

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

Stanovení kyseliny askorbové s využitím metody HILIC
– porovnání HILIC stacionárních fází

(diplomová práce)

Poděkování:

Děkuji PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady poskytnuté při vypracování diplomové práce.

Dále děkuji všem pracovníkům Katedry analytické chemie, kteří mi během mé práce byli jakkoli nápomocní.

Prohlášení:

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

V Hradci Králové

Kateřina Bielešová

Abstrakt

Tato diplomová práce byla zaměřena na stanovení kyseliny askorbové (AA) metodou Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) a porovnání HILIC stacionárních fází.

Stanovení probíhalo za použití tří typů detekce. Pro optimalizaci metody byla použita ultrafialová (UV) detekce. Pro stanovení AA a DHA (kyselina dehydroaskorbová) na jednotlivých stacionárních fázích byly použity detektory na bázi aerosolu Charged Aerosol Detector (CAD) a Nano Quantity Analyte Detector (NQAD).

V rámci optimalizace metody byly zjišťovány vhodné podmínky stanovení AA a DHA. Vodnou složku mobilní fáze tvořila ultračistá voda, kyselina octová nebo octan amonný o rostoucí síle pufru a různé hodnotě pH. Organickou složkou byl acetonitril. Během optimalizace byl sledován vliv postupné změny koncentrací vodné a organické složky.

Porovnávanými stacionárními fázemi byly Atlantis T3 a fáze vyvinuté speciálně pro stanovení metodou HILIC – Luna HILIC a ZIC-HILIC.

V případě kolon Luna HILIC a Atlantis T3 nedošlo k oddělení obou analytů od mrtvého retenčního času. Na koloně ZIC-HILIC došlo k separaci analyzovaných látek, píky však byly příliš široké a nesymetrické. Žádná z uvedených kolon tedy nebyla vyhodnocena jako vhodná pro stanovení AA a DHA.

Součástí této diplomové práce bylo také ověření vhodnosti použití detektoru Corona CAD. CAD umožňuje současnou detekci AA a DHA za podmínek nalezení vhodné chromatografické soustavy.

V rámci hledání nových možností stanovení AA a DHA byl testován také nový typ detektoru na bázi aerosolu NQAD. Výsledkem však byla nízká reprodukovatelnost. Bylo zjištěno, že detektor je málo robustní, velmi citlivý na použití pufrů jako vodné složky mobilní fáze, typ kolony a vyžaduje použití chemikálií té nejvyšší čistoty.

Proto byla validována metoda HILIC s kolonou Obelisc R za podmínek, které by v budoucnu mohly být použitelné ve spojení s tímto detektorem. Byla měřena správnost, přesnost, linearita a robustnost.

Abstract

This thesis was focused on the determination of ascorbic acid (AA) using Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC) approach and the comparison of HILIC stationary phases.

Determination was carried out using three types of detection. To optimize the method ultraviolet (UV) detection was used. For the determination of AA and DHA (dehydroascorbic acid) on different stationary phases aerosol based detectors Charged Aerosol Detector (CAD) and Nano Quantity Analyte Detector (NQAD) were used.

During method optimization suitable conditions for the determination of AA and DHA have been defined. Aqueous part of the mobile phase was formed by water, acetic acid or ammonium acetate buffer of increasing strength and different pH. Organic part was formed by acetonitrile. During the optimization the influence of gradual changes of water and organic part has been monitored.

Compared stationary phases were Atlantis T3 and those specially developed for the determination by HILIC method – Luna HILIC and ZIC-HILIC.

In the case of Luna HILIC and Atlantis T3 both analytes were not separated from the dead retention time. On ZIC-HILIC column separation of substances occurred, but peaks were too broad. None of these columns has been evaluated as suitable for the simultaneous determination of AA and DHA.

A part of this thesis was to verify the possibility of using the Corona CAD detector. CAD enables simultaneous detection of AA and DHA in terms of finding a suitable chromatographic system.

New type of aerosol based detector NQAD was tested as a new option for simultaneous determination of AA and DHA. Unfortunately low reproducibility has been observed. It was found that the detector was not robust enough and it was very sensitive to the use of buffers as the aqueous component of mobile phase, type of the column and it required the use of chemicals of the highest purity.

A HILIC method using Obelisc R was applied for the method validation under the conditions which can be applied in connection with NQAD in the future. Recovery, precision of the method, linearity and robustness were measured.

Obsah

Obsah.....	6
Seznam použitých zkratek.....	9
1. Úvod a cíl práce.....	11
1.1 Úvod.....	12
1.2 Cíl práce	13
2. Teoretická část.....	14
2.1 Chromatografické metody.....	15
2.1.1 Princip chromatografických metod	15
2.1.2 Kapalinová chromatografie	15
2.1.2.1 Vysoko účinná kapalinová chromatografie	16
2.1.2.2 Test způsobilosti systému a validace HPLC metody	18
2.1.3 Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)	23
2.1.3.1 Mobilní fáze pro HILIC.....	25
2.1.3.2 Stacionární fáze pro HILIC	26
2.1.3.2 Využití metody HILIC.....	32
2.2 Stanovení kyseliny askorbové a kyseliny dehydroaskorbové	32
2.2.1 Kyselina askorbová.....	32
2.2.2 Kyselina dehydroaskorbová	34
2.2.3 Simultánní stanovení AA a DHA	37
2.2.3.1 Stabilita AA a DHA	37
2.2.3.2 Metody stanovení	39
2.2.3.3 Detekce AA/DHA.....	48
2.2.3.4 Detektory na bázi aerosolu.....	51
3. Experimentální část	55
3.1 Použité chemikálie.....	56
3.2 Přístrojové vybavení	56
3.3 Příprava mobilní fáze a analytů	57
3.3.1 Příprava mobilní fáze	57
3.3.2 Příprava analytů a vzorků	57
3.4 Optimalizace metody	58
3.5 Využití detektoru Corona CAD pro stanovení AA a DHA.....	58
3.6 Využití detektoru NQAD pro stanovení AA a DHA.....	59
3.7 Validace metody a analýza reálných vzorků.....	59
4. Výsledky a diskuse	61

4.1 Optimalizace podmínek stanovení.....	62
4.2 Použití detektoru Corona CAD	68
4.3 Použití detektoru NQAD	70
4.4 Test způsobilosti systému.....	73
4.5 Validace metody a analýza reálných vzorků.....	74
5. Závěr	79
6. Použitá literatura	82

Seznam použitých zkratek

AA	– kyselina askorbová
AA-2G	– 2-O- α -D-glukopyranosyl-L-askorbová kyselina
AA-2 β G	– 2-O- β -D-glukopyranosyl-L-askorbová kyselina
AcAc	– kyselina octová
ACN	– acetonitril
AmAc	– octan amonný
AmF	– mravenčan amonný
BAL	– 2,3-dimerkapto-1-propanol
CAD	– Charged Aerosol Detector
CTMAB	– cetyltrimetylamonium bromid
DAD	– detektor s diodovým polem
DHA	– kyselina dehydroaskorbová
DKG	– kyselina diketogulonová
DTEAP	– dodecyltrietylamonium fosfát
DTMACl	– dodecyltrimetylamonium chlorid
DTT	– dithiotreitol
ED	– elektrochemická detekce
EDTA	– etylendiamin-tetraoctová kyselina
ELSD	– Evaporative Light Scattering Detector
ESI	– ionizace elektrosprejem
FD	– fluorescenční detekce
GLUT	– glucose transporter
GSH	– glutation
GSSG	– oxidovaný glutation
HILIC	– Hydrophilic Interaction Chromatography
HPLC	– vysoko účinná kapalinová chromatografie
IS	– vnitřní standard
LOQ	– limit kvantifikace
LOD	– limit detekce
MS	– hmotnostní spektrometrie
MS-SIM	– mass spectrometry-selected ion monitoring

NP-HPLC	– vysoko účinná kapalinová chromatografie na normální fázi
NQAD	– Nano Quantity Analyte Detector
OPDA	– o-fenyldiamin
PS/DVB	– polystyren/divinylbenzen
PS/PVD	– polystyren/polyvinylpyridin
rec	– výtěžnost
RP-HPLC	– vysoko účinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RSD	– relativní směrodatná odchylka, která popisuje přesnost metody
SAX	– silný anex
TCEP	– [2-karboxyetyl]fosfan
TFA	– trifluoroctová kyselina
UA	– močová kyselina
UV	– ultrafialová
WAX	– slabý anex
WCPC	– Water Condensation Particle Counter

1. Úvod a cíl práce

1.1 Úvod

Kyselina askorbová (AA) a kyselina dehydroaskorbová (DHA) patří do skupiny malých polárních molekul. Hlavními zdroji AA jsou ovoce a zelenina. Biologicky aktivním izomerem je L-AA. Při vystavení AA oxidativnímu stresu, zvýšené teplotě, působení enzymů nebo působení dvojmocných kationtů kovů dochází k rychlé oxidaci na DHA.

Stanovení AA je prováděno různými metodami. V minulosti byly použity metody kapalinové a plynové chromatografie, dále pak metody enzymatické, spektrofotometrické, průtokově injekční a elektrochemické. Používanými metodami jsou také kapilární elektroforéza, voltametrie a chemiluminiscence.

Preferovanou metodou pro stanovení AA je vysoko účinná kapalinová chromatografie, neboť poskytuje vyšší selektivitu než metody spektrofotometrické, titrační či enzymatické.

Nejčastěji používaným typem detekce AA je detekce ultrafialová nebo elektrochemická. Méně často se používá detekce fluorescenční, kdy je nutná derivatizace DHA a další oxidace AA na DHA. Dalším, ne příliš využívaným, typem detekce je detekce pomocí hmotnostní spektrometrie. Tyto metody poskytují nejvyšší citlivost a selektivitu. Hmotnostní spektrometrie je však finančně náročná metoda s vysokými provozními náklady, díky čemuž je nedostupná pro mnoho laboratoří.

Tato diplomová práce se zabývá stanovením AA využitím metody Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). Jedná se o metodu vhodnou pro stanovení malých polárních molekul, které jsou slabě zadržovány nebo vymývány s mrtvým objemem při použití vysoko účinné kapalinové chromatografie s reverzním systémem fází. Dochází k rozdělování analytu mezi hydrofilní stacionární fází a relativně hydrofobní mobilní fází, která je nejčastěji tvořena směsí 5 – 40% vody a acetonitrilu (ACN).

1.2 Cíl práce

Diplomová práce je zaměřena na stanovení AA a jejího oxidačního produktu DHA pomocí HILIC při využití Charged Aerosol Detector (CAD). Součástí práce je porovnávání stacionárních fází, které jsou vyvinuty speciálně pro metodu HILIC.

Cílem práce je prozkoumat nové možnosti stanovení AA a DHA a určit optimální podmínky jejich stanovení, tzn. typ kolony, velikost průtoku, teplota a složení mobilní fáze.

2. Teoretická část

2.1 Chromatografické metody

2.1.1 Princip chromatografických metod

Chromatografické metody jsou separační metody, které umožňují analýzu směsí látek z hlediska kvalitativního i kvantitativního hodnocení separovaných složek. Z tohoto důvodu jsou v analýze chemických látek široce využívány.

Jejich princip spočívá v rozdělení analyzovaných látek mezi dvě fáze - stacionární (pevná, sorbent) a mobilní (pohyblivá, eluent). Během chromatografického procesu dochází k několikanásobnému vytvoření rovnovážných stavů dělených látek mezi těmito fázemi. Při styku stacionární a mobilní fáze s dělenými látkami dochází ke vzájemným interakcím, které jsou základem pro jejich separaci [1].

K vlastnímu dělení látek dochází na základě brzdící síly (retence), která působí selektivně. Některá látka je zadržována více, jiná méně. Čím pevněji je látka zadržována na stacionární fázi, tím pomaleji v chromatografickém systému postupuje [2].

Chromatografické metody mohou být, podle typu mobilní fáze, rozděleny na plynovou a kapalinovou chromatografii. Podle použité techniky se dělí na chromatografii tenkovrstvou, papírovou nebo kolonovou. Na základě procesu separace můžeme jednotlivé chromatografické metody rozdělit na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou a afinitní [1].

2.1.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je jednou z chromatografických separačních metod. Při kolonové chromatografii se k dělení látek používá chromatografická kolona. Je to skleněná, ocelová nebo plastová trubice naplněná drobnými částicemi sorbentu. Určitá oblast sorbentu je přístupná pro molekuly vzorku a tvoří stacionární fázi. Mezi částicemi sorbentu protéká kolonou mobilní fáze. Roztok vzorku je nastříknut v úzké zóně na začátek kolony. V kontaktu se sorbentem každá složka vzorku přechází zčásti do stacionární fáze ve snaze dosáhnout termodynamické rovnováhy. Mobilní fáze, vystupující z kolony, je

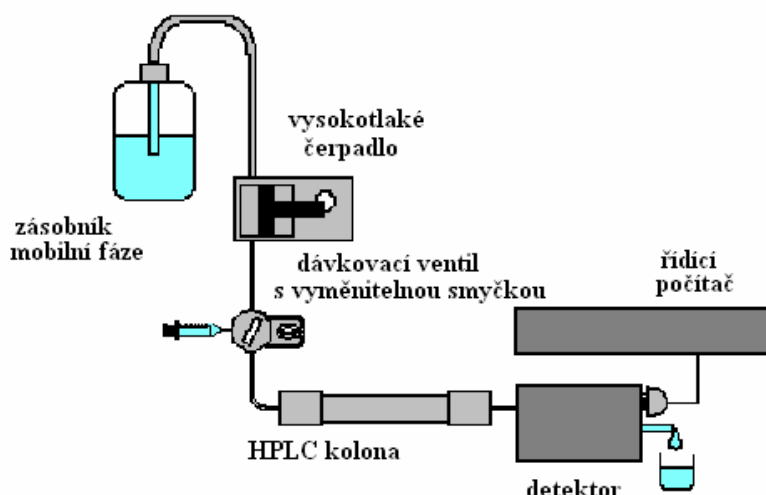
vedena do detektoru, který na základě změny některé fyzikální nebo fyzikálně-chemické veličiny signalizuje přítomnost separovaných složek [3].

2.1.2.1 Vysoko účinná kapalinová chromatografie

Vysoko účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) je metoda, jejíž vývoj začal v 70. letech 20. století. Umožňuje analýzu tepelně nestálých nebo netěkavých látek a polymerů. Separační účinnost závisí na velikosti částic stacionární fáze. Čím menší a stejnoměrnější částice jsou, tím větší je účinná plocha a separační účinnost.

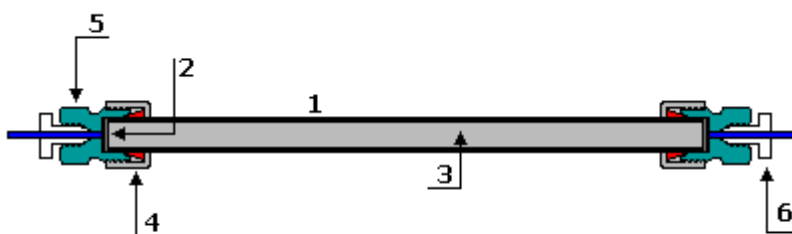
Existují dva typy eluce. Pro dělení směsi látek, jejichž eluční parametry nejsou příliš rozdílné, se používá eluce izokratická. Při této eluci se během chromatografické analýzy složení mobilní fáze nemění. Druhým typem je gradientová eluce, která se využívá v případě směsi látek, které se svými elučními parametry liší. Princip spočívá v tom, že se k jedné mobilní fázi plynule přimíchává rostoucí množství jiné mobilní fáze s větší eluční silou. Vytváří se plynulý koncentrační gradient mobilní fáze. Pro eluci lze použít i gradient pH [2].

Přístroj používaný při HPLC analýzách se označuje jako kapalinový chromatograf. Základními částmi kapalinového chromatografu (Obr. 1) jsou zásobník mobilní fáze, vysokotlaké čerpadlo, programovací jednotka pro nastavení požadovaného složení mobilní fáze, dávkovací zařízení, kolona, detektor a počítač se softwarem [1].



Obr. 1: Schéma kapalinového chromatografu [4]

Chromatografické kolony (Obr. 2) mají trubkovitý tvar, délku 10 – 25 cm a vnitřní průměr 3 – 5 mm. Nejčastěji se používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze, kdy jsou na hydroxylové skupiny na povrchu silikagelových zrněk navázány radikály. Mohou to být uhlovodíkové řetězce (délka 8 nebo 18 uhlíků), což jsou nepolární chemicky vázané fáze (reverzní fáze). Radikál může obsahovat tříuhlíkatý řetězec zakončený skupinami $-NH_2$, $-CN$ aj., kdy se jedná o fáze středně polární. Jako polární sorbenty lze použít silikagel a oxid hlinitý, které se však používají mnohem méně než chemicky vázané stacionární fáze [1]. Chromatografické kolony musí být chemicky inertní, odolné vůči poměrně vysokým tlakům a vnitřní povrch jejich pláště musí být dostatečně hladký [5].



Obr. 2: Chromatografická kolona; 1 – kovový plášť, 2 – porézní kovová frit, 3 – stacionární fáze, 4 – ochranný kroužek, 5 – koncová hlavice, 6 – vstup pro kapiláru se šroubem [5]

Citlivost a selektivita chromatografické analýzy závisí na použitém detektoru [1]. Na detektory jsou kladeny mimořádné požadavky. Důležitá je vysoká citlivost pro možnost detekce látek v koncentracích μg až ng/ml , reprodukovatelnost a linearita odezvy, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnost [2]. Existuje několik typů detektorů. Nejpoužívanější jsou spektrofotometry pro měření v ultrafialové a viditelné oblasti, včetně detektorů s diodovým polem. Mohou být také použity fluorescenční spektrofotometry, diferenční refraktometry, elektrochemické detektory, hmotnostní spektrometry, detektory na bázi rozptylu světla, měření radioaktivity a další [6].

Grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá chromatogram. Jeho začátek je kladen do okamžiku nástřiku vzorku na kolonu.

Každé rozdělené složce odpovídá na chromatogramu jeden pík, který má v ideálním případě tvar Gaussovy křivky [3].

Mezi nejdůležitější oblasti využití HPLC v analýze léčiv patří identifikace léčiv, stanovení obsahu a čistoty. Na základě HPLC analýzy lze hodnotit obsah a zastoupení alkaloidů, glykosidů, vitaminů apod. v rostlinných drogách. Při stabilitních studiích lze získat informace o rozkladných procesech. Další možností využití je monitorování léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách. Před analýzou je však nutné léčivo a jeho metabolity z analyzované tělní tekutiny izolovat [1].

2.1.2.2 Test způsobilosti systému a validace HPLC metody

Pro zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému slouží test způsobilosti systému. K hodnocení účinnosti kolony se používá stanovení zdánlivé účinnosti, kapacitního faktoru, rozlišení, relativní retence a faktoru symetrie. Mezi faktory, které mohou ovlivnit chromatografické chování, patří složení mobilní fáze, její iontová síla, teplota a pH, průtoková rychlost, délka kolony, teplota a charakteristika stacionární fáze (porozita, velikost a typ částic, specifický povrch). U nosičů používaných v chromatografii s reverzními fázemi má vliv rozsah chemické modifikace (odstranění povrchových silanolových skupin, obsah vázaného uhlíku) [6].

