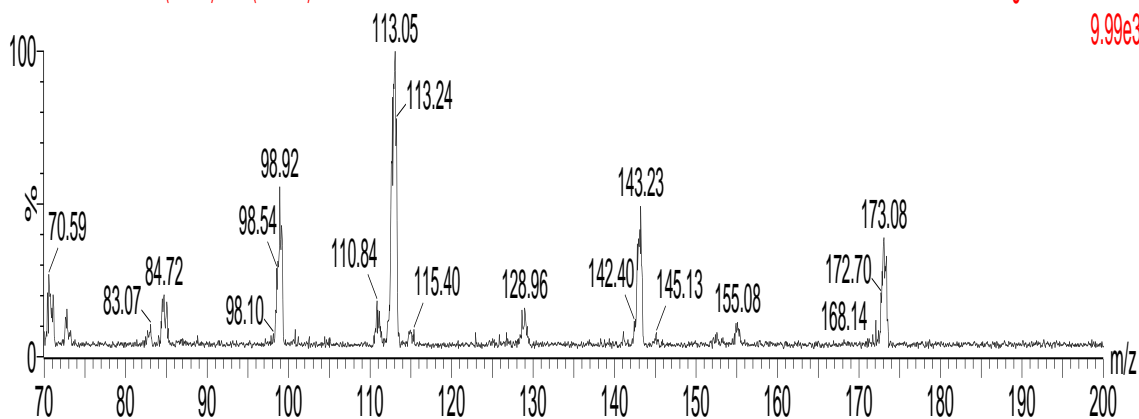


Obr.37 : Sken produktových iontů AA při kolizní energii 20 V

DG

2008 11 24 DG10 45 (0.750) Cm (19:171)

1: Daughters of 173ES-
9.99e3

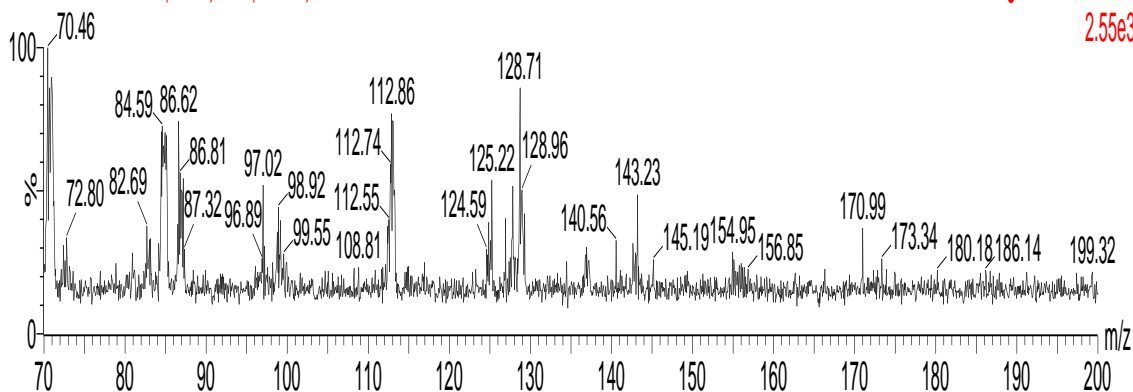


Obr.38 : Sken produktových iontů DHA při kolizní energii 10 V

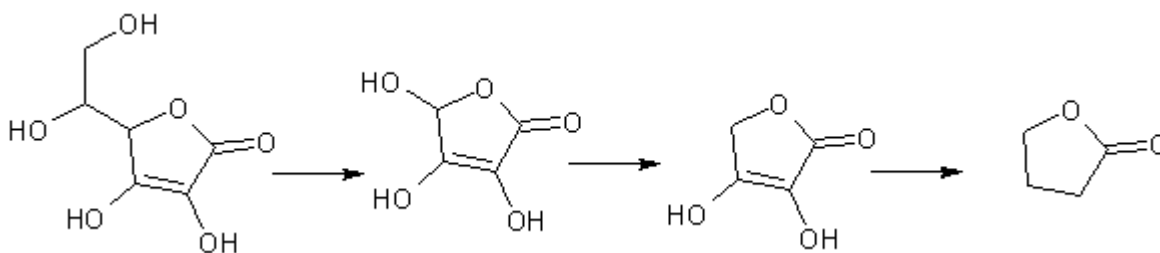
DG

2008 11 24 DG20 45 (0.749) Cm (38:173)

