

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Separace optických izomerů flavanonů a flavanon-7-O-glykosidů pomocí nano-LC s využitím derivatizovaných cyklodextrinů jako aditiv mobilní fáze**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor:

Mgr. Renáta Zátopková

Studijní obor:

Analytická chemie

Konzultant práce:

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2022

# Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Mgr. Renáta Zátopková

Název práce: Separace optických izomerů flavanonů a flavanon-7-*O*-glykosidů pomocí nano-LC s využitím derivatizovaných cyklodextrinů jako aditiv mobilní fáze

Typ práce: Rigorózní

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Konzultant: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Rok odevzdání práce: 2022

Anotace:

Rigorózní práce se zabývá problematikou využití nanokapalinové chromatografie pro separaci stereoisomerů flavanonů a flavanon-7-*O*-glykosidů. Tato práce se zabývá využitím achirální kapilární kolony s reverzními fázemi a derivatizovaných  $\beta$ -cyklodextrinů, které slouží jako chirální aditiva mobilní fáze. Vyvinutá metoda pro chirální separace aglykonů flavanonů využívá karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextriny jako chirální selektory. Diastereomerní separace flavanon-7-*O*-glykosidů na základní linii bylo dosaženo s použitím sulfobutylether- $\beta$ -cyklodextrinů. Metoda, která byla v této práci vyvinuta, byla také validována. Poslední část práce se zabývá identifikací a stanovením jednotlivých flavanon-7-*O*-glykosidů ve vzorcích citrusového džusu.

Klíčová slova: Chirální aditiva mobilní fáze, chirální separace, citrusové džusy, cyklodextriny, flavonoidy nano-LC.

Počet stran: 35

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

# Bibliographical identification

Author's first name and surname: Mgr. Renáta Zátopková

Title: Stereoisomer separation of flavanones and flavanone-7-*O*-glycosides by means of nanoliquid chromatography employing derivatized  $\beta$ -cyclodextrins as mobile-phase additive

Type of thesis: Advanced Master's (RNDr.)

Department: Department of analytical chemistry

Consultant: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

The year of submission: 2022

Annotation:

The presented thesis deals with the utilization of nanoliquid chromatography that allows the stereoisomer separation of flavanones and flavanone-7-*O*-glycosides. The developed method employs the achiral reversed phase capillary column and derivatized  $\beta$ -cyclodextrins as chiral mobile phase additive. Baseline separation of flavanone enantiomers was obtained by addition of carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin. Flavanone-7-*O*-glycosides were resolved by using sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin. The developed method was validated. Finally, major flavanone-7-*O*-glycosides in citrus juices were identified and their content was determined.

Keywords: Chiral mobile phase additive, citrus juices, cyclodextrins, nano-LC, stereoisomer separation.

Number of pages: 35

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou řádně citovány a uvedeny v seznamu použité literatury. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne.....

.....  
Podpis

Na tomto místě bych chtěla upřímně poděkovat kolegům z odboru kriminalistické techniky a expertiz krajského ředitelství policie Moravskoslezského kraje, kteří mě k napsání této práce přiměli, zejména Pavlu Blažkovi, který mě nekonečně podporuje. Rovněž chci poděkovat konzultantovi mé rigorózní práce doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D. za spoustu času, který mi obětoval již během tvoření stejnojmenného článku. Velký dík patří Dr. Zeineb Aturki z římské akademie věd, kde jsem strávila 3 měsíce a která mi věnovala obrovské množství času jak během stáže, tak během příprav výše zmíněného článku. Dík patří rovněž kamarádům z Foresterie. V neposlední řadě děkuji svým rodičům, kteří mě bezmezně podporují.