Retenční čas a retenční objem

Poloha maxima píku je vyjádřena retenčním časem t_r . Z retenčního času lze vypočítat retenční objem (V_r) podle vzorce:

$$V_r = t_r v$$

t_r – retenční čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce
 v – průtoková rychlost mobilní fáze [6]

Hmotnostní distribuční poměr

Hmotnostní distribuční poměr (D_m) je též znám jako kapacitní faktor k' nebo retenční faktor k . Je definován jako:

$$D_m = \frac{n_s}{n_m} = K_c \frac{V_s}{V_m}$$

n_s – množství rozpuštěné látky ve stacionární fázi

n_m – množství rozpuštěné látky v mobilní fázi

K_c – rovnovážný distribuční koeficient (distribuční konstanta)

V_s – objem stacionární fáze

V_m – objem mobilní fáze

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

$$D_m = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

t_r – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

t_m – mrtvý retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce [6]

Separační faktor

Separační faktor (α), znám jako faktor selektivity, lze vypočítat ze vzorce:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

$\alpha = 1,0$: píky se překrývají

$\alpha > 1,0$: dochází k separaci píků

$\alpha = 1,4$: dochází k „úplné“ separaci píků (na základní linii)

k – retenční faktory separovaných látek, také známy jako hmotnostní distribuční poměr (Dm) [7]

Faktor symetrie

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

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ – šířka 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 [6].

Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater

Účinnost kolony (zdánlivou) lze vypočítat jako zdánlivý počet teoretických pater (N) z dat získaných v závislosti na technice za podmínek izotermických, izokratických nebo izopyknických.

Používá se následující vzorec, kde hodnoty t_r a w_h musí být vyjádřeny ve stejných jednotkách (času, objemu nebo vzdálenosti):

$$N = 5,54 \left(\frac{t_r}{w_h} \right)^2$$

t_r – retenční čas nebo vzdálenost (nebo objem) podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

w_h – šířka píku v polovině jeho výšky

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem [6].

Rozlišení

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

$$R_s = \frac{1,18(t_{r2} - t_{r1})}{W_{h1} + W_{h2}}$$

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

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

W_{h1} a W_{h2} – šířky píků v poloviční výšce

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. Pro píky, které se vzájemně značně liší svými výškami, nemusí být výše uvedený vzorec vhodný [6].

Relativní retence

Relativní retence (r) se vypočítá ze vzorce:

$$r = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m}$$

t_{r2} – retenční čas sledovaného píku

t_{r1} – retenční čas referenčního píku (obvykle pík odpovídající zkoušené látce)

t_m – mrtvý retenční čas nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce [6]

Opakovatelnost

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky ($RSD\%$) v procentech pro řadu následných měření porovnávacího roztoku a vypočítá se ze vzorce:

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

y_i – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu

\bar{y} – průměr jednotlivých hodnot

n – počet jednotlivých hodnot [6]

Důležitou součástí analytického stanovení je validace metody. Jejím smyslem je demonstrovat, že vypracovaná metoda je pro daný účel vhodná. Cílem je určit podmínky, za kterých je zkušební postup použitelný a zajistit stejnou spolehlivost při opakovaném použití v jedné nebo různých laboratořích. Součástí validace je mimo jiné stanovení správnosti, přesnosti, linearit a provedení testu způsobilosti systému [8].

Správnost

Správnost vyjadřuje shodu mezi získaným výsledkem a správnou hodnotou. Správnou hodnotu lze zjistit buď jinou nezávislou metodou s ověřenou správností, nebo přípravou modelového vzorku ze všech složek přípravku a přidaného standardu. Pokud nejsou k dispozici všechny složky přípravku, analyzuje se přípravek se známým přidavkem standardu.

Obvykle se provádí analýza nejméně šesti vzorků a správnost je vyjádřena jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako obsah.

$$\text{výtěžnost} = \frac{100 \cdot \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

[8]

Přesnost

Přesnost je míra shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně získanými s jedním homogenním vzorkem. Analýza obvykle probíhá šestkrát. Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka těchto šesti stanovení. Opakovatelnost se stanoví, když se metoda opakuje stejným způsobem jedním pracovníkem se stejnými činidly na tomtéž přístroji. Mezilehlá přesnost se provádí s různými činidly, analytiky i přístroji, různý den, ale v jedné laboratoři se stejným vzorkem. Reprodukovatelnost se provádí stejně jako mezilehlá přesnost s tím rozdílem, že probíhá v různých laboratořích [8].

Linearita

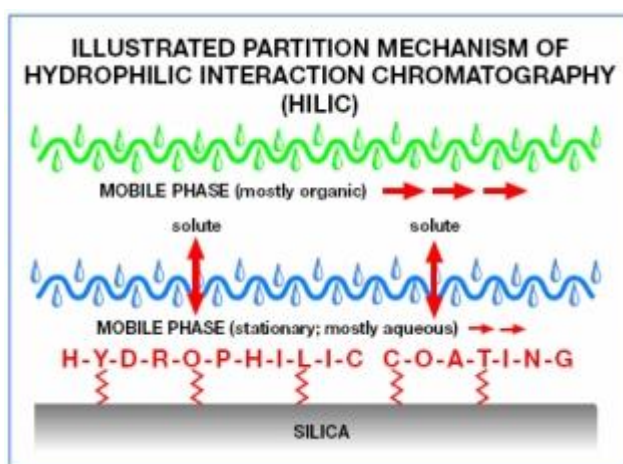
Linearita je schopnost dávat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Stanovuje se minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150% deklarovaného obsahu. Pokud je metoda lineární, lze určit směrnici z jednoho kalibračního bodu. Pokud není, výsledky jsou vyhodnocovány z celé kalibrační křivky [8].

2.1.3 Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)

HILIC je chromatografická metoda, která je charakterizována použitím hydrofilní stacionární fáze a relativně hydrofobní organické mobilní fáze. Tuto metodu původně popsal Linden a spol. v roce 1975 [9]. Pojmenována byla Alpertem až v roce 1990 [10].

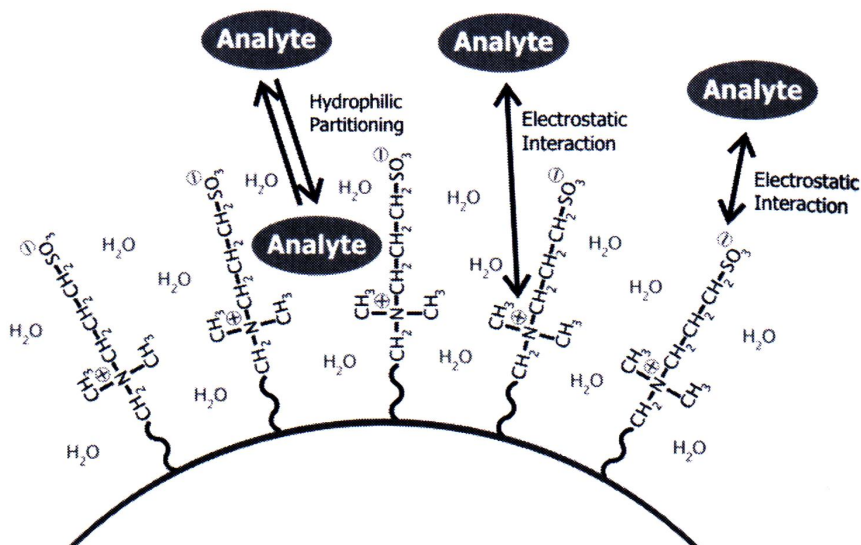
HILIC je alternativou konvenční HPLC za použití normální (NP-HPLC) i reverzní (RP-HPLC) fáze a je vhodná pro analýzu malých polárních molekul, které jsou slabě zadržovány nebo vymývány s mrtvým objemem při použití konvenční RP-HPLC. NP-HPLC byla často nahrazována metodou HILIC z důvodu špatné reprodukovatelnosti, nízké rozpustnosti analytů v mobilní fázi a kvůli problémům při spojení s detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (MS) [11].

Retence analytu je způsobena jeho rozdělováním mezi vrstvou hydrofilní stacionární fáze obohacené vodou a poměrně velkým množstvím hydrofobního eluentu, což je nejčastěji směs 5 – 40% vody a ACN. Vodou obohacená vrstva je vázána na stacionární fázi, kde dochází k oddělení rozpuštěných látek z mobilní fáze do hydrofilní vrstvy [11]. Hydrofilnější stacionární fáze poutá vodu z mobilní fáze a retence rozpuštěných látek se zvyšuje. Mechanismus retence lze tedy jednoduše vysvětlit jako rozdělování rozpuštěných látek mezi na vodu bohatší stacionární fází a na vodu chudší mobilní fází [12]. Separační princip HILIC je uveden na Obr. 3.



Obr. 3: Separační princip HILIC [13]

Primárním mechanismem separace je rozdělování na základě vodíkových vazeb, sekundárním mechanismem, který může ovlivnit selektivitu, jsou elektrostatické interakce s nabitou stacionární fází (Obr. 4). Eluce je umožněna zvyšováním polaritativy mobilní fáze, tzn. zvyšujícím se podílem vodné složky [11]. Retence roste s polaritou rozpuštěných látek a klesá se zvýšením polaritativy mobilní fáze (klesá s rostoucím podílem vody nebo pufru) [12].



Obr. 4: Primární a sekundární mechanismus separace HILIC [14]

Výhodou této metody je použití vysokého procenta organického rozpouštědla, což umožňuje spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií a dosažení vysoké citlivosti [11].

2.1.3.1 Mobilní fáze pro HILIC

Mobilní fáze je z velké části tvořena organickým rozpouštědlem (ACN), které je doplněno malým množstvím vody nebo těkavého pufru [11]. ACN má nízkou viskozitu a díky tomu lze dosáhnout vysoké účinnosti separace a nízkého tlaku na koloně. Může být použit také isopropanol, přičemž viskozita mobilní fáze je pak vyšší [12]. Pro získání reprodukovatelných výsledků musí být v mobilní fázi nejméně 3% vody. Toto množství vody je nezbytné pro zajištění dostatečné hydratace částic stacionární fáze. Je známo, že s rostoucí koncentrací organického rozpouštědla roste retence [14]. V současnosti se doporučuje používat pufr, aby se snížil vliv elektrostatických interakcí mezi nabitými analyty a deprotonovanými silanolovými skupinami stacionární fáze. Tyto interakce jsou hlavním faktorem pro rozdělení nabitých molekul na všech typech kolon se silikagelem. Např. základní analyty mohou být odděleny mechanismem iontové výměny za použití čistého silikagelu [10].

2.1.3.2 Stacionární fáze pro HILIC

Stacionární fáze je velmi hydrofilní, může ji tvořit silikagel, polární vázané fáze, polární polymerní fáze nebo iontoměniče [12]. Má polární charakter a nejčastěji obsahuje hydroxyetylové skupiny, diolové skupiny, aminoskupiny nebo se může jednat o speciální druh „zwitteriontovou“ stacionární fázi a další [11].

Základem jsou stacionární fáze tvořené čistým silikagelem nebo silikagelem s navázaným aminopropylem [10]. Existuje několik komerčně vyráběných HILIC fází. Mohou být neutrální (nižší selektivita, závislost na pH), polární (dobrá selektivita, závislost na pH, silné interakce iontů) nebo amfoterní (zwitteriontové – dobrá selektivita, slabé iontové interakce, nezávislé na pH, stabilní vodná vrstva) [15].

Čistý silikagel

Velká část publikovaných prací využívá právě tento typ konvenčních čistých silikagelových stacionárních fází. Je vhodný pro spojení kapalinové chromatografie s MS díky absenci ligandů. Mezi kolony s čistým silikagelem patří např. Betasil, ChromoLith, Hypersil, Kromasil a další [10].

Silikagel s chemicky vázaným aminopropylem

Silikagel s chemicky vázaným aminopropylem byl použit jako první sorbent s navázaným organickým zbytkem pro separaci sacharidů metodou HILIC [10]. Jeho nevýhodou je to, že díky aminoskupinám vázaným na silikagel vzniká alkalické prostředí v pórech silikagelu, což je příčinou jeho pomalého rozpouštění a hydrolýzy chemicky vázané fáze [12].

Nesilikagelové stacionární fáze modifikované aminem

Aminem modifikované stacionární fáze na bázi organických polymerů mají mnohem lepší stabilitu než sorbenty tvořené silikagelem s chemicky vázaným aminopropylem. Mohou být použity jak při kyselých, tak při zásaditých podmínkách. Využívají se např. pro „velikostní rozdělení“ ve strukturní analýze oligosacharidů a pro analýzu fluorouracilu, taurinu a methioninu [10].

Silikagel s chemicky vázaným amidem

Hydrofilní fáze obsahuje amidovou skupinu na krátkém alifatickém řetězci. Amidová skupina je méně reaktivní než aminoskupina a postrádá její zásaditost. Retence na těchto kolonách je tudíž méně citlivá k pH mobilní fáze a méně náchylná k ireversibilní chemisorpci. Absence primární aminoskupiny brání tvorbě Schiffových bází s redukujícími cukry a dalšími karbonylovými sloučeninami [10].

Silikagel s chemicky vázaným polysukcinimidem a jeho deriváty

Tato stacionární fáze vzniká na základě kovalentní reakce polysukcinimidu a silikagelu s vázaným aminopropylem. Primární reakcí vzniká povrchová vrstva tvořená polyamid/imidem vázaná na několika místech, čímž jsou části polysukcinimidových kruhů přístupné pro tvorbu amidových vazeb s aminopropylovými funkčními skupinami.

Pouze části sukcinimidových kruhů jsou vázány. Zbytek kruhů zůstává neporušený a přístupný pro reakci s nukleofily, což může být využito pro tvorbu mnoha funkčních derivátů silikagelu [10].

Silikagel s chemicky vázanými diolovými skupinami

Z hlediska polaritě se nejvíce podobá klasickému silikagelu. Jedním z důvodů jeho přípravy bylo řešení problematických adsorpčních vlastností čistého silikagelu. Díky vysoké polaritě a vlastnostem vodíkových vazeb,

společně s absencí odštěpitelných funkčních skupin, by měl brzy být ideální možností pro aplikace HILIC se zamýšleným použitím kombinovaného režimu interakcí, kde nejsou žádoucí iontové interakce se silanolovými skupinami [10].

Cyklodextrinové kolony

Cyklodextrinové kolony jsou tvořeny silikagelovými obaly s navázanými cyklickými oligosacharidy tvořenými pěti a více 1→4 α -D-glukopyranosidovými jednotkami. Konfigurace těchto molekul se podobá prstencům s širokými a úzkými vchody, které exponují sekundární a primární hydroxylové skupiny rozpouštědlu. Vnitřní část prstence je značně méně hydrofilní než vnější část a může proto vázat hydrofobní molekuly. Dutiny jsou tvořeny opticky aktivními cukry, mají chirální vlastnosti a používají se jako chirální selektory v mnoha oblastech separační vědy. Vysoká hustota hydroxylových skupin je to, co dělá tyto fáze zajímavými pro využití metodou HILIC [10].

Silikagel s chemicky vázaným kyanopropylem

V současné době se tato stacionární fáze používá jen zřídka. Absence schopnosti poskytovat vodíkové vazby způsobuje nízkou NP-HPLC retenci a nachází uplatnění při RP-HPLC. Tento sorbent je však pro HILIC nepraktický z důvodu nutnosti používání vysokých koncentrací ACN. Další nevýhodou je mechanická nestabilita při použití rozpouštědel střední polarita. Tato nestabilita je způsobena poklesem sil mezi částicemi, které udržují integritu vrstvy v nepolárních nebo vysoce polárních rozpouštědlech [10].

Sulfonovaný styren-divinylbenzen

Tato fáze může být pro HILIC použita, pokud je stupeň sulfonace dostatečně vysoký. Při použití mobilní fáze tvořené 5% vody a 95% ACN bylo zjištěno, že separace etylenglykolu, propylenglykolu a glycerolu závisí na stupni sulfonace a přítomnosti opačného iontu vázaného na sulfonové skupiny stacionární fáze [10].

Silikagel s chemicky vázaným sulfoalkylbetainem

Posledním přírůstkem do souboru fází vhodných pro HILIC je fáze tvořená polymerní vrstvou roubovanou sulfoalkylbetainovými zwiteriontovými funkčními skupinami 3-sulfopropyldimetylalkylamonné soli na silikagelu se širokými póry. Současná přítomnost kvartérní amoniové a sulfonové skupiny v poměru 1:1 poskytuje celkový nulový náboj [10].

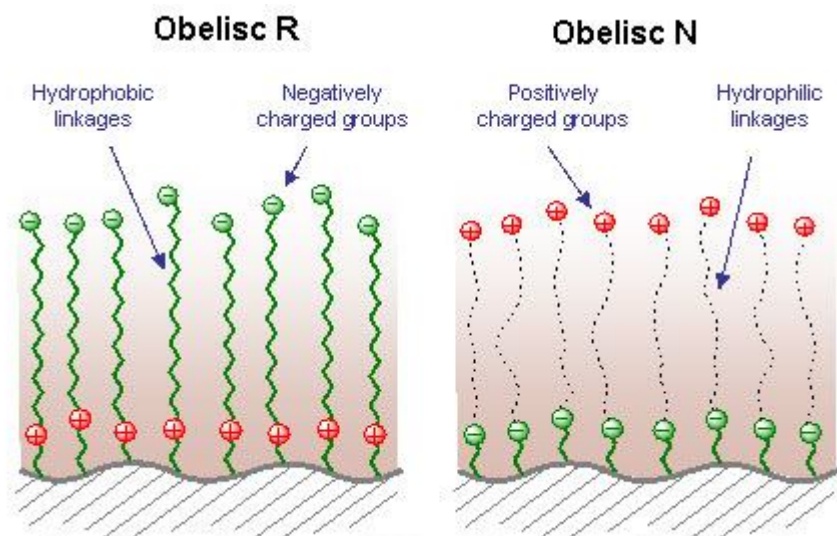
Sulfoalkylbetainové zwiteriony jsou však stále silnými osmolyty se silnou schopností vázat vodu na povrchu. Tyto materiály byly původně vyvinuty pro separaci anorganických solí, malých iontových sloučenin a také proteinů ve zcela vodných mobilních fázích s nízkým obsahem solí. Hlavní využití však našly při použití metody HILIC v důsledku kombinace vlastností zadržování vody a nízkého povrchového náboje, který nepodporuje silné interakce při výměně iontů [10]. Zwiteriontová stacionární fáze se používá při stanovení aminokyselin, karboxylových kyselin, aminů, peptidů, nukleotidů, antibiotik, vitaminů, flavonoidů, cukrů, produktů štěpení proteinů, anorganických iontů a rostlinných extraktů [15].

Guo a Gaiki vypracovali studii, kdy byla porovnána sulfoalkylbetainová zwiteriontová fáze s čistým silikagelem, silikagelem s navázaným aminopropylem a silikagelem s navázaným amidem. Bylo zjištěno, že retence na sulfoalkylbetainové zwiteriontové fázi byla nejméně ovlivněna změnou pH [10].

Kolony Obelisc

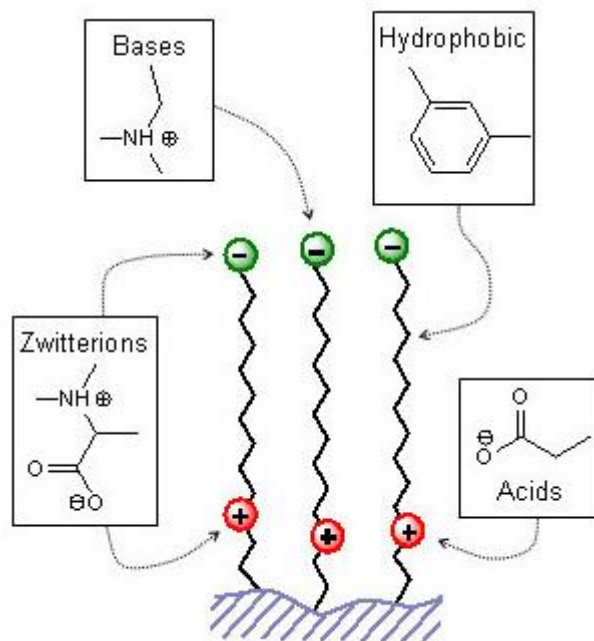
Kolony Obelisc využívají technologii Liquid Separation Cell. Tato technologie je založena na nové chemické modifikaci silikagelových pórů, které vytváří kapalně separační buňky s jejich vlastní charakteristikou náboje, iontovou silou a hydrofobními vlastnostmi.