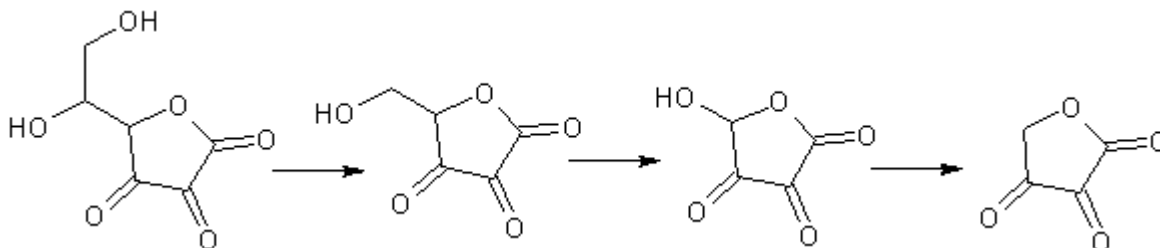
1: Daughters of 173ES-
2.55e3



Obr.39 : Sken produktových iontů DHA při kolizní energii 20 V



Obr.40: Pravděpodobné produkty štěpení AA



Obr.41: Pravděpodobné produkty štěpení DHA

4.2 Test způsobilosti systému

Součástí validace analytické metody je test způsobilosti systému. Test byl proveden nástřikem roztoku AA a DHA za optimalizovaných podmínek v šesti sériích. Byla tak stanovena opakovatelnost nástřiků (SST). Byly sledovány plochy a retenční časy píků. Po provedení SST testu pro SIM režim byla naměřena relativní směrodatná odchylka plochy píků 1,63% pro AA a 8,95% pro DHA. Relativní směrodatné odchylky retenčních časů byly 1,3% pro AA a 0,69% pro DHA. Byl proveden i SST pro SRM režim, kde byla naměřena relativní směrodatná odchylka plochy píků 9,58% pro AA a 1,93% pro DHA. Relativní směrodatné odchylky retenčních časů byly 1,12% pro AA a 0,00% pro DHA. RSD pro SIM i SRM režim jsou shrnuty v tabulce č.3. RSD retenčních časů pro AA nevyhovují předepsaným limitům a tak i SST test nevyhovuje předepsaným limitům.

RSD %		AA	DHA
SIM	plocha	1,63	8,95
	ret.čas	1,3	0,69
SRM	plocha	9,58	1,93
	ret.čas	1,12	0