Tato práce vznikla za podpory z Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání – z evropského fondu pro regionální rozvoj, projekt č. CZ.02.1.01/0,0/0,0/16\_019/0000754 a projektu IGA\_PrF\_2019\_028.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Teoretická část</b> .....	<b>2</b>
2.1. Flavonoidy .....	2
2.2. Chirální separace flavonoidů .....	4
2.2.1. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí CE .....	6
2.2.2. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí HPLC .....	6
2.2.2.1. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí HPLC s využitím chirálních kolon na bázi polysacharidů .....	6
2.2.2.2. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí HPLC s využitím chirálních kolon na bázi CD .....	7
2.2.3. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí nano-LC .....	8
2.2.3.1. Nano-LC s chromatografickými kolonami obsahujícími CSP (chirální kolony) .....	8
2.2.3.2. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí nano-LC s přídavkem chirálních selektorů do mobilní fáze (CMPA) .....	9
<b>3. Experimentální část</b> .....	<b>11</b>
3.1. Použité chemikálie.....	11
3.2. Instrumentace.....	11
3.3. Příprava kapilárních kolon .....	12
3.4. Příprava vzorků .....	13
<b>4. Výsledky a diskuze</b> .....	<b>13</b>
4.1. Chirální separace aglykonů flavanonů .....	14
4.2. Diastereomerní separace FGs .....	21
4.3. Validace nano-LC metody .....	24
4.4. Stanovení obsahu FGs v citrusových džusech.....	27
<b>5. Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>30</b>
<b>6. Závěr</b> .....	<b>32</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>33</b>

# 1. Úvod

Nanokapalinová chromatografie se s úspěchem využívá k chirální separaci léčiv nebo přírodních látek, jako jsou např. flavonoidy. Vzhledem k tomu, že investice do kapilární kolony je poměrně vysoká a pro separaci skupiny látek je potřeba různých chirálních selektorů, nabízí se nanokapalinová chromatografie s využitím kapilárních kolon s achirální stacionární fází a přidavek aditiv zajišťujících chirální rozlišení do mobilní fáze. Protože nanokapalinová chromatografie umožňuje pracovat s velmi nízkou spotřebou mobilní fáze, je možné ovlivňovat její selektivitu i přidavkem drahých chirálních selektorů, jako jsou například derivatizované cyklodextriny. V tomto uspořádání je možno změnou mobilní fáze (změnou typu chirálního selektoru a jeho koncentrace) velmi pružně ovlivňovat enantioseparaci.

Flavanony se nejvíce vyskytují v citrusových plodech a ovlivňují jak vzhled a chuť ovoce, tak jejich nutriční hodnotu. Stanovení stereoisomerních forem flavanonů v ovoci umožňuje podrobněji charakterizovat kvalitu a bezpečnost produktů potravinového průmyslu.

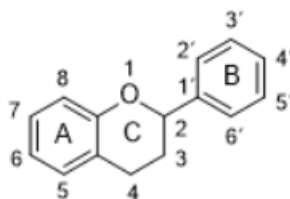
Cílem rigorózní práce bylo využití nanokapalinové chromatografie pro separaci stereoisomerů flavanonů a flavanon-7-*O*-glykosidů. Tato práce se zabývá využitím achirální kapilární kolony s reverzními fázemi, a derivatizovaných  $\beta$ -cyklodextrinů, které slouží jako chirální aditiva mobilní fáze. Využití přídatku chirálního selektoru do mobilní fáze umožňuje vyšší flexibilitu chromatografické metody oproti standardnímu uspořádání s využitím chirálních kapilárních kolon, a dochází také ke snížení finančních nákladů na tyto separace. Ačkoli je tato technika poměrně jednoduchá a levná, v literatuře nebylo doposud popsáno využití nanokapalinové chromatografie s achirální kapilární kolonou a přidavkem chirálního selektoru do mobilní fáze pro stereoselektivní separaci flavanonů či flavanon-7-*O*-glykosidů.