Kolony této skupiny jsou schopny zadržovat a rozdělovat různé typy malých molekul a jejich směsí. Mezi zástupce patří kolony Obelisc N a Obelisc R, které se liší typem a blízkostí jejich nabitých skupin a hydrofobicitou jejich dlouhých řetězců. Na povrchu stacionární fáze obsahují pozitivně a negativně nabitě ionty (Obr. 5) [16].

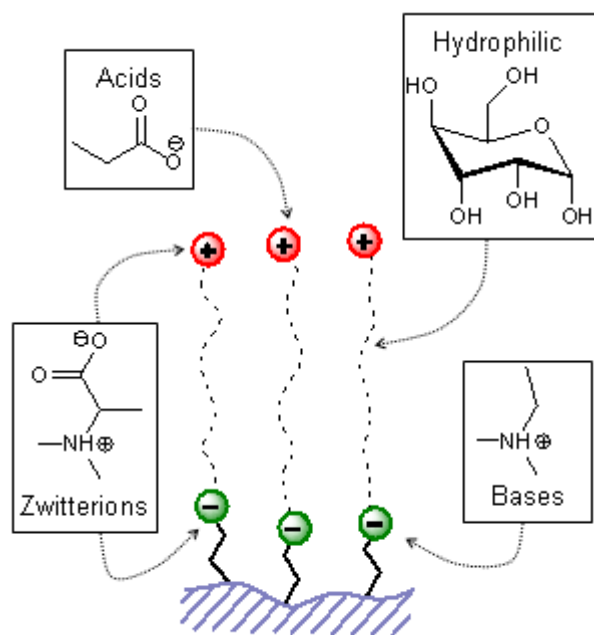


Obr. 5: Stacionární fáze (Obelisc R, Obelisc N) s nabitými skupinami na povrchu [16]

Obsah dvou opačně nabitých skupin umožňuje zadržování polárních látek bez nutnosti použití iontové párových činidel. Obelisc R (Obr. 6), s charakterem reverzní fáze, obsahuje na silikagelovém povrchu pozitivně nabitě skupiny, které jsou od negativně nabitých skupin odděleny hydrofobním řetězcem. Obelisc N (Obr. 7), s charakterem normální fáze, má blíže povrchu stacionární fáze anionty, které jsou od kationtů odděleny hydrofilními řetězci. Typické mobilní fáze jsou tvořeny směsí ACN a vody. S MS detekcí jsou kompatibilní pufrы mravenčan amonný (pH 3) a octan amonný (pH 5). Při UV detekci s vlnovou délkou nižší než 220 nm je doporučován fosfátový pufr [16].



Obr. 6: Interakce probíhající na koloně Obelisc R [16]



Obr. 7: Interakce probíhající na koloně Obelisc N [16]

2.1.3.2 Využití metody HILIC

HILIC vyniká při stanovení malých a velmi polárních analytů. Hraje důležitou roli v moderním farmaceutickém vývoji při analýze velmi nízkých koncentrací léčivých látek. Jednou z možností využití této metody je stanovení antibiotik a cytostatik. Hledání bioaktivních molekul je jedním z odvětví objevování nových léčiv. HILIC je zde uplatňována díky schopnosti zadržovat vysoce hydrofilní a nenabitě sloučeniny [10].

Sulfoalkylbetainová zwitteriontová kolona byla použita v kombinaci s předkolonou C₁₈ pro on-line odsolení a vytvoření ověřené metody pro morfin a jeho 3- a 6-glukuronidy v plasmě.

Vysoce hydrofilní jsou také toxiny hojně se vyskytující v přírodě. Docela dobře lze metodou HILIC stanovit mořské toxiny, které jsou spojené s paralytickou otravou způsobenou měkkýši.

Při analýzách sacharidů se HILIC používá k separaci nízkomolekulárních sacharidů v jídle a nápojích, cukrů v tradičních čínských léčivech a mořských vzorcích, glykoalkaloidů a jejich hydrolytických produktů v rostlinách čeledi *Solanaceae*, glykosaminoglykanů, glykoproteinů a pro stanovení glykosylace proteinů.

Mezi další látky stanovované pomocí HILIC patří glukosinoláty, saponiny, fosforylované uhlovodíky, glykany, glykopeptidy, aminokyseliny a peptidy.

U bílkovin byl HILIC použit pouze u histonů. Důvodem je dobrá separace prostřednictvím obvyklých separačních technik za použití mobilních fází bez významné příměsi organických rozpouštědel, ale také jejich rozpustnost.

HILIC se uplatňuje také při metabolomických stanoveních, protože metabolity jsou často velmi polární sloučeniny [10].

2.2 Stanovení kyseliny askorbové a kyseliny dehydroaskorbové

2.2.1 Kyselina askorbová

AA je bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Může se též jednat o bezbarvé krystaly. Působením vzduchu a vlhkosti mění barvu. Je snadno rozpustná ve vodě a dobře rozpustná v 96% lihu. Teplota tání je asi 190°C, kdy

dochází k jejímu rozkladu [6]. Jako jediná má ve většině rostlinných a živočišných tkání redukční účinky i v kyselém prostředí [17]. AA známá také pod názvem vitamin C, je látka, kterou si mnoho organismů dokáže syntetizovat samo [18]. Primáti, lidé a morčata tuto schopnost nemají díky mutaci v genetickém kódu L-gulonolaktonoxidázy, což je enzym nezbytný pro syntézu vitamínu C. Tento vitamin pak přijímají prostřednictvím zeleniny a ovoce [19]. Vitamin C patří do skupiny vitaminů rozpustných ve vodě a je důležitý zejména pro své antioxidační vlastnosti [18].

AA se nejčastěji vyskytuje v ovoci a zelenině. Hlavními zdroji jsou citrusové plody, černý rybíz, paprika, jahody, rajčata, brokolice, brambory a zelí. Obsažené množství závisí na odrůdě, klimatu, způsobu sklizně, skladování a zpracování těchto produktů. U živočichů je AA obsažena v játrech a ledvinách, ale ve srovnání s rostlinnými zdroji v menším množství [20].

Vitamin C se podílí na syntéze a regeneraci svalů, cévních tkání, kostí, chrupavek, zubů a dásní a usnadňuje hojení ran po operacích [20]. Je nezbytný pro tvorbu kolagenu a mezibuněčného materiálu [21]. Z biochemického hlediska se účastní metabolismu železa a žlučových kyselin, syntézy hormonů a neurotransmiterů, metabolismu kyseliny listové a některých aminokyselin. Má důležitou roli pro správnou funkci imunitního systému a pro dostatečnou odolnost organismu proti infekcím. Díky antioxidačním vlastnostem působí preventivně proti onemocněním kardiovaskulárního systému (chrání lipidy buněčných membrán před oxidací, regeneruje vitamin E, kolagen dodává cévám pevnost a pružnost). Současně s účinkem žlučových kyselin se podílí na degradaci krevního cholesterolu. Další významnou funkcí je prevence tvorby nitrosaminů v žaludku, které způsobují rakovinu [20]. Dalšími výhodnými funkcemi jsou fotoprotekce, redukce melaninu a vyplavování volných radikálů. Využívá se také při konzervaci, v kosmetickém, dermatologickém a farmaceutickém průmyslu [18]. Má význam při profylaxi a terapii hypovitaminózy a avitaminózy a jako doplňkové léčivo při intoxikaci nitrosaminy, anilidy a anilínovými barvivy [17].

Doporučená denní dávka závisí na věku, pohlaví a životním stylu člověka. Pohybuje se v rozmezí 60 až 75 mg [20]. AA se snadno absorbuje z gastrointestinálního traktu a je rozsáhle distribuována do tkání [22]. V nadbytku se vylučuje močí. Zvýšenou potřebu mají těhotné a kojící ženy, diabetici, osoby

v rekonvalescenci, kuřáci, alkoholici, starší lidé, lidé žijící ve znečištěném ovzduší, drogově závislí, lidé v ústavní péči a lidé vystavení nadměrnému stresu [20]. V případě konzumace více než 2 g za den může dojít k žaludečním potížím, oxalátové nefrolitiáze, zvýšení plazmatické hladiny cholesterolu a deficitu vitamínu B₁₂. Dlouhodobé vystavení vysokým dávkám představuje riziko vzniku urolitiázy, po intravenózní aplikaci může dojít k bolestivosti v místě aplikace [17].

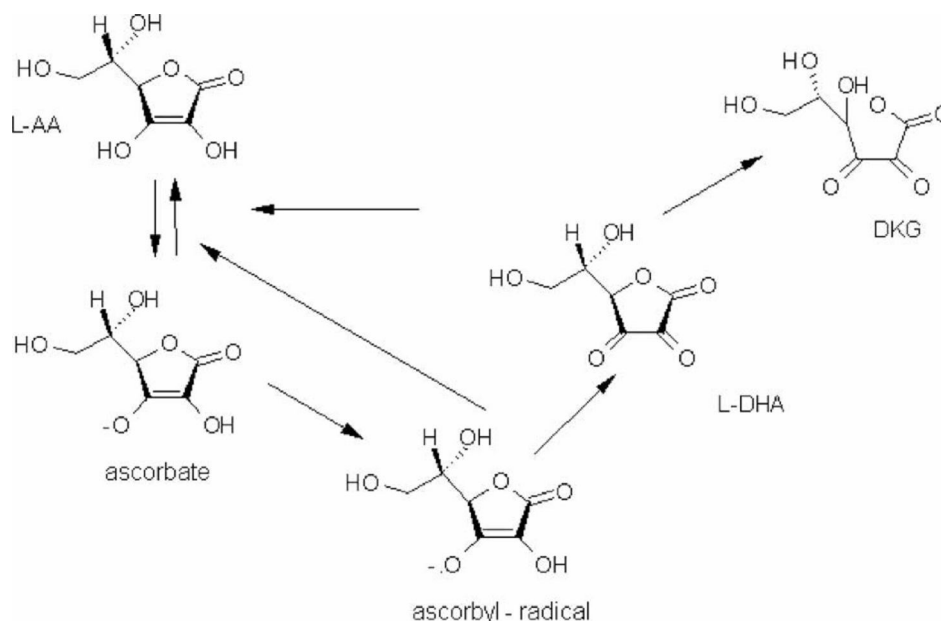
Nedostatek vitamínu C se projevuje malátností, zvýšenou únavou, ztrátou chuti k jídlu a sníženou odolností vůči infekcím. V případě hypovitaminózy po delší dobu může dojít ke krvácivosti dásní, ztrátě zubů, oslabení a narušení kolagenních struktur a rozsáhlé kapilární krvácivosti (kurděje) [20]. U dětí dochází k rozvoji Moellerovy-Barlowovy nemoci [19]. Dlouhodobá neléčná hypovitaminóza může skončit i smrtí.

AA je poměrně nestabilní látka. V přírodních zdrojích klesá její obsah v závislosti na době a podmínkách skladování, při kuchyňské úpravě se snižuje až o 70 % [20].

2.2.2 Kyselina dehydroaskorbová

DHA je velmi důležitá, ale poněkud tajemná sloučenina, vyskytující se v biologických systémech. Má řadu unikátních vlastností, kterými se odlišuje od AA [23].

Kyselina L-askorbová (γ -lakton 2-oxo-L-(-)-gulonové kyseliny) je součástí reverzibilního oxidačně-redukčního systému (Obr. 8), který dále tvoří její monoanion askorbát, kyselina semidehydro-L-askorbová (meziprodukt ve formě volného radikálu) a kyselina L-dehydroaskorbová (γ -lakton 2,3-dioxo-L-(+)-gulonové kyseliny). Dochází k přenosu dvou elektronů. Tento přenos je reverzibilní, dokud nedojde k porušení kruhové struktury DHA. Po hydrolytickém rozštěpení vzniká kyselina 2,3-dioxo-L-gulonová a aktivita AA zaniká [19].



Obr. 8: AA a její rozkladné produkty

(L-DHA – L-dehydroaskorbová kyselina, DKG – diketogulonová kyselina) [11]

Jak se zdá, tvorba DHA z AA je v současnosti nejdůležitější reakcí, které AA podléhá a poskytuje jí mnoho z jejích chemických vlastností a fyziologické aktivity. Oxidace AA na DHA poskytuje dva atomy vodíku, které mohou být použity na redukci biologicky významných sloučenin. DHA byla v posledních desetiletích považována spíše pouze za produkt oxidace než za látku s vlastními důležitými chemickými a biologickými vlastnostmi.

Přestože obě látky mají při perorálním podání antiskorbutický efekt, DHA má několik vlastností, kterými se od AA odlišuje. Je více reaktivní a v roztoku méně stabilní. DHA může být redukována na AA, hydrolyzována a oxidována, tzn. je to jak redukční, tak oxidační činidlo [23].

K oxidaci AA na DHA může dojít během zpracování, distribuce a skladování mražené zeleniny. Zachování AA ve zmrazených produktech závisí na teplotní historii. AA by tedy mohla být spolehlivým a reprezentativním ukazatelem pro odhad kvality výrobků [18]. DHA může vzniknout z AA prostřednictvím různých oxidačních reakcí využívajících halogeny, peroxid vodíku, chlorid železitý a další. Může být použita bromová voda nebo askorbát oxidáza [23].

Protože k oxidaci AA dochází velmi ochotně, může toho být využito při stanovení AA za využití elektrochemické detekce (ED) na základě signálu získaného při změně proudu nebo napětí. Reakce, při které dochází k přeměně AA na DHA probíhá ve dvou krocích, kdy vznikají volné radikály, takže v systému může dojít k redukci i k oxidaci. Zdá se, že DHA má kromě antioxidačních vlastností AA i své vlastní. Je například lepší při ochraně low-density lipoproteinu před oxidací ionty mědi.

DHA je detekovatelná v rostlinných tkáních, je však sporné, zda má fyziologickou roli. Podle některých autorů se nehromadí v rostlinných buňkách, a proto je často měřena jako produkt vzniklý během zpracování vzorku.

Přenos DHA přes membrány je uskutečňován pomocí specifických přenašečů a je odlišný od transportního systému AA. Například vychytávání DHA je inhibováno některými monosacharidy, ale není inhibováno působením AA. Studie s použitím rostlinných a živočišných tkání ukázaly, že transport DHA je efektivnější než transport AA [23].

V živočišných tkáních se využívají pro přenos DHA přenašeče hexózy z GLUT-family (Mammalian Facilitative Glucose Transporter). Mikrozomy a buněčné membrány používají podobné typy přenašečů pro vychytávání DHA. Výsledek klonování oocytů žaby *Xenopus* (drápatka) jasně prokázal zapojení přenašečů GLUT1 a GLUT3. Tyto studie jsou zajímavé tím, že naznačují velmi efektivní recyklaci AA následující po oxidaci na povrchu buněk [23].

Zdá se, že DHA, která je jednou přenesena do buňky, je rychle zpětně redukována na AA. Tato redukce je důležitá pro udržení přiměřené hladiny AA v buňkách. V tomto ohledu jsou nejdůležitější glutation-dependentní enzymy. Redukce DHA v cytosolu jater potkana probíhá působením 3- α -hydroxysteroid dehydrogenázy.

Při fyziologickém pH je DHA rychle hydrolyzována na diketogulonát. I když se předpokládá, že je tato reakce ireverzibilní, existuje studie, podle které je tato reakce částečně vratná. Například použití vodného roztoku jodovodíku vedlo k redukci diketogulonátu.

Při vystavení podmínkám oxidačního stresu je diketogulonát rychle degradován na 5- a 4-uhlíkaté sloučeniny [23].

2.2.3 Simultánní stanovení AA a DHA

Základním problémem společné analýzy AA a DHA je jejich nestabilita ve vodných roztocích. Hlavními faktory ovlivňujícími stabilitu jsou světlo, teplota, pH, koncentrace a přítomnost kyslíku nebo kovových iontů. Proto je během analýzy nezbytné vliv těchto faktorů minimalizovat [11].

2.2.3.1 Stabilita AA a DHA

Vliv světla

AA i DHA jsou náchylné k degradaci působením světla. Byl srovnáván vliv denního světla a UV světla (265 nm). Za pokojové teploty byly porovnávány změny v roztoku AA skladované v hnědých a průhledných baňkách bez zátek. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že AA je nejstabilnější při uchovávání v hnědé odměrné baňce, která ji chrání před působením světelného záření. V některých postupech je také doporučena ochrana pomocí hliníkové fólie [11].

Vliv teploty

Teplota má značný vliv na stabilitu AA i DHA. Byly provedeny analýzy při teplotě 4 °C, 10 °C a 25 °C. Snížená teplota v autosampleru umožnila chlazení vzorku během analýzy až na 4 °C, což vedlo ke zvýšení stability. Studie stability AA při vyšších teplotách potvrdily značný stupeň rozkladu. Při 60 °C a 80 °C klesl obsah AA během jedné hodiny na méně než 20% původní koncentrace, při 40 °C na 75 % [11].

Vliv hodnoty pH

AA je více stabilní v roztocích, kde se hodnota pH pohybuje v kyselé oblasti. V kyselém prostředí není podporován vznik askorbátu, což je hlavní produkt rozkladu AA.

Ve většině případů je vzorek připravován extrakcí v kyselém prostředí. Některé studie se zabývaly porovnáním extrakčních činidel o různé hodnotě pH a jejich vlivem na stabilitu AA. Obecně platí, že dostatečnou stabilitu vzorku zajišťuje kyselé pH kolem 2,1. Nejběžnějším rozpouštědlem byla metafosforečná kyselina, někdy v kombinaci s etylendiamin-tetraoctovou kyselinou (EDTA) nebo určitými organickými přísadami (např. metanol nebo metanol a ACN) [11].

Na jedné straně může být metafosforečná kyselina použita pro velmi účinnou extrakci AA díky prevenci oxidace. Na straně druhé, může způsobit závažné analytické interakce se silikagelovými kolonami (C₁₈ nebo fáze s amino-vazbami). Tyto interakce mohou mít za následek posuny v základní linii a retenčním čase [24]. V některých případech byla extrakce prováděna při neutrálním pH pomocí různých pufrů.

Při použití metody HILIC bylo důležité udržet vysokou koncentraci organického modifikátoru a extrakce byla prováděna pomocí pufru octanu amonného s cílem zajistit podobnost s použitou mobilní fází. Změny v koncentraci organických modifikátorů by mohly významně ovlivnit rovnováhu v HILIC a mohly by vést k posunu retenčních časů a vzniku nepravidelných tvarů píků [11].

Vliv koncentrace

Koncentrace roztoků AA a DHA také určitým způsobem ovlivňuje stabilitu. Při analýzách roztoků o různých koncentracích se prokázalo, že čím vyšší byla koncentrace roztoku, tím lepší byla stabilita. K významnému poklesu stability dochází při koncentracích nižších než 0,1 mg/l [11].

Vliv stabilizačních přísad

Pro zvýšení stability jsou často užívána stabilizační činidla. Např. kyselina metafosforečná plní roli rozpouštědla i stabilizátoru. Efektivní je i její kombinace s EDTA. Pro prodloužení stability roztoků se také používají kyselina trichloroctová, kyselina o-fosforečná, homocystein, kyselina šťavelová,

trifluoroctová kyselina, ditiotreitol, nebo kombinace trichloroctové kyseliny s EDTA a další [11].

Vliv přítomnosti kovových iontů

Stabilita AA i DHA může být působením kovových iontů snížena. V tomto případě nachází uplatnění EDTA jako chelatující sloučenina, která může stabilitu zvýšit. Byl studován vliv Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} . Množství přidaných prvků odpovídalo množství přidanému do multivitaminových přípravků. Bylo zjištěno, že obsah AA významně ovlivnily pouze ionty měďnaté [11].