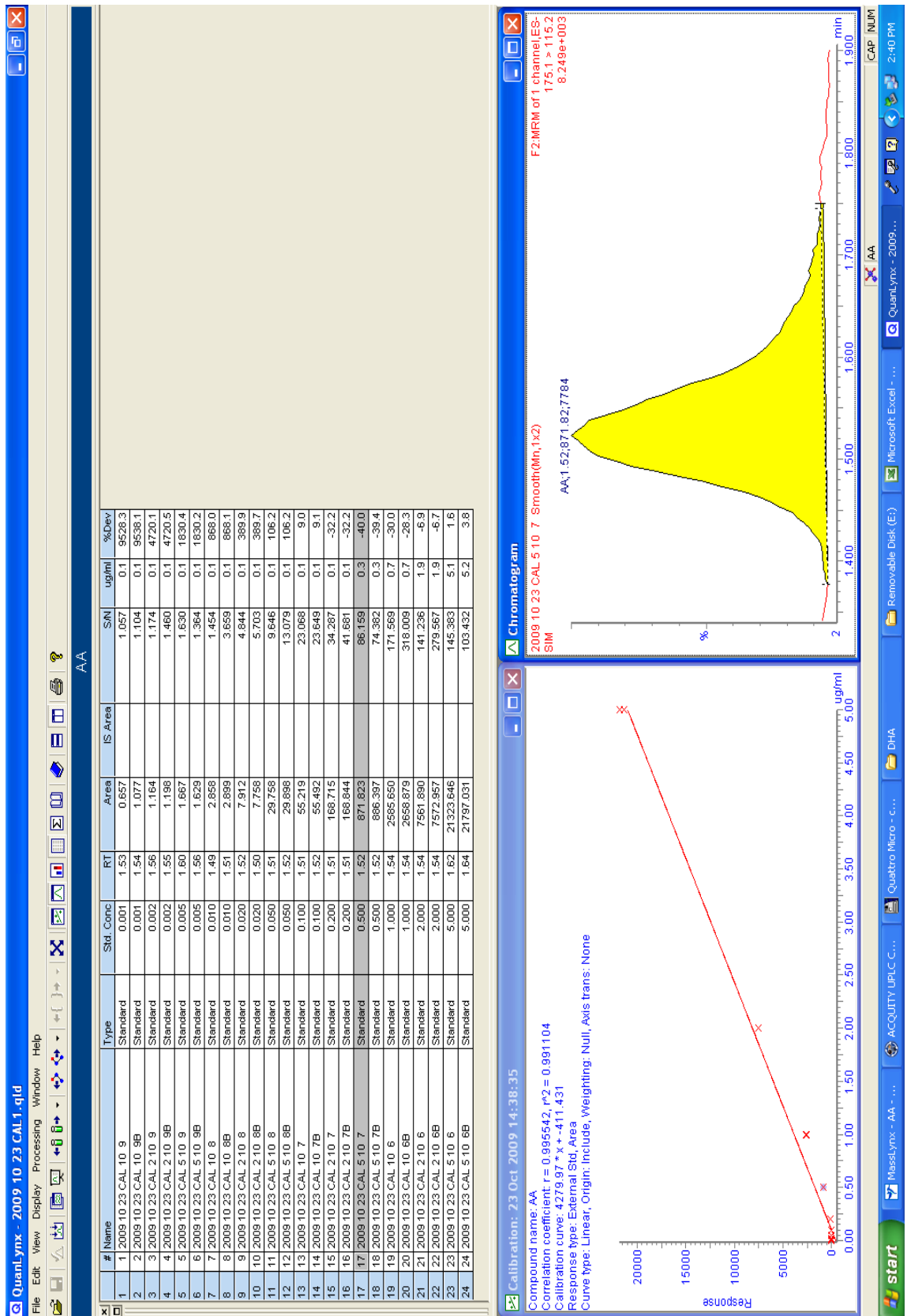
Tab.č.3: Výsledky SST pro SIM a SRM režim