Výsledky této studie byly publikovány ve stejnojmenném článku v periodiku *Journal of Separation Science* v roce 2020.1

## 2. Teoretická část

### 2.1. Flavonoidy

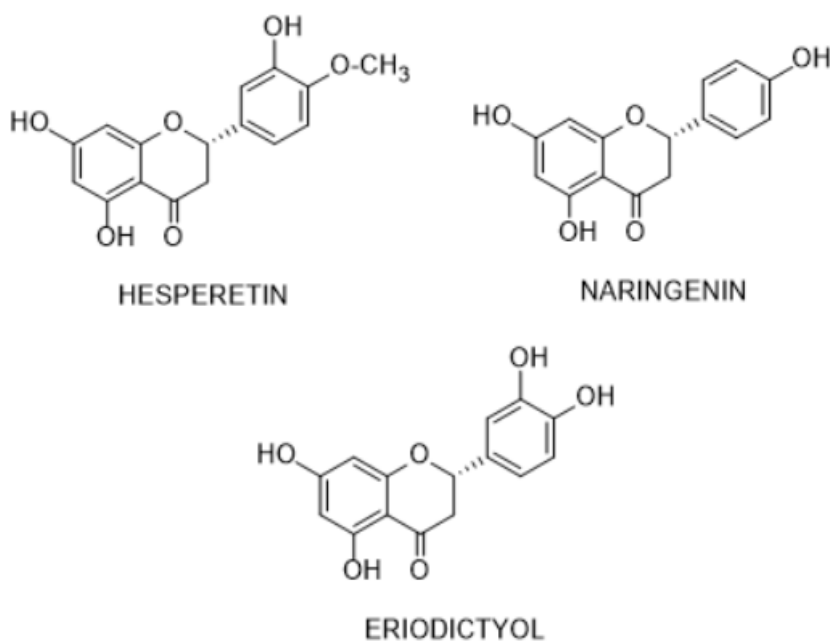
Flavonoidy jsou skupinou přírodních látek, které se vyskytují v rostlinných tkáních, buňkách či na povrchu rostlin; jsou obsaženy v ovoci, zelenině a obilninách. Díky svému rozšíření v přírodě se staly nedílnou součástí jídelníčku.<sup>2, 3</sup> Za zmínku stojí jejich protizánětlivé, antialergické a antibakteriální vlastnosti. Popisovány jsou rovněž jejich protirakovinné vlastnosti.<sup>4, 5, 6</sup> Základní struktura flavonoidů je na uvedena na obr. 1. Flavonoidy jsou dále děleny podle struktury. Vhodný je postup podle van Ackera, který rozděluje flavonoidy na flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly, anthokyanidiny, dihydroflavonoly, chalkony a isoflavonoidy.<sup>7</sup>



**Obrázek č. 1.** *Flavonoidní skelet.*

V citrusových plodech jsou nejvíce zastoupeny flavanony, které se v ovoci mohou vyskytovat ve formě aglykonů, ale mnohem častěji se vyskytují ve formě glykosidů. Aglykony, nejčastěji hesperetin, naringenin a eriodictyol (obr. 2) neobsahují cukerný zbytek a v citrusových džusech se vyskytují v minoritním množství, což souvisí s jejich méně hydrofilní povahou, a tedy nižší rozpustností ve vodě oproti odpovídajícím glykosidům. Glykosylované flavanony je možné po chemické či enzymatické hydrolyze analyzovat ve formě aglykonů.<sup>8, 9</sup>