Při chromatografické analýze AA a DHA je důležitá vysoká citlivost a selektivita metody, výběr vnitřního standardu pro účely kvantifikace, retence obou látek v systému HPLC, výběr vhodné detekce a stabilita obou látek v roztocích [11].

2.2.3.2 Metody stanovení

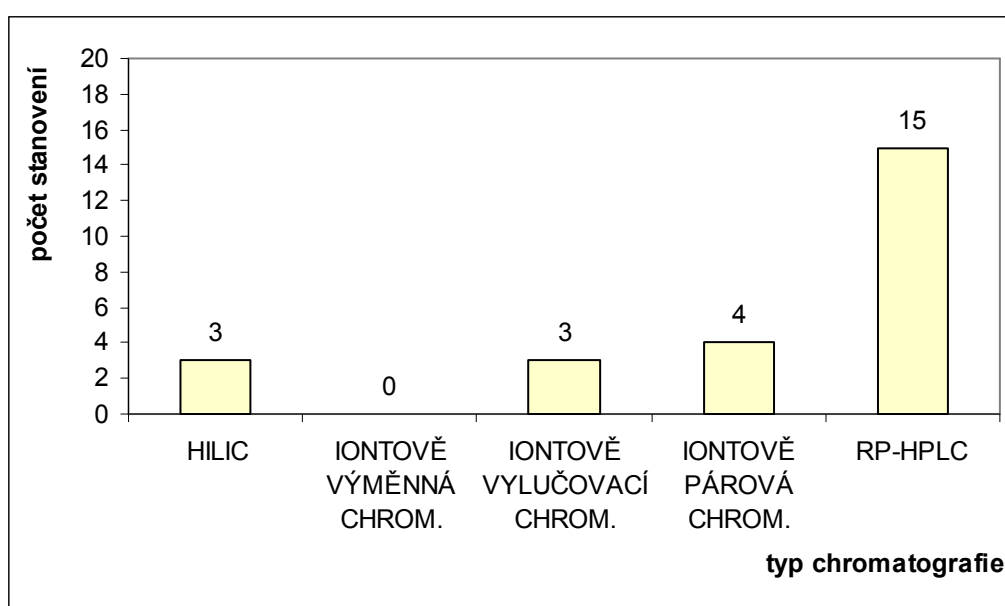
V minulosti bylo vyvinuto mnoho metod založených na vratné redoxní reakci AA/DHA. Naneštěstí jim často chyběla specifita, a proto byly náchylné k ovlivnění dalšími redukčními činidly. Například u spektrofotometrických metod může dojít k interferenci s analyty, cukry či glukuronovou kyselinou. U enzymatických metod dochází k interferencím s citronanem a peroxidem vodíku.

Preferovanou metodou analýzy AA a DHA je HPLC, protože poskytuje vyšší selektivitu než metody spektrofotometrické, titrační či enzymatické.

Nejčastěji se používá ultrafialová (UV) detekce nebo ED. Méně často pak detekce fluorescenční (FD), kdy je nutná derivatizace DHA a další oxidace AA na DHA. Dalším, ne příliš využívaným, typem detekce je detekce pomocí MS. Tyto metody poskytují nejvyšší citlivost a selektivitu. MS detekce je pro mnoho laboratoří nedostupná z důvodu vysoké ceny a vysokých provozních nákladů.

Hlavními postupy stanovení AA a DHA jsou metoda HPLC na reverzní fázi, iontově výměnná, iontově párová a iontově vylučovací chromatografie. Použité mobilní fáze jsou často velmi složité, obsahují více než dvě složky s různými modifikátory nebo činidly. Proto je velmi populární mnohem jednodušší a elegantní metoda HILIC [11].

O problematice jednotlivých přístupů je pojednáváno v následujících kapitolách. Přehled chromatografických stanovení AA a DHA provedených v letech 2005 – 2009 je graficky znázorněn na Obr. 9 a podrobněji rozepsán v Tab. 1.



Obr. 9: Přehled chromatografických stanovení AA a DHA v letech 2005 – 2009 [11]

látky	zdroj	stacionární fáze analytická kolona		mobilní fáze	detekce	AA t _R	validační data	rok
		1	2					
L-AA, iso-AA, L-DHA redukce TCEP	krev	lontové párová ChromoLith Performance C18 (100 x 4,6 mm)		2,5mM NaH ₂ PO ₄ 2,5mM DTMACI 1,25mM Na ₂ EDTA 2% ACN	UV 264 nm	0,8	r ² = 0,999 RSD = 4,2 - 4,5% RSD = 4,3 - 4,6% LOD = 1,5 μmol/l LOQ = 4,95 μmol/l	2005
AA	lidské lymfocyty	CSC-Kromasil C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm)		0,2 M KH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ pH 3,0 2mM EDTA	UV 245 nm	-	r ² = 0,989 RSD _{inter} = 0,25 - 9,98% RSD _{intra} = 1,2 - 12,49%	2005
AA	polyvitaminové premixy	YMC-Pack Pro C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm)		A: 0,025% TFA pH 2,6 B: ACN gradientová eluce	UV 210nm 275 nm	6,4	r ² = 0,9956 RSD _{intra} = 2,1% RSD _{inter} = 5,0 a 5,9%	2005
AA GSH, GSSG, UA	močový měchýř	Hypersil C ₁₈ (250 x 4,0 mm, 5 μm)		50mM K ₃ PO ₄ pH 3,0 upraveno o-fosforečnou kyselinou	ED Coularray 300 mV	4	r ² > 0,996 RSD _{intra} < 4,4% RSD _{inter} < 9,4% rec = 98,9 - 112,6% LOQ = 500 nmol/l	2005
AA karotenoidy	rajče, kiwi, mango	Symmetry C ₁₈ (75 x 4,6 mm, 3,5 μm) Atlantis C ₁₈ (150 x 2,0 mm, 5 μm)		70% metanol 30% CH ₃ COOH 0,05%	MS-SIM ESI ⁻ (M-H) ⁻ = 175	3,99	rec = 85% LOD = 10 μl/l LOQ = 50 μl/l	2005
AA, DHA redukce DDT	lidské mléko	Spherisorb ODS2 C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm)		0,1% CH ₃ COOH:metanol (95:5)	UV 254	3,7	rec = 95,55 ± 1,18% RSD _{intra} = 3,09% RSD _{inter} = 4,03%	2006
AA (taurin a ostatní ve vodě rozpustné vitaminy) IS = hippurová kyselina	multivitaminové tablety	Johnson Spherigel C ₁₈ (250 x 4,6 mm, 5 μm)		A: 5mM heptafluoromáselná kyselina B: metanol gradientová eluce	ESI-MS ESI ⁻ (M-H) ⁻ = 175,4	3,6	rec = 98,3% RSD _{intra} = 0,5% RSD _{inter} = 1,1% LOD = 12 μl/l LOQ = 20 μl/l	2006

Tab. 1: Chromatografické metody použité pro stanovení AA a DHA – 1. část [11]

látko	zdroj	stacionární fáze analytická kolona		mobilní fáze	detekce	AA t _R	validační data	rok
		1	2					
AA	vína	lontově vylučovací PLRP-S 100A (150 x 4,6 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 = 1 mg/l LOQ = 5 mg/l	2006
AA AA-2G a další deriváty AA	enzymové hydrolyzáty	Interstil CN-3 (250 x 4,6 mm, 5 µm)		metanol 28,6mM H ₃ PO ₄ -NaH ₂ 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 (250 x 4,6 mm, 5 µm)		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 (250 x 4,6 mm, 5 µm)		ACN octan sodný pH 5,4 decylamin, TCEP	UV 265 nm	12,8	r ² = 0,9999 rec = 93 - 105% LOD = 0,1 µg/100g	2006
AA cukry, organické kyseliny	ostružiny	Ultrasphere ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm)		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 (150 x 4,6 mm, 4 µm)		5mM CTMAB 0,04% Na ₃ PO ₄ pH 3,5 ACN (90:10)	UV 245 nm 360 nm	4	R.S.D. ≤ 1,40% rec = 99,7 - 101,8% LOQ = 50 pmol	2007
AA, DHA redukce DTT nebo BAL	jahody, rajčata, jablka	1. C ₁₈ Spherisorb ODS2 (250 x 4,6 mm, 5 µm) 2. NH ₂ -Spherisorb S5 (250 x 4,6 mm, 5 µm)		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 < 0,61 mg/100 g LOD < 0,18 mg/100 g	2007
AA, iso-AA AA-2G, AA-2βG	potraviny, nápoje	HILIC Interstil Diol (250 x 4,6 mm, 5 µm)		ACN:66,7mM octan amonný (85:15)	UV 260 nm	8	r ² = 0,9996 RSD _{intra} = 0,5 - 2,8% RSD _{inter} = 0,5 - 2,1% výťažnost _{inter} = 98,7 - 105,8% výťažnost _{intra} = 99,1 - 104,1% LOD = 0,3 µg/ml	2007

Tab. 1: Chromatografické metody použité pro stanovení AA a DHA – 2. část [11]

látky	zdroj	stacionární fáze		mobilní fáze	detekce	AA t _R	validační data	rok
		analytická kolona						
L-AA, L-DHA derivatizace OPDA	potraviny	NovaPak C ₁₈ (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. šťavelová, kys. citronová, kys. maleová, Kys. cis-akonitová, kys. chinová, kys. fumarová	Castanea sařiva	Iontově vylučovací Nucleogel Ion 300 OA (300 x 7,7 mm, 5 µm)	0,01M H ₂ SO ₄	UV 214 nm	30	neposkytnuto	2007	
AA	polotuhá kosmetika	LiChrospher 100-RP 18	0,2% m-fosforečná (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)	40mM octan sodný 1,3mM Na ₂ EDTA 1,5mM DTEAP 7,5% metanol pH 4, 65 upravené CH ₃ COOH	ED 280 mV	3,2	výsledky uvedeny pro stabilitu	2007	
AA, DHA – redukce DTT vitamin E mastné kyseliny	lidské mléko	Spherisorb ODS2 C ₁₈ (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 C ₁₈ (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 (150 x 2,1 mm, 3,5 µm)	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 použité pro stanovení AA a DHA – 3. část [11]

látky	zdroj	stacionární fáze analytická kolona		mobilní fáze	detekce	AA tR	validační data	rok	citace
AA, DHA	tablety	Luna HILIC (100 x 3.0 mm, 3 µm) Obelisc N (100 x 3.2 mm, 5 µm) Obelisc R (100 x 3.2 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	[25]
AA, DHA, UA IS = homogentisinová kyselina	lidská plazma	YMC ODS-AQ 3.0mm×150mm, 3 µm Hypersil Gold C ₁₈ 2.1mm×20mm, 1.9 µm 2.1mm×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	[26]
AA, lykopen	šťáva z vodního melounu	Spherisorb ODS2 4.6 mm x 250 cm, 5 µm		0,01% H ₂ SO ₄ pH 2,6	486 Absorbance Detector 245 nm	-	výsledky uvedeny pro stabilitu	2009	[27]

Tab. 1: Chromatografické metody použité pro stanovení AA a DHA – 4. část [25,26,27]

Seznam zkratek v Tab. č. 1:

AA	– kyselina askorbová
AA-2G	– 2-O- α -D-glukopyranosyl-L-askorbová kyselina
AA-2 β G	– 2-O- β -D-glukopyranosyl-L-askorbová kyselina
ACN	– acetonitril
BAL	– 2,3-dimerkapto-1-propanol
CAD	– Charged Aerosol Detector
DAD	– detektor s diodovým polem
DHA	– dehydroaskorbová kyselina
DTT	– dithiotreitol
ED	– elektrochemická detekce
EDTA	– etylendiamin-tetraoctová kyselina
ESI	– ionizace elektrosprejem
FD	– fluorescenční detekce
IS	– vnitřní standard
GSH	– glutation
GSSG	– oxidovaný glutation
HILIC	– Hydrophilic Interaction Chromatography
LOQ	– limit kvantifikace
LOD	– limit detekce
MS	– hmotnostní spektrometrie
MS-SIM	– mass spectrometry-selected ion monitoring
OPDA	– o-fenyldiamin
rec	– výtěžnost
RSD	– relativní směrodatná odchylka (přesnost metody)
TCEP	– [2-karboxyetyl]fosfan
TFA	– trifluoroctová kyselina
UA	– močová kyselina
UV	– ultrafialová

Iontově párová činidla:

CTMAB	– cetyltrimetylamonium bromid
DTEAP	– dodecyltrietylamonium fosfát
DTMACl	– dodecyltrimetylamonium chlorid

Reverzní fáze

Reverzní stacionární fáze jsou při analýze AA a DHA užívány velmi často. Jsou však zatíženy špatným oddělením AA od mrtvého retenčního času. Pro získání dostatečné retence je obvykle použito velmi vysoké procento vodné složky, obvykle ve formě anorganické/organické kyseliny nebo anorganického pufru (někdy i 100 %) v kombinaci s nízkými hodnotami pH.

Pro stanovení na reverzní stacionární fázi s potlačením vzniku iontů je nezbytné použití mobilní fáze s hodnotou pH 2 jednotky pod hodnotou pKa AA (4,17), aby látka byla neutrální, neionizovaná a tudíž dobře zadržovaná. Kyselina chloristá byla často používána pro potlačení vzniku iontů při stanovení organických kyselin pomocí RP-HPLC díky své silné kyselosti a silné potlačovací aktivitě již při nízkých koncentracích v řádu mM. Při analýze AA a DHA tímto způsobem byly jako mobilní fáze použity kyselina trifluoroctová, sírová a fosforečná při pH = 2.

Jednou ze dvou hlavních nevýhod tohoto postupu je 100% koncentrace vodné frakce v mobilní fázi. Je známo, že vodná mobilní fáze neobsahující organické modifikátory, může negativně ovlivnit separační účinnost stacionární fáze C₁₈, nebo v případě dlouhodobého používání může nastat tzv. hydrofobní kolaps stacionární fáze.

Druhou nevýhodou je nízké pH, které urychluje odbourávání silikagelových kolon díky rozpadu základního silikagelového materiálu. Tento problém může být vyřešen pomocí presaturační kolony, nebo změnou silikagelového nosiče na hybridní, oxid zirkoničitý nebo polymer, který má vyšší chemickou stabilitu [11].

Iontově párová chromatografie

Iontově párová činidla byla často využívána ve spojení s anorganickými pufrů. Používání anorganických pufrů má však určité nevýhody. Anorganické soli mohou ucpat prvky tokové linie, vstupní a výstupní ventily, což může způsobit jejich nesprávnou funkci. Změna vodného pufru na mobilní fázi s vysokým obsahem organických rozpouštědel musí být prováděna opatrně a

postupně, aby nedošlo k precipitaci pufru. Důležité je důkladné promytí systému vodou. Navíc anorganické pufrы nejsou kompatibilní s detekcí pomocí MS, protože nejsou těkavé.

Mobilní fáze často tvoří pět i více složek. Tyto metody mohou mít nízkou reprodukovatelnost a selektivitu. Retence závisí na typu a koncentraci iontově párového činidla a typu analytické kolony. Tato činidla nejsou doporučována pro použití při současné aplikaci kapalinové chromatografie a MS. Často zůstávají uvnitř zdroje iontů a poskytují falešně pozitivní signály i dlouho po jejich použití. Některá jsou nepoužitelná kvůli nedostatečné těkavosti. Snižují dobu životnosti kolon, proto optimalizace metody musí být provedena velmi opatrně a pouze za použití nízkých koncentrací. Často způsobují nestabilitu chromatografické separace nebo postupně zvyšují tlak s každým dalším nástřikem vzorku. Existuje také nebezpečí precipitace s ostatními složkami mobilní fáze. Tento postup není zrovna ideální pro použití v moderní analytické laboratoři [11].

Iontově výměnná chromatografie

AA lze dobře zadržet na aniontové výměnné stacionární fázi typu SAX (silný anex). Iontově výměnná chromatografie byla aplikována také v poněkud modifikované podobě, kdy byla použita stacionární fáze s aminoskupinami. Tyto aminoskupiny sloužily jako WAX (slabý anex). Jako mobilní fáze se obvykle používají anorganické pufrы nebo kyseliny s nízkou hodnotou pH. Pro stanovení AA a DHA se však tento postup nestal populárním [11].

Iontově vylučovací chromatografie

Stacionární fáze je často založena na sulfonované sférické PS/DVB (polystyren/divinylbenzen) pryskyřici v různých iontových formách (např. Polypore H nebo Nucleogel Ion 300). Mobilní fází je anorganická kyselina (např. sírová, fosforečná nebo sulfonová) bez přítomnosti organického modifikátoru. Retence je kontrolována z hlediska elektrostatických repulzních sil, hydrofobních interakcí a velikostního rozdělení.

Funkční skupina (SO_3^-) ionexu odpuzuje stejně nabitě ionty elektrostatickou silou a brání jim ve vstupu do PS/PVD (polystyren/polyvinylpyridin) systému. Silně ionizované rozpuštěné látky jsou vyloučeny z pórů systému. Neutrální rozpuštěné látky, které nejsou ovlivněny elektrostatickými silami mohou do tohoto systému vstoupit a oddělovat se díky hydrofobním interakcím. Slabě ionizované látky (např. organické kyseliny, včetně AA a DHA) jsou eluovány někde mezi, díky elektrostatickým silám a částečné penetraci do pórů, kde se vyskytují hydrofobní interakce. Velikostní rozdělení také ovlivňuje retenci, kdy jsou větší molekuly vyloučeny ze systému pórů.

Tento typ chromatografie je mnohem elegantnější ve srovnání s reverzním typem nebo iontovou výměnnou chromatografií. Stabilita stacionární fáze při velmi nízkém pH je zajištěna polymerním základem [11].

HILIC

HILIC je chromatografická metoda vhodná pro separaci velmi polárních a hydrofilních sloučenin. Stacionární fáze je hydrofilní a často má náboj. Vhodná hodnota pH se pro silikagelové kolony pohybuje v rozmezí 3 – 8, pro polymerní kolony je doporučený interval 2 – 10. Sloučeniny rozdělující se na koloně interagují se stacionární fází a to tím více, čím více jsou hydrofilní. Mobilní fáze je tvořena směsí vody nebo těkavého pufru a ACN (> 40%) [14].

Podrobně je mechanismus separace metodou HILIC popsán v kapitole 2.1.3 Hydrophilic Interaction Chromatography. Nutno podotknout, že v posledních letech se metoda HILIC stává stále více populární.

2.2.3.3 Detekce AA/DHA

AA a DHA mají odlišné vlastnosti při použití různých typů detekcí. Např. AA vykazuje silnou odpověď při UV detekci i ED na rozdíl od DHA. FD může být použita pouze v případě, že je DHA podrobena derivatizaci. Pro určení množství obou sloučenin pomocí jedné detekční techniky je zapotřebí přeměna jedné formy na druhou, nebo propojení dvou detekčních technik [11].

UV detekce

Nejpoužívanější detekční technikou používanou v HPLC je UV spektrofotometrie [11]. Její výhodou je vysoká citlivost, široký rozsah linearity, nízké náklady a snadné použití. Je kompatibilní s většinou rozpouštědel používaných jako mobilní fáze v isokratickém i gradientovém elučním režimu [28].

AA vykazuje absorpční maximum v rozmezí vlnových délek 244 – 265 nm. Tato hodnota závisí na složení mobilní fáze, hlavně při použití pufrů o různé hodnotě pH. DHA v roztoku absorbuje UV záření při vlnové délce 185 nm, ale určitou absorpncí vykazuje i nad 220 nm. Pro současné stanovení AA a DHA pomocí UV detekce je nutná derivatizace DHA použitím 4,5-dimetyl-1,2-fenylendiaminu. Chromatogram je zaznamenáván při 360 nm, což je excitační vlnová délka často využívaná při FD.

Většinou se tento typ detekce používá pro stanovení pouze AA z důvodu špatné absorpce DHA v UV oblasti. Některé metody využívají paralelně FD pro umožnění citlivého a selektivního zjišťování množství DHA.