4.3 Validace metody - Linearita a citlivost

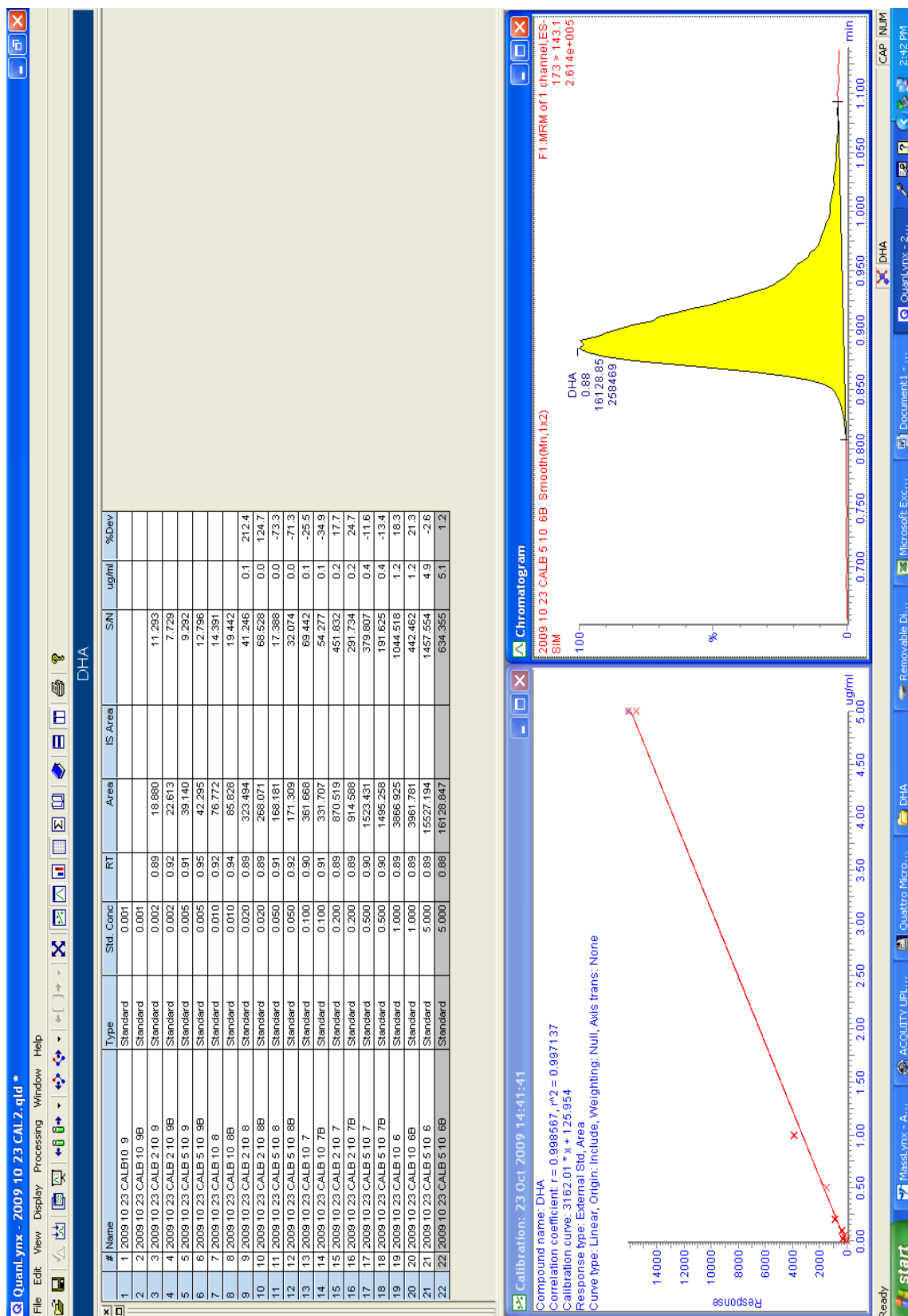
Všechny roztoky, pomocí kterých byla sestavena kalibrační křivka (obr.42,43), byly připraveny těsně před analýzou, aby se zabránilo nežádoucímu možnému rozkladu AA a DHA. Byly měřeny roztoky, obsahující AA i DHA v koncentracích 5 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,02 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,005 µg/ml, 0,002 µg/ml, 0,001 µg/ml.

Metodu lze považovat za vhodnou pro kvantitativní stanovení, pokud by byla kalibrační křivka lineární. Korelační koeficient pro AA je 0,9955, pro DHA je 0,9986. Tuto metodu lze považovat za vhodnou pro kvantitativní stanovení.

Limit detekce (LOD) pro AA byl naměřen $5 \cdot 10^{-8}$ µg/ml a limit kvantifikace (LOQ) byl naměřen $1,5 \cdot 10^{-8}$ µg/ml. LOD pro DHA byl naměřen $5 \cdot 10^{-9}$ µg/ml a LOQ pro DHA byl naměřen $1,5 \cdot 10^{-9}$ µg/ml.



Obr.42 : Kalibrační křivka AA



Obr.43 : Kalibrační křivka DHA

5.Závěr

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu ke stanovení AA a DHA ve vzorku pomocí UHPLC s detekcí pomocí hmotnostního detektoru.

Současné stanovení AA i DHA ve vzorku bylo náročné. Bylo potřeba najít optimální podmínky, za kterých by došlo k rozdělení obou složek.

Nejdříve bylo nutno nastavit iontový zdroj. Byla porovnáována chemická ionizace za atmosférického tlaku a ionizace elektrosprejem v pozitivním i negativním režimu. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pomocí ESI-.

Dalším krokem byla volba stacionární a mobilní fáze. Byla provedena měření s různým typem kolon a to kolonou BEH Shield RP C18, kolonou BEH HILIC a BEH Amide kolonou. Jako optimální byla zvolena kolona BEH Shield RP C18, kde bylo nejlepší rozlišení i retence obou analytů. Mobilní fáze se skládala z vodné a organické složky. Bylo nutné najít vhodné složení mobilní fáze, ale i koncentraci složek mobilní fáze. Organická složka mobilní fáze se skládala z ACN o koncentraci 65%.