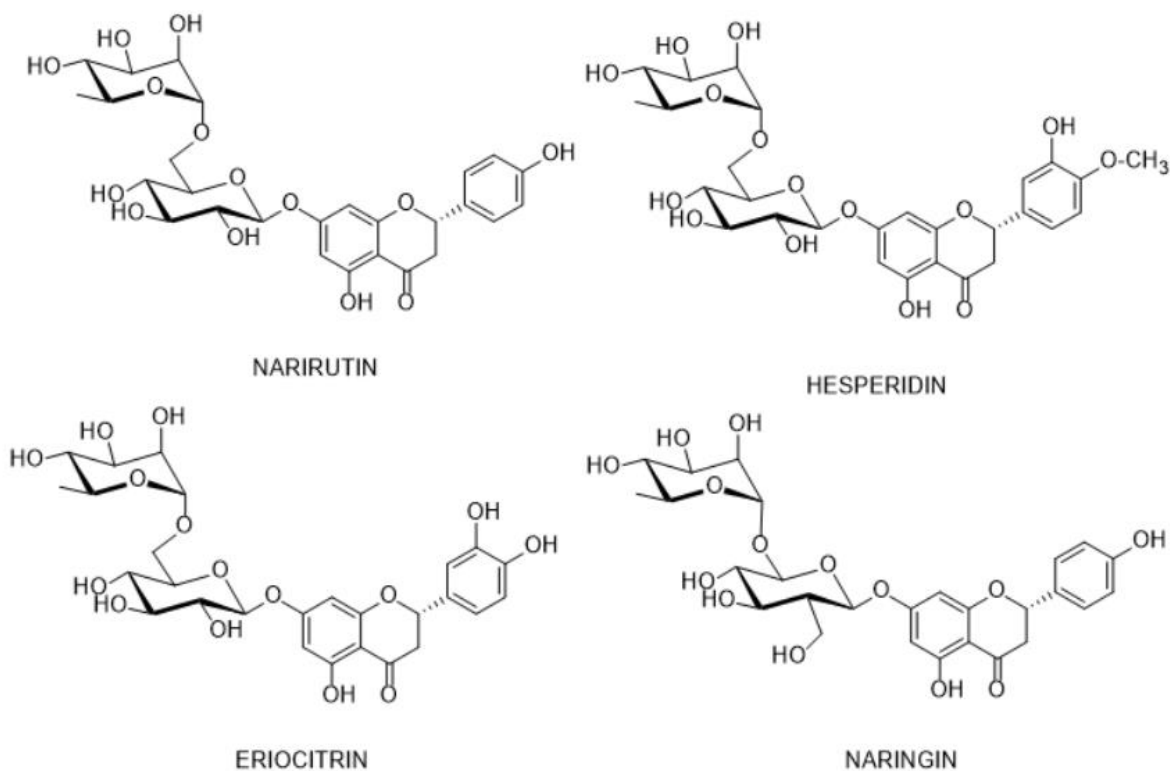




**Obrázek č. 2.** Chemické struktury vybraných aglykonů flavanonů.

V citrusových plodech se flavanony vyskytují nejčastěji ve formě *O*-glykosidů, u kterých je na hydroxylovou skupinu aglykonu v pozici C-7 vázán disacharid, nejčastěji rutinosa a neohesperidosa. Mluvíme tedy o flavanon-7-*O*-glykosidech (FGs).<sup>10</sup> Mezi nejvíce zastoupené FGs v citrusových plodech, jako jsou grapefruity, pomeranče nebo citrony, patří hesperidin, naringin, narirutin, eriocitrin a neohesperidin (obr. 3). Tyto sloučeniny ovlivňují organoleptické vlastnosti výše zmíněných plodů, které jsou hořké či naopak sladké v závislosti na obsažených FGs.<sup>11</sup> Popisované flavanony ovlivňují vzhled ovoce, chuť a zvyšují jeho kvalitu a s ní související nutriční hodnotu.<sup>12</sup>

Díky asymetrické poloze C-2 se aglykony flavanonů vyskytují jako dvojice enantiomerů, zatímco flavanon-7-*O*-glykosidy existují jako dvojice diastereomerů, a to pro přítomnost stereogenních center v pozici C-2 i v pozici C-7. Stanovení izomerních forem jednotlivých FGs pomůže detailněji porozumět biosyntéze polyfenolických sloučenin, ale také umožní stanovit a charakterizovat kvalitu a bezpečnost produktů potravinového průmyslu s obsahem těchto flavonoidů.<sup>13</sup>