Pro simultánní stanovení AA a DHA pomocí UV detekce je nutné do metody zahrnout redukci DHA. Obsah AA je stanoven v původním vzorku pro určení počáteční koncentrace AA. Následně dochází k redukci DHA, čímž by všechna DHA měla být přeměněna na AA. Po přeměně je vzorek analyzován z hlediska celkového množství AA, tzn. stejný vzorek je injikován dvakrát (původní vzorek pro zjištění počáteční koncentrace AA a přeměněný vzorek pro zjištění celkové koncentrace). Obsah DHA se pak vypočítá jako rozdíl mezi počátečním obsahem a celkovým množstvím AA po přeměně. Metoda je označována jako subtrakční (odečítací) postup [11].

Fluorescenční detekce

AA a DHA samy o sobě nemají fluorescenční vlastnosti. FD umožňuje stanovení AA po oxidaci na DHA a následné derivatizaci, což je poměrně složité a časově náročné. Derivatizace DHA před kolonou, nebo postkolonová, se často používá ke zvýšení citlivosti detekce a eliminaci rušivých vlivů komplikovaných matic. Jako derivatizační činidlo postkolonové derivatizace byl

použit o-fenyldiamin pro tvorbu fluoreskujícího derivátu 3-(1,2-dihydroxyetyl)furo[3,4-b]chinoxalin-1-onu. Vlnová délka detekce byla stanovena na 355 nm pro excitaci a 425 nm pro emisi. Často se používá dvojí detekce, kdy AA je stanovena pomocí UV detekce a DHA pomocí FD [11].

Elektrochemická detekce

AA je poměrně reaktivní a snadno detekovatelná pomocí coulometrických a amperometrických systémů. Oproti tomu je DHA elektrochemicky inaktivní, a proto musí být stanovena pomocí odečítacího postupu (viz. **UV detekce**). ED je charakterizována vyšší citlivostí, specifičností a eliminací interferencí mezi složkami.

Mezi nevýhody ED patří velmi dlouhý čas potřebný pro ekvilibraci kolony (17 – 48 hodin). Musí být dodržovány určité podmínky. Iontová síla a pH pufrů proudících přes elektrochemický detektor musí být konstantní a změny tlaku musí být minimalizovány. Pasivace, která zahrnuje čištění kyselinou, je nezbytná při prvním použití chromatografického systému, a pak se provádí vždy jednou za 6 – 12 měsíců [11].

Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie

Protože se pro stanovení AA a DHA používají iontově párová činidla nebo netěkavé anorganické pufrů, bylo popsáno velmi málo analýz užívajících MS jako detekční techniku. A to i přes své výhody v selektivitě a citlivosti.

Často se stanovují složky multivitaminových směsí pomocí ionizace elektrosprejem (ESI) MS detekce v režimu negativního módu nebo kombinace ESI-MS a detekce s diodovým polem (DAD) pro analýzu AA a fenolických sloučenin nebo směsí vitaminů. Při stanovení DHA se objevily určité problémy. Hmotnostní spektra byla poněkud složitější. DHA tvoří během rozpouštění hydratovaný poloacetal a v závislosti na pH má sklon k hydrolyze.

Tyto metody stanovení jsou velmi složité, často stanovují mnoho analytů, jejich selektivita a citlivost nejsou zaměřeny zrovna na to, jak získat nejlepší výsledky pro stanovení AA. Bylo by tedy vhodné vyvinout metody za použití MS

detekce pro simultánní stanovení AA a DHA se zaměřením na citlivost a selektivitu pro tyto dva analyty [11].

2.2.3.4 Detektory na bázi aerosolu

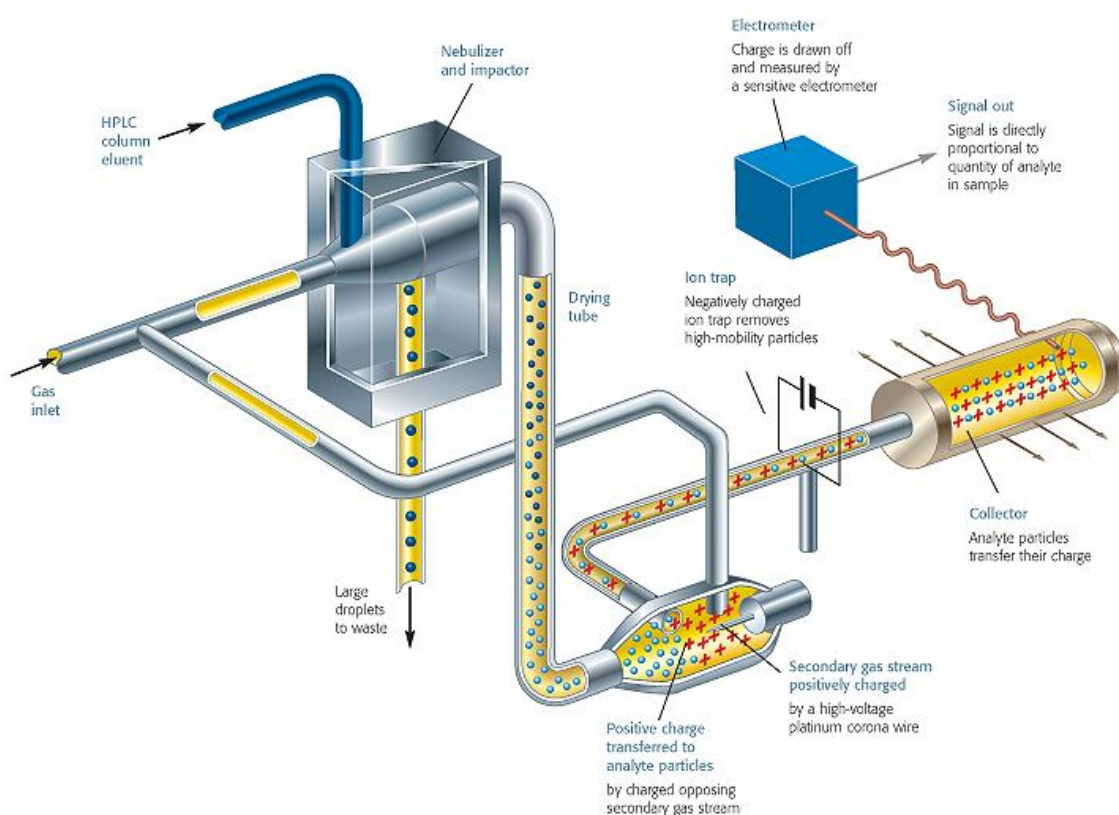
Mezi detektory na bázi aerosolu patří detektor na bázi rozptylu světla (Evaporative Light Scattering Detector – ELSD), Corona Charged Aerosol Detector (CAD) a Nano Quantity Analyte Detector (NQAD). CAD představuje nové možnosti univerzální detekce pro HPLC. Je alternativou ELSD a UV detekce [29]. Mezi výhody tohoto detektoru patří lepší citlivost než má ELSD, dynamický rozsah až 4 řády, snadnost použití a stálost faktorů odezvy [30]. CAD téměř nezávisí na struktuře netěkavých látek, ale je silně závislá na množství organického rozpouštědla v mobilní fázi, jelikož ovlivňuje transportní účinnost nebulizéru a vytvářený signál [31].

Při CAD je eluent HPLC kolony nejdříve nebulizován (zmlžován) dusíkem a vzniklé kapičky jsou sušeny, aby došlo k odstranění mobilní fáze a vytvořily se částice analytu. Sekundární proud dusíku prochází prostředím o vysokém napětí, které je produkováno platinovým koronovým drátem a získává kladný náboj. Ten je předáván částicím analytu. Částice jsou vedeny do kolektoru, kde je náboj měřen elektrometrem s vysokou citlivostí. Signál je přímo úměrný množství analytu [32]. Schéma detektoru je uvedeno na Obr. 10.

Slabostí všech detektorů využívajících procesu nebulizace je závislost odezvy na složení mobilní fáze [29]. Při vyšším obsahu organické složky je dosaženo vyšší odezvy [33]. Isokratické analýzy nejsou tímto jevem ovlivněny, avšak při gradientové analýze bývá získána nejednotná odpověď. Pro prevenci tohoto jevu mohou být upraveny podmínky průtoku [29]. Při použití více těkavých rozpouštědel během gradientové eluce (reverzní fáze) dochází ke zvýšení množství analytu dostupného pro detekci a odezvy pro později vymývané sloučeniny jsou větší. U gradientové eluce HILIC můžeme sledovat efekt opačný. Górecki et al. vyvinuli empirickou metodu pro kompenzaci tohoto kolísání smísením eluentu kolony s druhou mobilní fází toku s opačným složením gradientu. Tato technika se označuje jako kompenzace gradientu a zajišťuje, že složení mobilní fáze vstupující do detektoru je konstantní a

vylučuje jakékoli změny v hromadné odpovědi v důsledku změny složení mobilní fáze [28].

CAD je použitelný pro prakticky všechny netěkavé nebo částečně těkavé látky, jako jsou léčiva, cukry, tuky, steroidy, peptidy, proteiny a polymery. Je vhodný pro detekci látek, které neabsorbují záření v UV oblasti. Používá se ve farmaceutickém průmyslu, potravinářském průmyslu, pro analýzu spotřebitelských produktů a průmyslových chemikálií. Využití tohoto způsobu detekce může zvýšit účinnost stávajících analytických metod a současně otevřít zcela nové možnosti pro bioanalytickou chemii v budoucnosti [32].

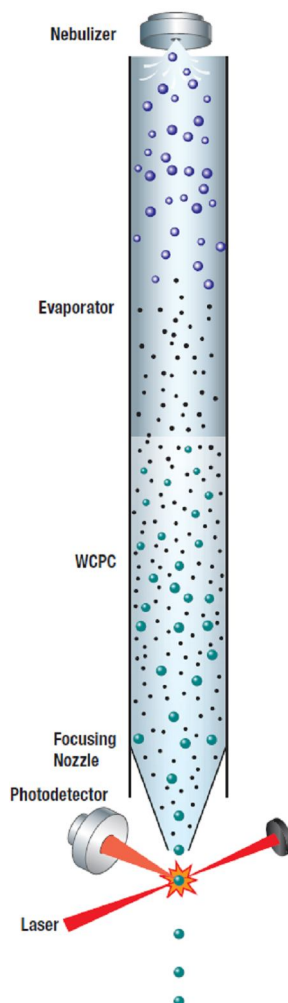


Obr. 10: Schéma detektoru Corona CAD [32]

Dalším typem detektoru na bázi aerosolu je NQAD. Od ostatních detektorů na bázi aerosolu se liší způsobem detekce. Je to vysoce citlivý detektor, který umožňuje stanovení velmi nízkých koncentrací analytů v nástřiku (v řádech nanogramů). Používá se pro stanovení širokého spektra málo těkavých a netěkavých sloučenin. Jeho výhodou je rychlá instalace a jednoduchá obsluha [34]. NQAD ve srovnání s ostatními detektory na bázi

aerosolu poskytuje vyšší citlivost díky přítomnosti Water Condensation Particle Counter (WCPC). Vodní pára kondenzuje na větší kapky, které mohou být snadno detekovány fotodetektozem [35]. Signál z detektoru je přímo úměrný počtu částic. Na rozdíl od ELSD, který je založen na měření rozptylu světla, NQAD počítá množství částic aerosolu [36].

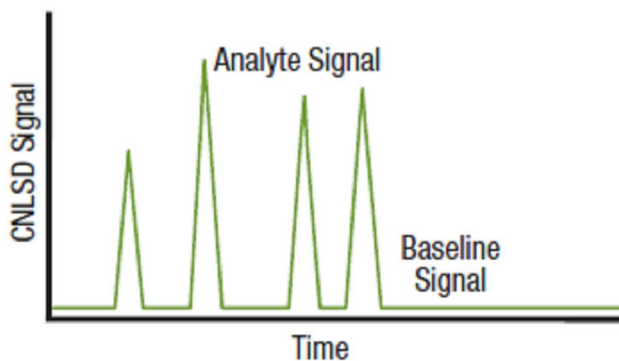
Princip NQAD (Obr. 11) spočívá v nebulizaci, odpařování, kondenzaci a detekci [35].



Obr. 11: Princip funkce NQAD [35]

Během nebulizace dochází ke vzniku ultrajemného aerosolu. Mobilní fáze se odpaří za vzniku malých částic. Výběr teploty zajistí odpaření mobilní fáze za současné minimalizace odpaření analytu. Přesycená vodní pára kondenzuje na částicích za vzniku velkých kapiček. Pouze částice nad kritickou velikostí mohou sloužit jako kondenzační jádra. Kapičky jsou detekovány

(počítány) laserovým paprskem fotodetektoru. Dynamický rozsah detektoru je více než čtyři řády. Signál NQAD (Obr. 12) vyjadřuje počet částic jako funkci času [35].



Obr. 12: Grafický záznam detekce NQAD [35]

Mezi výhody NQAD patří velká citlivost, široký dynamický rozsah, dobrá linearita, reprodukovatelnost, malá velikost, robustnost a spolehlivost. NQAD je vhodný pro detekci látek, které neabsorbují záření v UV oblasti a lze jej tedy použít jako doplněk UV detekce. Nevýhodou NQAD je nutnost používání jen nejčistších chemikálií a kvalitních kolon, vysoká citlivost na netěkavé složky v mobilní fázi a neschopnost detekce těkavých látek [36].

NQAD lze použít pro analýzu sacharidů, kationtů a aniontů, steroidů, lipidů a fosfolipidů, polymerů, malých molekul, peptidů a proteinů [35].

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Acetonitril Chromasolv for HPLC gradient grade (SIGMA-ALDRICH, ČR)

Ultračistá voda Millipore MilliQRG (Millipore Corp., USA)

Kyselina octová > 99% (FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ČR)

Kyselina mravenčí 98 – 100% (Riedel de Haën, Německo)

Hydroxid amonný p. a., 10% vodný roztok (FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ČR)

Kyselina askorbová 99% (FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ČR)

Kyselina dehydroaskorbová (FLUKA, SIGMA-ALDRICH, ČR)

3.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Sartorius 2004 MP (Německo)

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

Kapalinový chromatograf Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

- pumpa LC-20AD
- autosampler SIL-20AC
- termostat CTO-20AC
- komunikační modul CBM-20A
- degasér DGU-20A₅
- detektory – Diode Array Detector SPD-M20A

Corona Charged Aerosol Detector (ESA, USA)

Nano Quantity Analyte Detector (Quant Technologies, LLC, USA)

Program LC solution for Windows v. 1.1

Kolony

- Luna HILIC 3 μm , 100x3,0 mm (Phenomenex, USA)
- ZIC-HILIC 3,5 μm , 150x2,1 mm (SeQuant, Švédsko)
- Atlantis T3 3 μm , 150x3,0 mm (Waters, USA)
- Obelisc R 5 μm , 100x3,2 mm (Sielc, USA)

3.3 Příprava mobilní fáze a analytů

Pro ředění a přípravu všech roztoků byla použita výhradně ultračistá voda filtrovaná přes 0,45 µm membránový filtr. Případně byly roztoky vodných složek následně filtrovány.

3.3.1 Příprava mobilní fáze

Během vývoje metody pro stanovení AA a DHA byl pozorován vliv složení vodné části mobilní fáze na retenci látek. Organická složka byla tvořena ACN, jak vyžaduje HILIC uspořádání.

Kromě ultračisté vody byly použity také 0,1% a 0,5% roztoky kyseliny octové připravené přidáním daného množství kyseliny octové do vody.

Dalšími použitými vodnými složkami byly 10mM, 50mM, 100mM a 250mM roztoky octanu amonného s hodnotou pH 3,8; 4,8; 5,8; 6,8 a 7,8. Byly připraveny přidáním daného množství kyseliny octové do vody a následně titrovány hydroxidem amonným na předepsanou hodnotu pH. Roztoky byly kvantitativně převedeny do odměrné baňky. Konečného objemu bylo dosaženo přidáním ultračisté vody doplněním po rysku.

3.3.2 Příprava analytů a vzorků

Pro optimalizaci podmínek byly analyty připraveny navážením 1 mg standardu a jeho rozpuštěním ve směsi ACN a vodné složky mobilní fáze v poměru 50:50.

Roztok AA byl připraven ve 100 ml odměrné baňce rozpuštěním 1 mg standardu ve směsi ACN a vodné složky mobilní fáze. Roztok DHA byl připraven rozpuštěním 1 mg standardu v 1 ml směsi z důvodu dosažení dostatečné odezvy UV detektoru. Jak je známo, DHA má při UV detekci špatnou odezvu. Roztoky byly vpraveny do vialek a následně v autosampleru kapalinového chromatografu ochlazeny na teplotu 4°C z důvodu zachování stability.

Pro stanovení pomocí detektoru Corona CAD byly roztoky AA i DHA připraveny výše uvedeným způsobem. Pro DHA poskytuje Corona CAD daleko lepší odezvu [25].

Jako reálné vzorky pro validaci metody byly zvoleny Celaskon 100 mg (Zentiva), Celaskon 250 mg (Zentiva), které jsou registrovanými léčivými přípravky, dále Hroznový cukr s vitamínem C pomeranč (Intact) a Vitamin C v prášku (Vitar). Jejich roztoky byly připraveny, ve 100 ml odměrné baňce, rozpuštěním ve směsi ACN a 0,5% roztoku kyseliny octové v poměru 50:50 a doplněním po rysku. Následně byly zředěny na koncentraci 50 µg/ml a měřeny vyvinutou HILIC metodou.

3.4 Optimalizace metody

Základem správné analýzy je optimalizace metody a určení vhodných podmínek. Pro optimalizaci metody byla použita kolona Luna HILIC (obsahuje diolové skupiny). Stanovení probíhalo při teplotě 23°C, průtoková rychlost byla nastavena na 0,8 ml/min a objem nástřiku byl 10 µl. Vlnová délka DAD detektoru byla nastavena pro AA v rozmezí 243 – 268 nm (v závislosti na pH). Pro DHA byla vlnová délka nastavena na 210 nm.

V rámci optimalizace byl sledován vliv pH, koncentrace mobilní fáze a obsahu její vodné složky na retenci AA a DHA. O stanovení metodou HILIC je známo, že čím vyšší je koncentrace organické složky (ACN), tím silněji je analyt na koloně zadržován.

3.5 Využití detektoru Corona CAD pro stanovení AA a DHA

Během stanovení AA a DHA za použití detektoru Corona CAD byly porovnávány kolony Luna HILIC, ZIC-HILIC (obsahuje zwitteriontovou stacionární fázi se sulfobetainovou skupinou) a Atlantis T3 (obsahuje trifunkčně vázaný ligand C₁₈). Analyty byly připraveny rozpuštěním standardů AA a DHA ve směsi ACN a vodné složky mobilní fáze v poměru 50:50.

Na koloně Luna HILIC probíhalo stanovení při teplotě 23°C, průtoku 0,8 ml/min a nástřiku 10 µl. Vodná složka mobilní fáze byla tvořena 50mM octanem amonným a dále 0,1% roztokem kyseliny octové.

Na dalších dvou porovnávaných kolonách byla teplota nastavena na 23°C a objem nástřiku 10 µl. Na koloně ZIC-HILIC byl průtok mobilní fáze 0,3 ml/min a jako vodné složky byly zvoleny 0,1% roztok kyseliny octové, 0,1% roztok kyseliny mravenčí a ultračistá voda. Ostatní vodné složky byly testovány v předchozí práci [37]. Při použití kolony Atlantis T3 byl průtok nastaven na 1 ml/min a vodná složka mobilní fáze byla tvořena 0,5% roztokem kyseliny mravenčí.

Současně byl sledován vliv koncentrace mobilní fáze a obsahu její vodné složky na retenci jednotlivých analytů.