Jako vodná složka mobilní fáze byly porovnávány ultračistá voda, látky s nízkým pH i látky s vysokým pH. Mezi látky kyselé povahy patřila kyselina mravenčí o koncentraci 0,1%, 0,05% a 0,01%, kyselina octová o koncentraci 0,1%, 0,05%, 0,01%, kdy se zvyšující koncentrací kyselin docházelo k lepšímu rozdělení AA a DHA, ale citlivost byla nízká. Dalším typem vodné složky byl mravenčan amonný o pH 3,5, ale nedošlo k rozdělení stanovovaných složek. Mezi látky neutrální patřil octan amonný o pH 6,8, ale nedošlo k rozdělení AA a DHA. Pro zvýšení stability analytů byly roztoky AA a DHA okyseleny 0,1%, 0,01% a 0,05% kyselinou octovou a dále 0,1%, 0,01%, 0,05% kyselinou mravenčí, nedocházelo ale rozdělení obou analytů, došlo ke změně chromatografické separace. K nejlepšímu rozdělení a citlivosti došlo při složení mobilní fáze ACN jako organická složka a ultračistá voda jako složka vodná v koncentraci 65:35. Retenční časy a plocha píků byly přijatelné. Retenční čas AA byl 1,85 a retenční čas DHA 0,89.

Po dokončení optimalizace byl proveden test opakovatelnosti. Kdy relativní směrodatná odchylka měření v SIM režimu pro AA byla 1,63%, což je velice dobrý výsledek a pro DHA je relativní směrodatná odchylka 8,95 %, což je uspokojivý výsledek. V SRM režimu byla relativní směrodatná odchylka plochy pro AA 9,58% a pro DHA 1,93%. RSD retenčních časů v SIM režimu pro AA byla 1,3% a pro DHA 0,69%. RSD retenčních časů v SRM režimu byla pro AA 1,12% a pro DHA 0,0%. Dále byla změřena kalibrační křivka, kdy hodnota spolehlivosti byla pro AA 0,9911 a pro DHA 0,9971. Limit detekce pro AA byl naměřen $1,5 \cdot 10^{-8}$ $\mu\text{g/ml}$, limit kvantifikace pro

AA byl naměřen $5 \cdot 10^{-8}$ $\mu\text{g/ml}$. Pro DHA byl limit detekce naměřen $1,5 \cdot 10^{-9}$ $\mu\text{g/ml}$ a limit kvantifikace $5 \cdot 10^{-9}$ $\mu\text{g/ml}$. Vyvinutá UHPLC-MS metoda je velmi citlivá v porovnání s HPLC metodami s UV detekcí, kde se LOD a LOQ pohybuje v řádu desetin až jednotek $\mu\text{g/ml}$ nebo i v řádu mg/ml . Jako například stanovení AA pomocí iontově vylučovací HPLC-UV při 243 nm, kde LOD=1mg/ml a LOQ=5mg/ml [33]. Nebo stanovení AA pomocí HPLC s využitím kolony LiChospher 100-RP 18 s UV detekcí při 254 nm, kde LOD=0,05 $\mu\text{g/ml}$ a LOQ=0,17 $\mu\text{g/ml}$ [33]. Dále stanovení AA a DHA pomocí HPLC-UV při 268nm a 210 nm, s využitím kolony HILIC a Obelisc N a Obelisc R, kde LOD=1,5 $\mu\text{g/ml}$ a LOQ=5 $\mu\text{g/ml}$ [34]. Ale bohužel relativní směrodatné odchylky retenčních časů pro AA nevyhovují předepsaným limitům, kdy maximální RSD pro retenční časy je 1%.