3.6 Využití detektoru NQAD pro stanovení AA a DHA

Pro stanovení AA a DHA byla zvolena metodika vyvinutá na koloně Obelisc R [25]. Analyty byly připraveny rozpuštěním 1 mg standardu v 1 ml směsi ACN a vodné složky mobilní fáze (50:50). Mobilní fáze byla tvořena ACN a 75mM octanem amonným pH 4,2 (15:85). Metoda však musela být dále modifikována kvůli nestabilitě odezvy NQAD. Z tohoto důvodu byl dalším typem vodné složky mobilní fáze 0,5% roztok kyseliny octové. Teplota termostatu byla nastavena na 23°C, průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a objem nástřiku byl 10 µl. Vzorek v autosampleru byl ochlazen na teplotu 4°C.

3.7 Validace metody a analýza reálných vzorků

Validace analytické metody vychází z aktuálně platného Českého lékopisu [6] a International Conference on Harmonisation guidelines [38]. Její nedílnou součástí je test způsobilosti systému. Jeho součástí je určení zdánlivé účinnosti (počet teoretických pater), rozlišení, faktoru symetrie píku, výškového ekvivalentu teoretického patra a opakovatelnosti nástřiků (byly sledovány retenční časy a plochy píků). Bylo provedeno deset nástřiků roztoku standardu AA.

Validace metody a stanovení reálných vzorků probíhalo za použití metody vyvinuté na koloně Obelisc R při teplotě 23°C, průtoku 1 ml/min a nástřiku 10 µl. Kolona Obelisc R nese na povrchu stacionární fáze záporný náboj, uvnitř stacionární fáze je náboj kladný. Mobilní fáze byla tvořena směsí ACN a 0,5% roztoku kyseliny octové (80:20).

Jednotlivé vzorky byly připraveny výše popsáním způsobem (viz. kapitola 3.3.2 Příprava analytů a vzorků).

Kalibrační křivka byla sestavena na základě měření roztoků standardu AA v koncentračním rozmezí 1 – 500 µg/ml. Jednotlivé roztoky byly připraveny zředěním na příslušné koncentrace (1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml). U každého z roztoků byly provedeny tři nástřiky. Aby byla metoda použitelná pro stanovení, je důležité, aby byla kalibrační křivka v daném koncentračním rozmezí lineární.

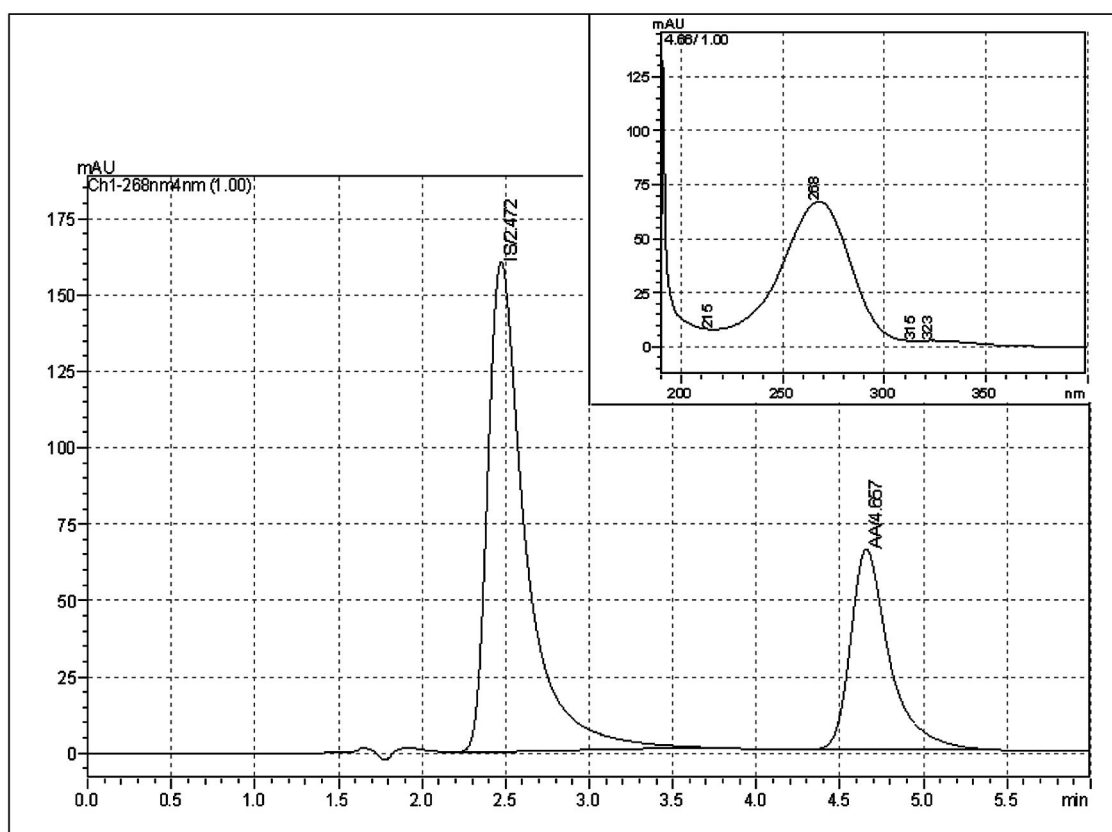
Součástí validace metody je ověřování její správnosti a přesnosti. Pro zjištění přesnosti bylo v případě všech měřených přípravků, výše uvedeným postupem, připraveno šest vzorků, které byly nástřikovány ve třech sériích.

Součástí stanovení správnosti je metoda standardního přídavku označovaná také jako „spikování“. Princip metody spočívá v přidání známého množství standardu do matrice obsahující příslušný analyt. Proveďte se stanovení samotného vzorku, a pak jeho směsi se standardem. Pro tento postup byl zvolen vzorek Celaskonu 100 mg. Stanovovaný roztok byl tvořen 25 µl vzorku a 975 µl směsi ACN a 0,5% roztoku kyseliny octové (50:50). Roztok vzorku s přídavkem standardu obsahoval 25 µl vzorku, 25 µl standardu (koncentrace 1 mg/ml) a 950 µl ředící směsi.

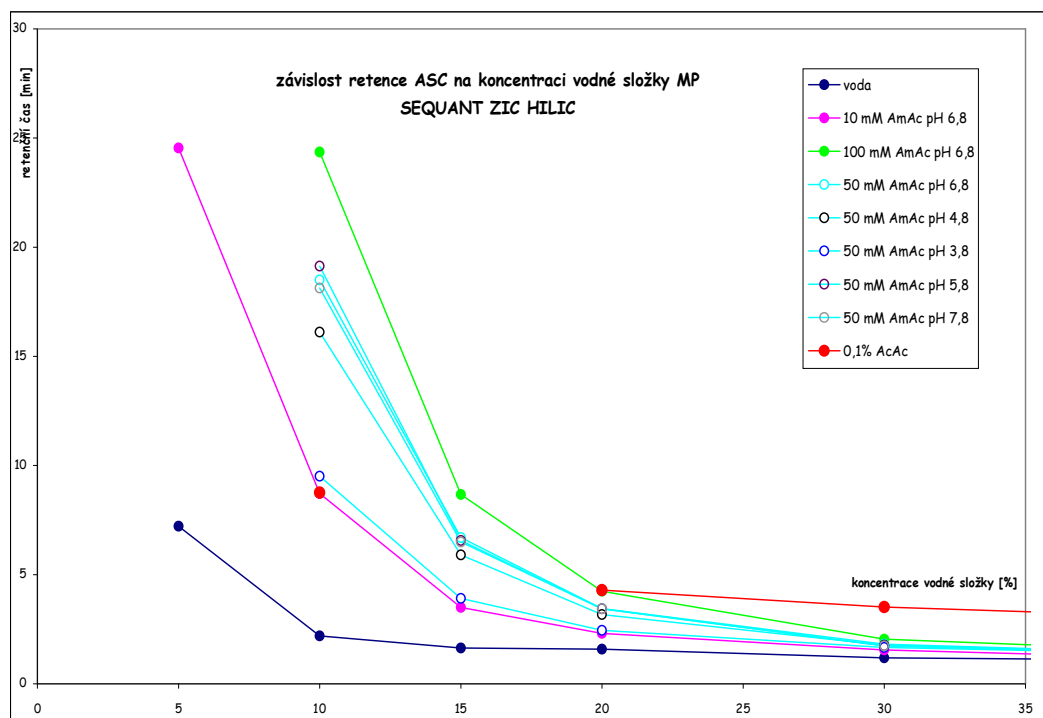
4. Výsledky a diskuse

4.1 Optimalizace podmínek stanovení

V posledních několika letech bylo vyvinuto mnoho metod pro simultánní stanovení AA a DHA, většinou byl však použit postup subtrakce. Základem měření bylo nalezení optimálních podmínek, při využití, pokud možno, jedné detekce, pro stanovení těchto dvou látek v režimu HILIC, jak vychází z práce provedené na koloně ZIC-HILIC [37]. Tento článek se zabývá stanovením AA na koloně ZIC-HILIC (teplota 23°C, průtok 0,3 ml/min, nástřik 5 µl, DAD při 268 nm, teplota v autosampleru 4°C). Mobilní fáze byla tvořena ACN a vodou, dále 10mM, 50mM a 100mM octanem amonným s hodnotou pH 3,8 – 7,8. Jak je však patrné z chromatogramu (Obr. 13), metoda poskytuje špatnou účinnost a příliš široké píky. Jedinou výhodou metody je vysoká retence AA (Obr. 14). Nevýhodou kolony ZIC-HILIC je také její nestabilita a vysoká cena.



Obr. 13: Separace AA a chlorogenové kyseliny (IS) společně s UV spektrem AA [37]



Obr. 14: Závislost retence AA na koncentraci vodné složky mobilní fáze (AmAc – octan amonný, AcAc – octová kyselina) [37]

Retence rostla při zvyšující se koncentraci pufru. Vyšší retence i robustnosti bylo dosaženo také s rostoucí hodnotou pH. Maximální retence byla pozorována při pH 5,8, zatímco poklesla při nižších hodnotách pH. Největší vliv měla změna poměru vodné a organické složky mobilní fáze. S rostoucí koncentrací ACN rostla i retence AA, kdy retenční čas dosahoval až 25 min. (Obr. 14).

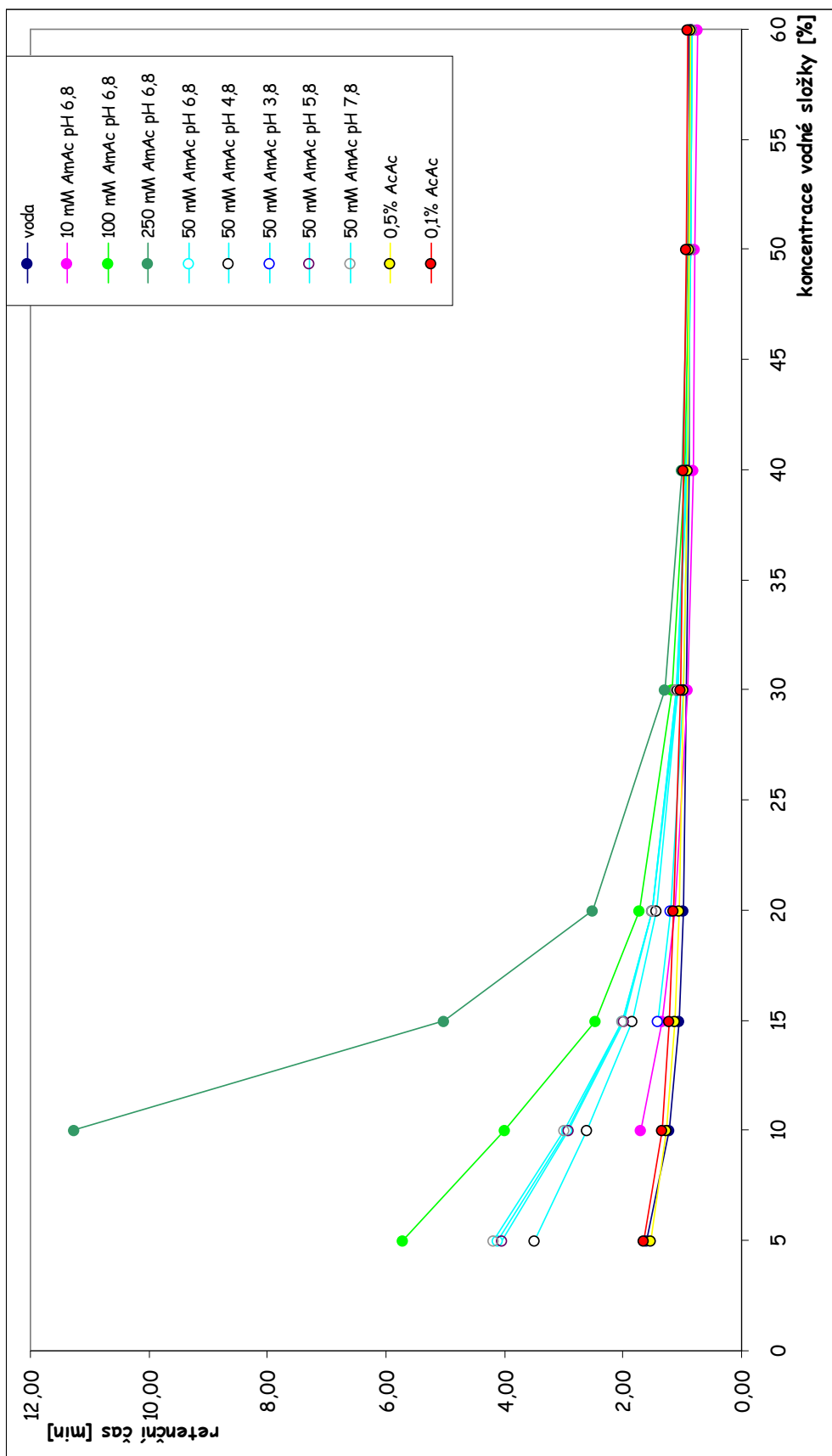
Během měření, které probíhalo na koloně Luna HILIC, byl obdobně sledován vliv hodnoty pH, koncentrace mobilní fáze a její vodné složky na retenci tentokrát obou analytů (AA i DHA).

Při použití ultračisté vody, 0,1% a 0,5% roztoku kyseliny octové jako vodných složek mobilní fáze byla retence AA i DHA ovlivněna minimálně.

Proto byl, jako další vodná složka mobilní fáze, použit pufr octanu amonného o různé síle (10mM, 50mM, 100mM a 250mM) a různé hodnotě pH (3,8 – 7,8). Jak je patrné z grafického znázornění (Obr. 15 a 16) a hodnot uvedených v Tab. 2, změna pH pufru neměla na retenci analytů na koloně Luna HILIC zásadní vliv.

K významnému ovlivnění retence AA došlo až se změnou koncentrace pufru. Jako nejvhodnější, z hlediska retence, byla vyhodnocena vodná složka

250mM octan amonný s hodnotou pH 6,8. Významný vliv měl také pokles koncentrace vodné složky mobilní fáze. K retenci došlo při 15% zastoupení vodné složky. Nejvýznamnější retence bylo dosaženo až při 10% a nižší koncentraci vodné složky.



Obr. 15: Závislost retence AA na koncentraci vodné složky mobilní fáze – kolona Luna HILIC

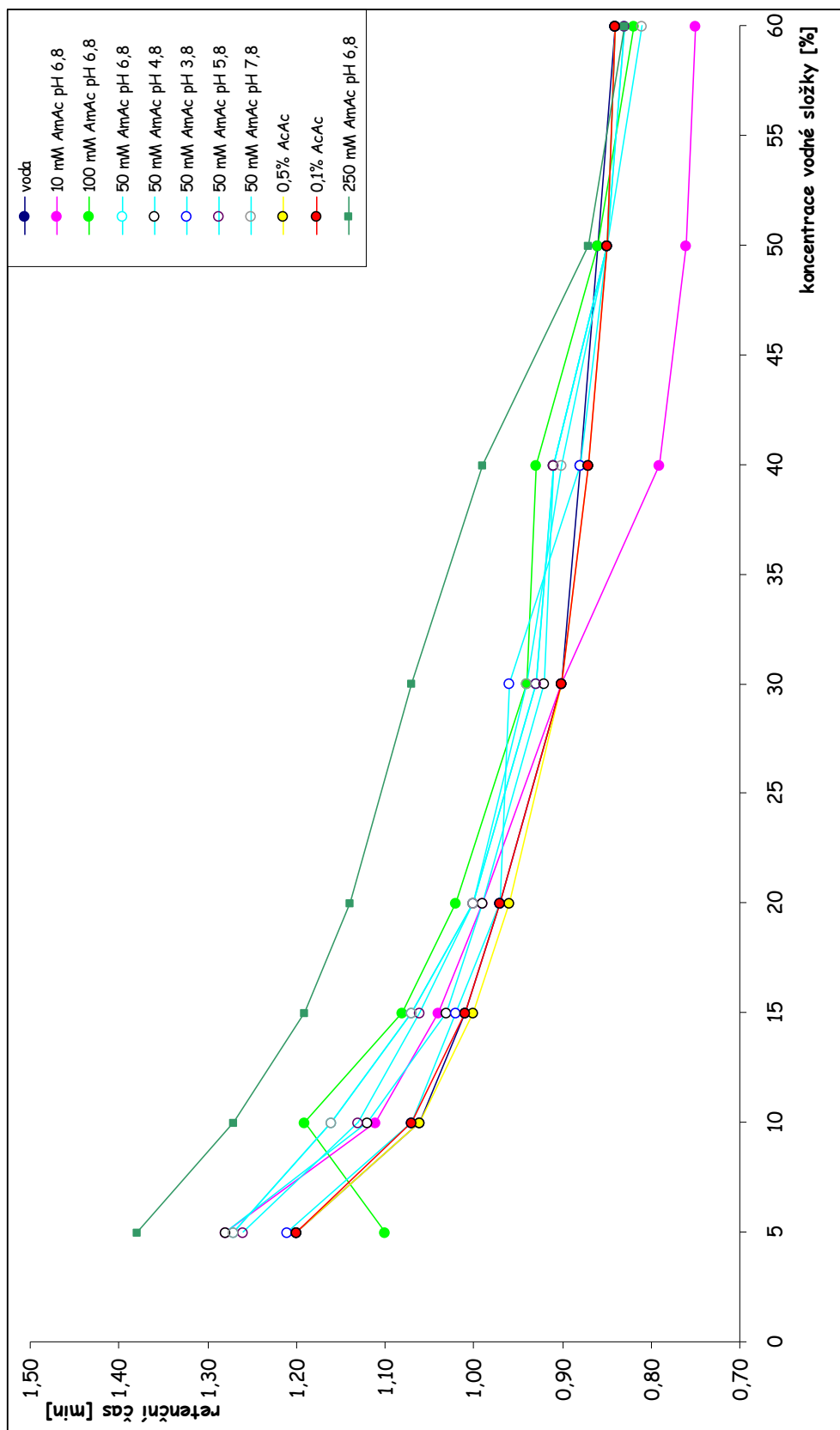
Stejné podmínky stanovení byly aplikovány i při měření retence DHA. Rovněž byl sledován vliv hodnoty pH, koncentrace mobilní fáze a obsahu její vodné složky. Retenční časy DHA jsou uvedeny v Tab. 2. Na retenci DHA (Obr. 13) však neměla změna výše uvedených hodnot prakticky žádný vliv. DHA se nepodařilo oddělit od mrtvého retenčního času.

Konc. vodné složky (%)	Voda	Kys. octová		Octan amonný		
		0,5%	0,1%	10mM pH 6,8	100mM pH 6,8	250mM pH 6,8
5	1,20	1,20	1,20	1,28	1,10	1,38
10	1,06	1,06	1,07	1,11	1,19	1,27
15	1,01	1,00	1,01	1,04	1,08	1,19
20	0,97	0,96	0,97	0,99	1,02	1,14
30	0,90	0,90	0,90	0,90	0,94	1,07
40	0,88	0,87	0,87	0,79	0,93	0,99
50	0,86	0,85	0,85	0,76	0,86	0,87
60	0,84	0,84	0,84	0,75	0,82	0,83

Tab. 2: Retenční časy při optimalizaci podmínek stanovení DHA – 1. část

Konc. vodné složky (%)	Octan amonný				
	50mM pH 6,8	50mM pH 4,8	50mM pH 3,8	50mM pH 5,8	50mM pH 7,8
5	1,27	1,28	1,21	1,26	1,27
10	1,16	1,12	1,07	1,13	1,16
15	1,07	1,03	1,02	1,06	1,07
20	1,00	0,99	0,97	1,00	1,00
30	0,93	0,92	0,96	0,93	0,94
40	0,91	0,91	0,88	0,91	0,90
50	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85
60	0,83	0,84	0,84	0,83	0,81

Tab. 2: Retenční časy při optimalizaci podmínek stanovení DHA – 2. část



Obr. 16: Závislost retence DHA na koncentraci vodné složky mobilní fáze

Získané výsledky byly porovnány s výsledky měření provedeného na koloně ZIC-HILIC [37]. Zatímco na koloně ZIC-HILIC rostla retence AA s rostoucí hodnotou pH pufru, na koloně Luna HILIC neměla měnit se hodnota pH zásadní vliv. K významnému ovlivnění retence AA došlo, na obou kolonách, při rostoucí koncentraci pufru. V obou případech měl významný vliv pokles koncentrace vodné složky mobilní fáze, retence nastala při 15% a nižším zastoupení vodné složky. Na koloně ZIC-HILIC však byly retenční časy AA podstatně delší (až 25 min.).

4.2 Použití detektoru Corona CAD

Následujícím krokem této diplomové práce byla aplikace optimalizovaných podmínek na stanovení AA a DHA za použití detektoru Corona CAD. Pro DHA poskytuje Corona CAD daleko lepší odezvu [25]. Jelikož u tohoto detektoru nelze mobilní fázi o tak velké síle pufru (250mM) použít, bylo měření provedeno s pufrům 50mM octanu amonného. Při použití kolony Luna HILIC nebyly výsledky použitelné kvůli nedostatečné retenci a nízké selektivitě. Následující mobilní fáze byla tvořena směsí ACN a 0,1% roztoku kyseliny octové. Nedošlo však k rozdělení analytů, ani k jejich oddělení od mrtvého retenčního času.

Další porovnávanou stacionární fází byla kolona ZIC-HILIC (Tab. 3). Jak již bylo uvedeno výše, pro DHA vykazuje kolona ZIC-HILIC nízkou separační účinnost. Jako další vodná složka mobilní fáze byla použita ultračistá voda, 0,1% roztok kyseliny octové a dále 0,1% roztok kyseliny mravenčí, protože tyto vodné složky nebyly v předchozí práci [37] testovány. Na této koloně k rozdělení analytů došlo, výsledky však nejsou použitelné v praxi z důvodu rozmytých píků, což poukazuje na špatnou účinnost kolony. Na retenci neměl vliv typ vodné složky mobilní fáze, ale poměr organická/vodná složka. K nejvyšší retenci došlo při poměru organická/vodná složka 93:7.

Kolona ZIC-HILIC	Konc. vodné složky (%)	Retence analytů (min.)		
		0,1% kys. octová	0,1% kys. mravenčí	Voda
AA	7	11,21	11,32	-
	10	5,82	5,97	5,74
	15	3,57	-	-
	22	2,62	-	-
DHA	7	2,42	2,44	-
	10	2,28	2,35	2,34
	15	1,85	-	-
	22	1,83	-	-

Tab. 3: Stanovení AA a DHA na koloně ZIC-HILIC detektorem Corona CAD

Třetí testovanou kolonou byla Atlantis T3, která je vhodná pro stanovení polárních látek, ale nejedná se o kolonu vyrobenou speciálně pro HILIC. Jde o klasickou separaci na reverzní fázi. Při analýze byly pozorovány opačné jevy než u ostatních porovnávaných kolon. Retenční časy analyzovaných složek (Tab. 4) rostly se zvyšující se koncentrací vodné složky. Mobilní fázi tvořila směs ACN a 0,5% roztoku kyseliny mravenčí. Výsledkem stanovení bylo nedostatečné rozdělení analytů. Nedošlo ani k oddělení od mrtvého retenčního času.

Kolona Atlantis T3	Konc. vodné složky (%)	Retence analytů (min.)
		0,5% kys. mravenčí
AA	50	1,86
	70	2,88
	90	3,03
DHA	50	2,02
	70	2,84
	90	3,54

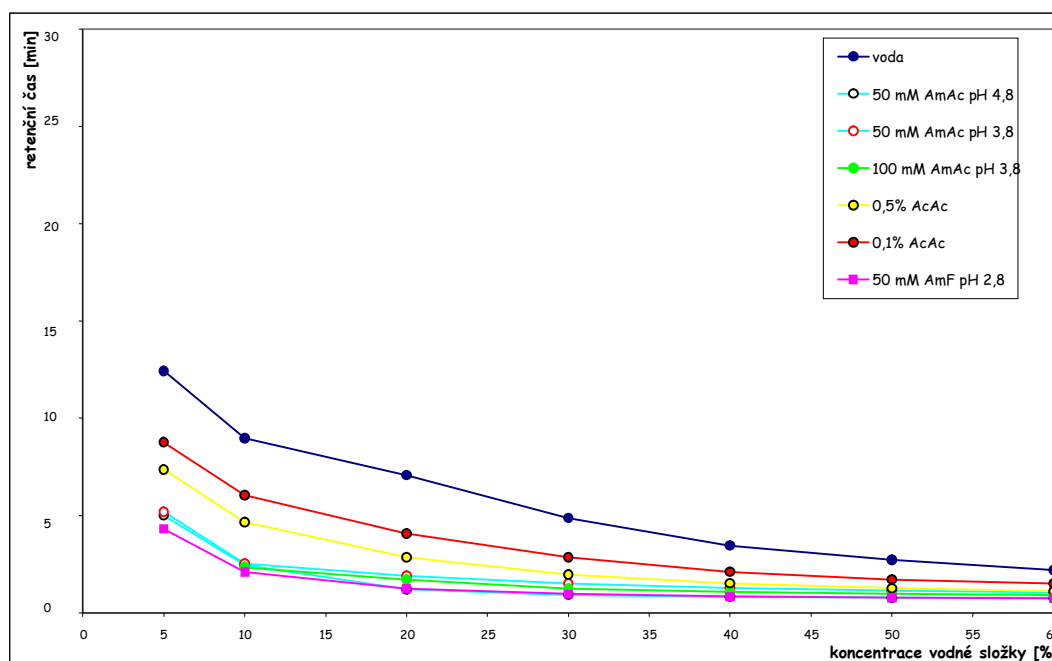
Tab. 4: Stanovení AA a DHA na koloně Atlantis detektorem Corona CAD

4.3 Použití detektoru NQAD

V rámci hledání nových možností stanovení AA a DHA byla využita možnost vyzkoušet nový typ detektoru na bázi aerosolu NQAD.

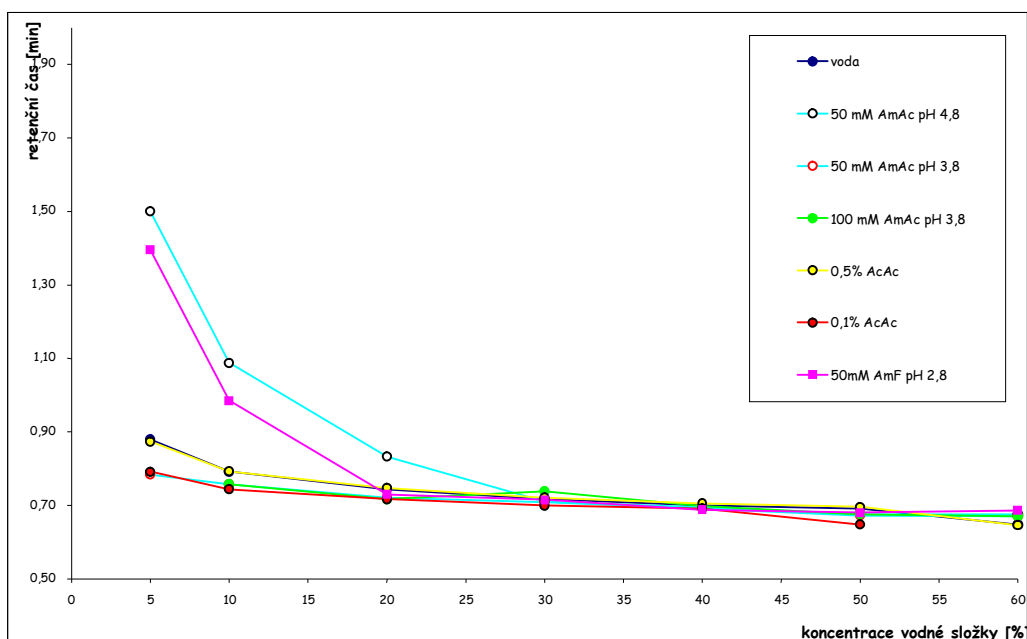
Pro měření byla použita metoda vyvinutá pro kolonu Obelisc R [25] a podmínky byly aplikovány na již zmíněný detektor. V rámci citované práce byla testována také kolona Obelisc N (na povrchu stacionární fáze nese pozitivní náboj, uvnitř stacionární fáze je náboj negativní). Výsledky stanovení AA a DHA jsou uvedeny na Obr. 17 až 20. Jak je patrné z grafických záznamů, výraznější retence AA bylo dosaženo při použití kolony Obelisc R.

Na koloně Obelisc N bylo nejsilnější retence AA dosaženo při použití vody a dále při použití vodné složky s nízkým pH. Čím více stoupala hodnota pH, tím nižší byla retence. Významný vliv na retenci měla také změna poměru vodné složky mobilní fáze. K retenci došlo při zastoupení 20% a méně. V případě DHA měla pozitivní vliv vyšší hodnota pH pufru. Největší retence bylo dosaženo při pH 4,8 (nejvyšší pH tolerované touto kolonou) a při záměně octanového pufru za pufr mravenčanový [25].



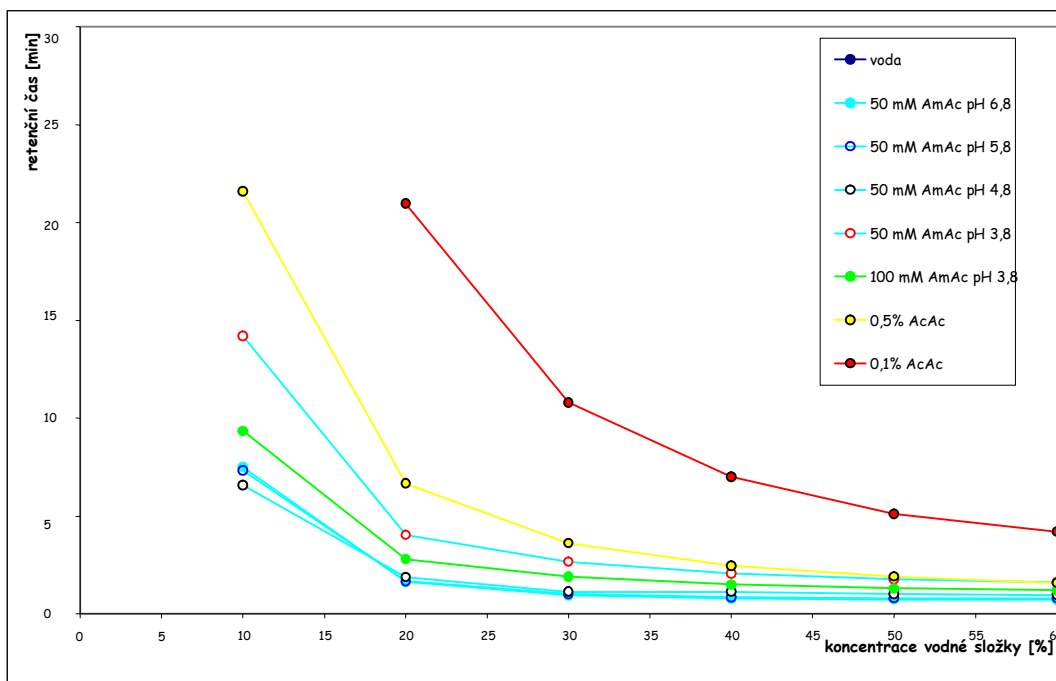
Obr. 17: Závislost retence AA na konc. vodné složky mobilní fáze - Obelisc N

(AmAc – octan amonný, AcAc – kyselina octová, AmF – mravenčan amonný) [25]

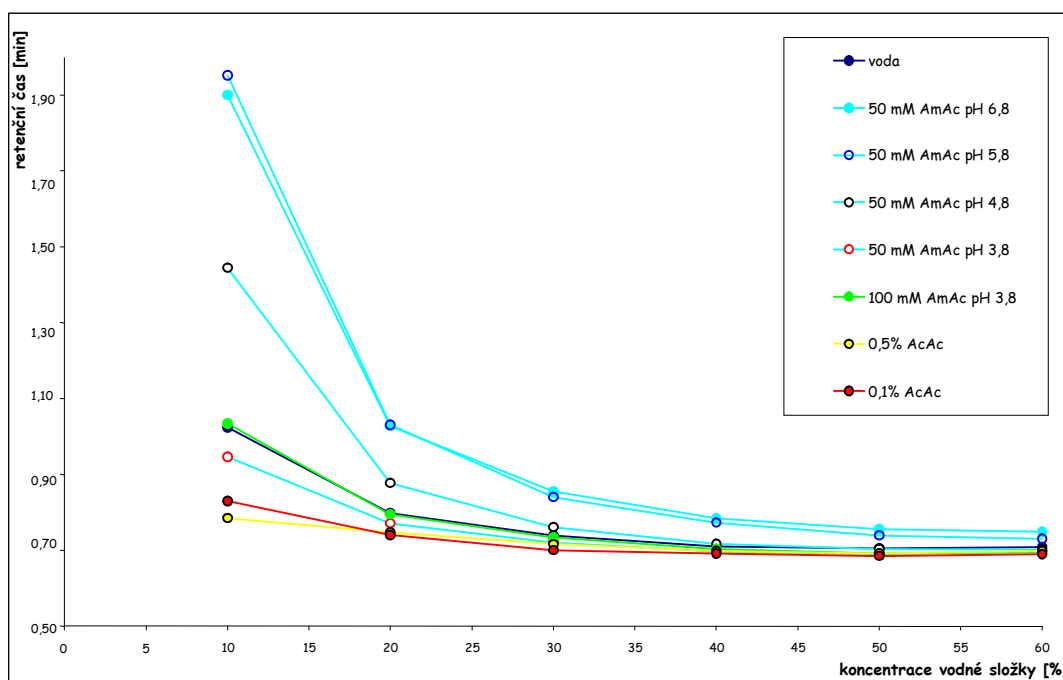


Obr. 18: Závislost retence DHA na konc. vodné složky mobilní fáze - Obelisc N [25]

Na koloně Obelisc R došlo k nejsilnější retenci AA také při použití vody. V grafu není tato hodnota uvedena z důvodu příliš dlouhého retenčního času. Čím nižší byla hodnota pH vodné složky mobilní fáze, tím silněji byla AA na koloně zadržována. Negativní vliv na retenci AA měla rostoucí koncentrace pufru (na rozdíl od Luna HILIC a ZIC-HILIC). Vliv poměru vodné a organické složky mobilní fáze byl obdobný jako při použití kolony Obelisc N. V případě DHA došlo k růstu retence při použití pufru o hodnotě pH 4,8 a více. Oproti AA jde o opačné chromatografické chování, čímž se ztěžuje nalezení podmínek kompromisu pro obě látky [25].



Obr. 19: Závislost retence AA na konc. vodné složky mobilní fáze - Obelisc R
[25]



Obr. 20: Závislost retence DHA na konc. vodné složky mobilní fáze - Obelisc R
[25]

Mobilní fáze byla tvořena ACN a 75mM octanem amonným pH 4,2 (85:15). Teplota termostatu byla nastavena na 23°C, průtok mobilní fáze byl 1 ml/min, objem nástřiku 10 µl a vzorek v autosampleru byl ochlazen na teplotu 4°C.

Podmínky jsme chtěli aplikovat na detektor NQAD, avšak při použití octanu amonného jako vodné složky nebyla odezva detektoru stabilní. Takto vysoká koncentrace pufru není pro NQAD doporučována. Lepší je použít 10mM pufr, avšak ani tato koncentrace pufru neumožnila měření na NQAD. Z tohoto důvodu byl použit 0,5% roztok kyseliny octové, kdy detektor poskytuje lepší odezvu a stabilizaci. Ani v tomto případě však nebyly výsledky měření uspokojivé. Jak se ukázalo, detektor je málo robustní, velmi citlivý na použití pufrů jako vodné složky mobilní fáze, typ kolony (velmi čisté kolony s omezeným krvácením stacionární fáze) a čistotu použitých chemikálií (vyžaduje použití činidel té nejvyšší čistoty).

Metoda pro stanovení AA, využívající kyselinu octovou jako vodnou složku mobilní fáze, byla validována a připravena pro případnou možnost aplikace NQAD v budoucnu.

4.4 Test způsobilosti systému

Nedílnou součástí validace analytické metody je test způsobilosti systému. Test byl proveden nástřikem roztoku AA za optimalizovaných podmínek v deseti sériích. V rámci testu byl stanoven počet teoretických pater, výškový ekvivalent teoretického patra, faktor symetrie píku, rozlišení a opakovatelnost nástřiků (byly sledovány retenční časy a plochy píků) (Tab. 5).

Hodnota počtu teoretických pater vyhovuje limitům, je však poměrně nízká. Naopak hodnota výškového ekvivalentu teoretického patra je vysoká. Faktor symetrie píku, rozlišení a stanovení opakovatelnosti nástřiků vyhovují předepsaným limitům.

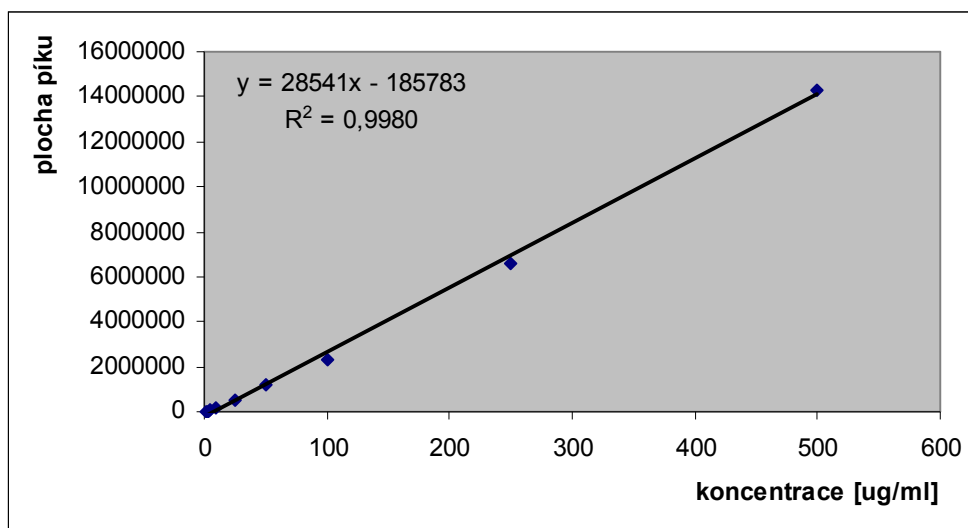
Chromatografická a separační data	AA	Požadované hodnoty
Počet teoretických pater	683	N > 200
Výškový ekvivalent teoretického patra	73	-
Faktor symetrie píku	1,27	$A_s < 2,0$
Rozlišení	6,59	$R_s > 1,5$
Přesnost - t_r (RSD %)	0,12	RSD < 1%
Přesnost - A (RSD %)	0,14	RSD < 1%

Tab. 5: Výsledky testu způsobilosti systému

4.5 Validace metody a analýza reálných vzorků

Pro ověření linearitu, validaci metody a analýzu reálných vzorků byla použita kolona Obelisc R. Z výše uvedených důvodů (viz. 4.3 Použití detektoru NQAD) byla mobilní fáze tvořena směsí ACN a 0,5% roztoku kyseliny octové (80:20). Měření probíhalo při vlnové délce 243 nm. Důvodem bylo kyselé pH vodné složky mobilní fáze. Absorpční maximum AA se posouvá v závislosti na hodnotě pH. Při pH 6,8 vykazuje AA absorpční maximum při vlnové délce 268 nm [37].