6. Použitá literatura

1. Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum 2005
2. Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum 2006
3. <http://www.hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>, listopad 2009
4. Fundamentals of Contemporary Mass Spektrometry , Wiley, USA, 2007
5. http://ach.upol.cz/ulohy/HPLC_ECD.pdf, říjen 2009
6. http://www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf, říjen 2009
7. http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/inan/inan_8.doc, říjen 2009
8. <http://www.hplc.cz/>, říjen 2009
9. http://aix.lin.upol.cz/~jirovsky/IM_HPLC_3.pdf, září 2009
10. Nguyen D.T.T., Guillarme D., Rudaz S. Veuthey J.L., Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, J.Sep.Sci.2006, 29, 1836-1848.
11. Joana Patricia Teixeira Mateus, Optimization of UPLC-MS/MS Metod for the determination of flavonoids in Chamomixe, FaF Hradec Králové, 2009
12. SeQuant, A Practical Guide to HILIC, Sequant, Umeå, Sweden, 2005
13. <http://www.waters.com>, únor 2010
14. Lucie Nováková, Hana Vlčková, A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods: Chromatography and Hample preparation, 656 (2009) 8-35.
15. <http://biomicro.vscht.cz/isolacebmm/prednaska3.pdf>, leden 2010
16. Český lékopis 2005, Grada Publishing, a.s. 2005
17. Xingnan Li, Adrian A. Franke, Fast HPLC-ECD analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and uric acid, J.Chromatogr.B (2009), doi:10.1016/j.jchromb.2009.02.008.
18. http://holcapek.upce.cz/teaching/MS1_uvod.pdf, září 2009
19. J.Zýka a kol., Analytická příručka II, Nakl. technické literatury, 1988
20. http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/vybranemet.htm, říjen 2009
21. Basics of LC/MS, Agilent Technologies, USA, 2002
22. <http://web.vscht.cz/poustka/ISM%20MS%20SEPARACE%20A%20DETEKCE%20IONTU%20102007.pdf>, říjen 2009
23. http://cheminfo.chemi.imuni.cz/chem_sekce/oredmety/C7300/MS/ms.pdf, září 2009
24. <http://www.hplc.chem.shu.edu/HPLC/index.html>, listopad 2009
25. http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/gc/GC02.pdf, říjen 2009
26. Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv II, Karolinum 2004
27. <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13660/III.pdf>, říjen 2009

28. Jens Lykkesfeldt, Ascorbic and dehydroascorbic acid as reliable biomarkers of oxidative stress: analytical reproducibility and long-term stability of plasma symplex subjected to acidic deproteinization, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Nov;16(11):2513-6.
29. Rival Cl., Salas-Burgos A., Mardones S., Vitamin C transporté, *J. Physiol Biochem.* 2008 Dec; 64(4):357-75.
30. Amako K., Ushimaru T., Ischikawa A. at al., Heterologous expression of dehydroascorbate reductase from rice and its application to determination of dehydroascorbate concentrations, *J. Nutr Sci Vitaminol (Tokio)*:2006 APR;52(2):89-95.
31. <http://www.uwsp.edu/chemistry/jlawrenc/content/Chem%20260%20Kontent/Chem%20260%20lab.pdf>, listopad 2009
32. M. Jenab, S. Bingham, P. Farrari at al., Long-term Cryoconservation and Stability of Vitamin C in serum Symplex of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Jul,14(7):1837-40.
33. Nováková L., Solich P., Solichová D., HPLC Metod for somultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 10 (2008) 942-958.
34. Nováková L., Solichová D., Solich P., Hydrophylic interaction liquid chromatography – charged aerosol detection as a straightforward solution for simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, *Journal of chromatography A* 1216 (2009) 4574-4581.
35. Li X., Franke A. A., Fast HPLC-ECD analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and uric acid, *Journal of Chromatography B*, 877 (2009) 853-856.
36. Oms-Oliu G. at al., Effect of high-intensity pulsed electric field processing conditions on lycopene, vitamin C and antioxidant kapacity of watermelon juice, *Food Chemistry* 115 (2009) 1312-1319.
37. Yasunori Sato, Takayuki Uchiki at al., Determination of Dehydroascorbic Acid in Mouse Tissues and Plasma by Using Tris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochloride as Reductant in Metaphosphoric Acid/Ethylenediaminetetraacetic Acid Solution, *Biol. Pharm. Bull.* 33(3) 364-369 (2010).
38. Moraes FA at al., Vitamin C loss in vegetables during storage, preparation and distribution in restaurants, *Ciencia & Saúde Coletiva*, 15(1):51-62, 2010.
39. http://natur.cuni.cz/~suchan/IEC_SEC_AC.pdf, září 2009
40. http://www.chemistry.nmsu.edu/instrumentation/Waters_MS_Proc.html