Kalibrační křivka AA byla změřena v koncentračním rozmezí 1 – 500 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 21). Výsledky měření linearitu jsou uvedeny v Tab. 6 a 7. Kalibrační křivka byla v daném rozmezí lineární. Metodu lze tedy považovat za vhodnou pro kvantitativní stanovení.



Obr. 21: Kalibrační křivka AA

Koncentrace (µg/ml)	plocha 1	plocha 2	plocha 3	průměr
1,0	9015	9948	9740	9568
2,5	30065	30676	31351	30697
5,0	82127	82648	76581	80452
10,0	171342	171696	169786	170941
25,0	521648	520991	519871	520837
50,0	1187094	1184427	1183262	1184928
100,0	2307187	2322428	2359362	2329659
250,0	6567046	6603353	6628025	6599475
500,0	14303399	14329797	14355070	14329422

Tab. 6: Hodnoty plochy pod píky AA

Linearita	rovnice regrese	$y = 28541x - 185783$
	hodnota spolehlivosti	$R^2 = 0,9980$

Tab. 7: Linearita kalibrační křivky

Důležitou součástí validace metody je stanovení správnosti (Tab. 8) a přesnosti (Tab. 9). Pro stanovení obsahu AA se odchylka pohybuje v rozmezí $100 \pm 10\%$. Hodnota přesnosti RSD(%) by neměla být větší než 5%. Tato stanovení byla prováděna u vzorků tablet, pastilek a prášku obsahujících AA.

Jako reálné vzorky byly zvoleny Celaskon 100 mg (Zentiva), Celaskon 250 mg (Zentiva), Hroznový cukr s vitamínem C pomeranč (Intact) a Vitamin C v prášku (Vitar).

Obsah AA (%)	Celaskon 100 mg	93,07
	Celaskon 250 mg	95,26
	Hroznový cukr s vitamínem C	96,25
	Vitamin C v prášku	101,68
Výtěžnost (%)	Celaskon 100 mg + přídavek standardu	109,66

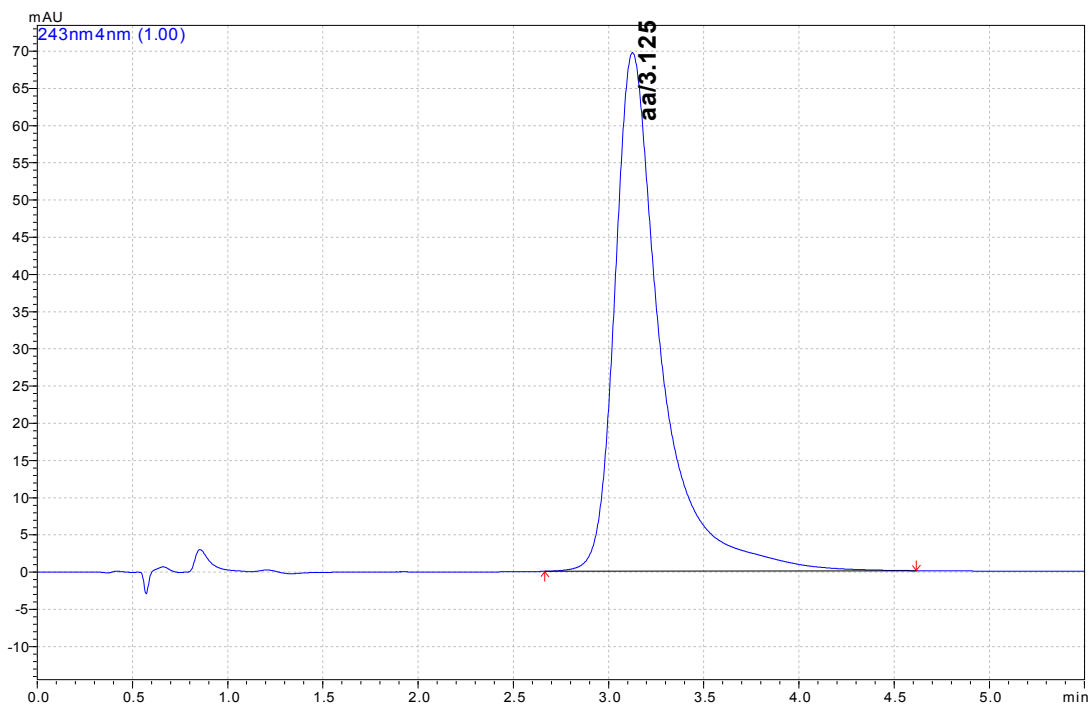
Tab. 8: Výsledky stanovení obsahu AA v reálných vzorcích a správnosti metody

Přesnost (RSD %)	Celaskon 100 mg	4,67
	Celaskon 250 mg	2,11
	Hroznový cukr s vitamínem C	4,37
	Vitamin C v prášku	3,64

Tab. 9: Výsledky stanovení přesnosti metody

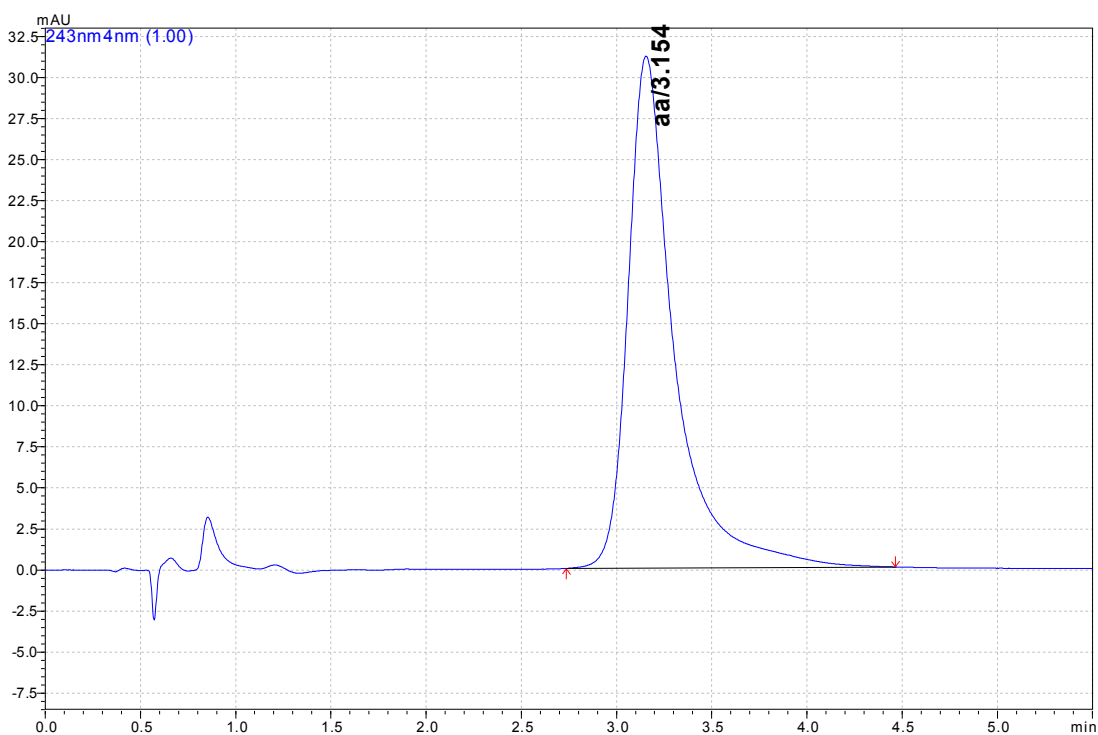
Součástí stanovení správnosti je metoda standardního přídávku označována také jako „spikování“. Princip metody spočívá v přidání známého množství standardu do roztoku obsahujícího příslušný analyt. Pro tento postup byl zvolen registrovaný přípravek Celaskon 100 mg. Chromatografické záznamy stanovení metodou standardního přídávku jsou uvedeny na Obr. 22 až 24.

Pro stanovení metodou standardního přídávku byl použit následující postup. Tableta byla rozpuštěna ve směsi ACN a 0,5% roztoku kyseliny octové (50:50) ve 100 ml odměrné baňce. Nejdříve bylo provedeno stanovení samotného vzorku o koncentraci 25 µg/ml, poté byla stanovována směs vzorku (koncentrace 25 µg/ml) s přídávkem standardu (koncentrace 25 µg/ml).



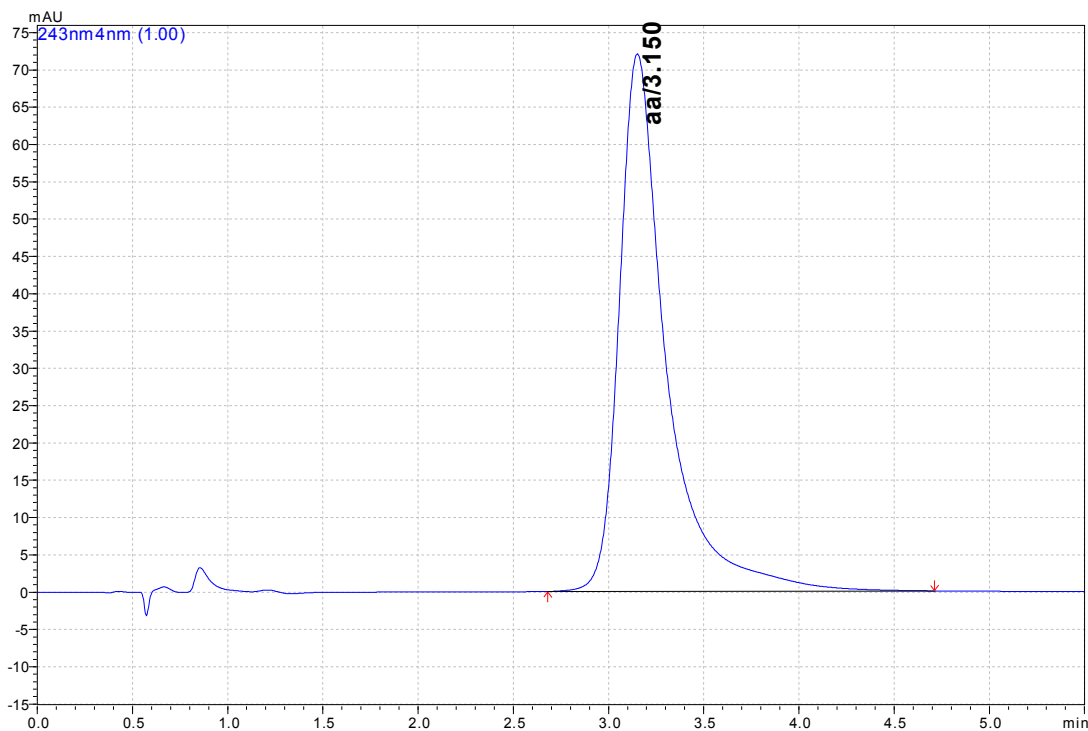
Obr. 22: Standardní roztok AA, detekce DAD

(20% vodná složka, 80% organická složka, Obelisc R, 0,5% kyselina octová, 1 ml/min, 23°C, UV 243nm)



Obr. 23: Celaskon 100 mg, detekce DAD

(20% vodná složka, 80% organická složka, Obelisc R, 0,5% kyselina octová, 1 ml/min, 23°C, UV 243nm)



Obr. 24: Celaskon 100 mg + standardní přídavek, detekce DAD

(20% vodná složka, 80% organická složka, Obelisc R, 0,5% kyselina octová, 1 ml/min, 23°C, UV 243nm)

Robustnost

V módu HILIC závisí retence analytů zejména na složení mobilní fáze, hodnotě pH a poměru organická/vodná složka.

Na koloně Obelisc R došlo k nejsilnější retenci AA při použití vody jako vodné složky mobilní fáze. Retence AA také rostla s klesající hodnotou pH. Při snížení pH o jednu jednotku vzrostla retence zhruba o 5 minut.

Kolem 50% zastoupení vodné složky byl vliv změny poměru organická/vodná složka malý. Vliv na retenci AA se začal projevovat až při 30% a méně. Při změně zastoupení vodné složky o 5% došlo ke změně retenčního času přibližně o 5 minut [25].

5. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na stanovení AA metodou HILIC a porovnání HILIC stacionárních fází.

Stanovení probíhalo za použití tří typů detekce. Pro optimalizaci metody byla použita UV detekce. Pro stanovení AA a DHA na jednotlivých stacionárních fázích byly použity detektory na bázi aerosolu CAD a NQAD.

V rámci optimalizace metody byly zjišťovány vhodné podmínky stanovení AA a DHA. Vodnou složku mobilní fáze tvořila ultračistá voda, kyselina octová nebo octan amonný o rostoucí síle pufru a různé hodnotě pH. Organickou složkou byl ACN. Během optimalizace byl sledován vliv postupné změny typu a koncentrace vodné a organické složky.

Optimalizace podmínek byla podrobně provedena na koloně Luna HILIC. S rostoucí silou pufru octanu amonného došlo ke zvýšení retence AA. Retence DHA zůstala neovlivněna.

Nejvyšší retence AA bylo dosaženo při použití 250mM octanu amonného s hodnotou pH 6,8. Mobilní fáze byla tvořena 10 % vodné složky a 90 % složky organické. Stanovení proběhlo při teplotě 23 °C a průtoku 0,8 ml/min. Tyto podmínky však nebyly použitelné pro aerosolové detektory CAD ani NQAD. Důvodem byla nekompatibilita vysoké koncentrace pufru.

Porovnávanými stacionárními fázemi byly Atlantis T3 a kolony vyvinuté speciálně pro stanovení metodou HILIC – Luna HILIC a ZIC-HILIC.

V případě kolon Luna HILIC a Atlantis T3 nedošlo k oddělení obou analytů od mrtvého retenčního času. Na koloně ZIC-HILIC došlo k separaci analyzovaných látek, píky však byly příliš široké a nesymetrické. Žádná z uvedených kolon tedy nebyla vyhodnocena jako vhodná pro současné stanovení AA a DHA.

Součástí této diplomové práce bylo také ověření vhodnosti použití detektoru Corona CAD pro stanovení AA a DHA. CAD umožňuje současnou detekci AA a DHA za podmínek nalezení vhodné chromatografické soustavy.

V rámci hledání nových možností stanovení AA a DHA byl testován také nový typ detektoru na bázi aerosolu NQAD. Výsledkem však byla nízká reprodukovatelnost. Bylo zjištěno, že detektor je málo robustní, velmi citlivý na použití pufrů jako vodné složky mobilní fáze, typ kolony a vyžaduje použití chemikálií té nejvyšší čistoty.

Proto byla validována metoda HILIC s kolonou Obelisc R za podmínek, které by v budoucnu mohly být použitelné ve spojení s tímto detektorem. Výsledkem stanovení správnosti byla výtěžnost 109,66%. Hodnota přesnosti, pro Celaskon 100 mg, byla 4,67%. Kalibrační křivka byla lineární v rozmezí 1 – 500 µg/ml.

6. Použitá literatura

- [1] Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum 2006
- [2] Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum 2005
- [3] www.vscht.cz/anl/lach1/6_LC.pdf, prosinec 2008
- [4] http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm, prosinec 2008
- [5] <http://www.hplc.cz/>, prosinec 2008
- [6] Český lékopis 2005, Grada Publishing, a.s. 2005
- [7] <http://bart.chemi.muni.cz/courses/Anal%20Org%20Latek%20-%20Separace.pdf>, prosinec 2008
- [8] Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv II., Karolinum 2004
- [9] Boersema P.J., Mohammed S., Heck A.J.R., Hydrophilic interaction liquid chromatography in proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 151-159
- [10] Hemström P., Irgum K., Hydrophilic chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784-1821
- [11] Nováková L., Solich P., Solichová D., HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 10 (2008) 942-958
- [12] <http://www.hplc.cz/Teorie/hilic.html>, prosinec 2008
- [13] <http://ymc.de/ymceurope/news/HILIC.html>, duben 2009
- [14] SeQuant, A Practical Guide to HILIC, SeQuant, Umeå, Sweden (2005)
- [15] http://www.chemagazin.cz/Texty/CHXVIII_6_cl6.pdf, únor 2009
- [16] http://www.sielc.com/pdf/SIELC_Obelisc_Intro.pdf, duben 2009
- [17] Kolektiv autorů, *Remedia Kompendium*, 3. vydání, Panax Co., spol. s r. o. (1999) 520-521
- [18] Bellocco E. et al., Neutron scattering and HPLC study on L-ascorbic acid and its degradation, *Chemical Physics* 345 (2008) 191-195
- [19] Hlúbik P., Opltová L., *Vitaminy*, Grada Publishing, a.s. (2004)
- [20] Ing. Tereza Burianová, Csc., *Solutio*, Medon s.r.o. (2002/2003) 123-124
- [21] Gioia M. G. et al., Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and acetaminophen in pharmaceuticals, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48 (2008) 331-339
- [22] AISLP – Automatizovaný Informační Systém Léčivých Přípravků, 2009
- [23] Deutsch J. C., Dehydroascorbic acid, *Journal of Chromatography A* 881 (2000) 299-307

- [24] Kall M. A., Andersen C., Improved method for simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, isoascorbic acid and dehydroisoascorbic acid in food and biological samples, *Journal of Chromatography B* 730 (1999) 101-111
- [25] Nováková L., Solichová D., Solich P., Hydrophilic 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
- [26] 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
- [27] Oms-Oliu G. et al., Effects of high-intensity pulsed electric field processing conditions on lycopene, vitamin C and antioxidant capacity of watermelon juice, *Food Chemistry* 115 (2009) 1312–1319
- [28] Vervoort N. et al., Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1189 (2008) 92-100
- [29] Sinclair I., Gallagher R., Charged Aerosol Detection: Factors for consideration in its use as a generic quantitative detector, *Chromatography Today*, Vol. 1, Issue 3 (2008) 5-9
- [30] Sun P. et al., Determination of relative response factors of impurities in paclitaxel with high performance liquid chromatography equipped with ultraviolet and charged aerosol detectors, *Journal of Chromatography A* 1177 (2008) 87-91
- [31] Lída M. et al., Quantitation of triacylglycerols from plant oils using charged aerosol detection with gradient compensation, *Journal of Chromatography A* 1176 (2007) 135-142
- [32] http://www.coronacad.com/CAD_Overview.htm, únor 2009
- [33] Brunelli C. et al., Corona-Charged Aerosol Detection in Supercritical Fluid Chromatography for Pharmaceutical Analysis, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2472-2482
- [34] <http://chromservis.cz/item/nqad-nano-quantity-analyte-detector>, duben 2009

- [35] http://www.quant-nqad.com/docs/NQAD_Brochure_031108.pdf,
duben 2009
- [36] Nováková L., Pokroky v HPLC, přednáška, Katedra analytické chemie,
Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,
listopad 2008
- [37] Nováková L. et al., Hydrophilic interaction liquid chromatography method
for the determination of ascorbic acid, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1634-1644
- [38] International Conference on Harmonisation (ICH), Q2 (R1): Validation of
Analytical Procedures: Text and Methodology, US Food and Drug
Administration, Fed. Reg. 60 (1995) 11 260