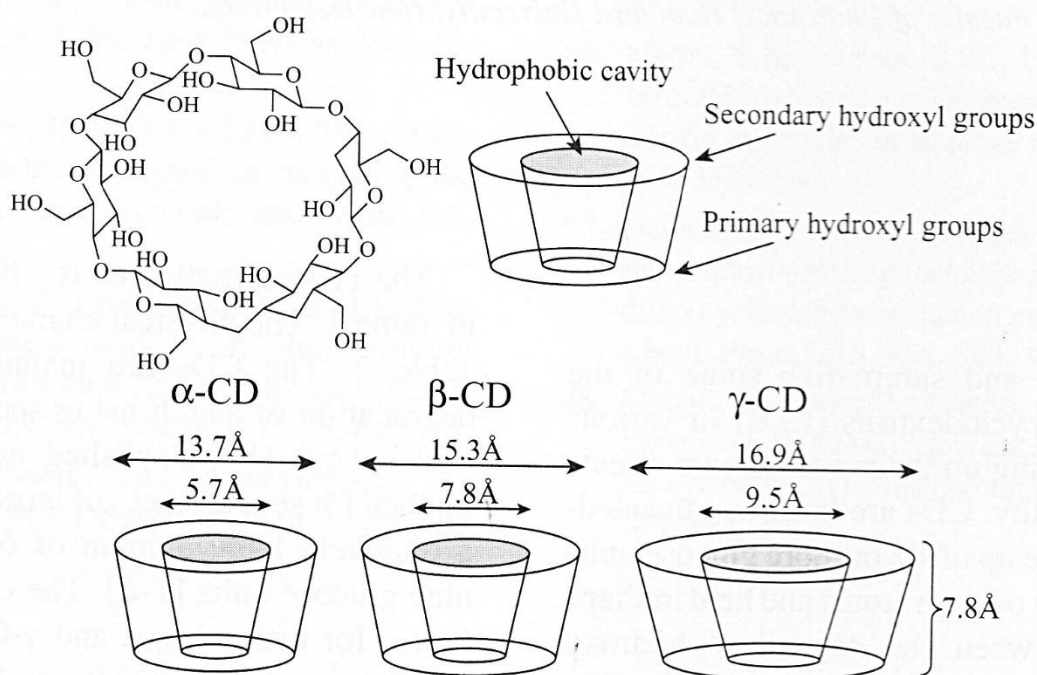
**Obrázek č. 3.** Chemické struktury vybraných flavanon-7-*O*-glykosidů.

## 2.2. Chirální separace flavanonů a FGs

Existuje celá řada analytických metod, které umožňují chirální separaci flavanonů a FGs. Mezi ty nejhojněji využívané se řadí vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC), kapilární elektroforéza (CE) či micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). Ve všech těchto metodách je možno využít chirálních selektorů. Mezi nimi je velmi časté použití cyklodextrinů (CD).

Cyklodextriny patří do skupiny cyklických oligosacharidů, složených z 6-8 glukózových jednotek, které jsou spojeny  $\alpha$ -1,4 glykosidovými vazbami. V závislosti na počtu glukózových jednotek rozlišujeme  $\alpha$ -cyklodextriny ( $\alpha$ -CD) (6 glukózových jednotek),  $\beta$ -cyklodextriny ( $\beta$ -CD) (7 glukózových jednotek) a  $\gamma$ -cyklodextriny ( $\gamma$ -CD) (8 glukózových jednotek). Cyklodextriny, ať nativní nebo derivatizované se vyznačují (i) vysokou rozlišovací schopností, (ii) nízkou UV-vis absorpcí a (iii) nízkou cenou a dobrou dostupností.<sup>14, 15, 16, 17</sup>

Cyklodextriny se vyznačují svou kónickou strukturou s hydrofobní kavitou, zatímco vnější povrch vykazuje spíše hydrofilní vlastnosti díky přítomnosti hydroxylových skupin (viz obr. 4).<sup>18</sup> CD jsou schopny vytvářet dočasné diastereomerní inkluzní komplexy s enantiomery, které interagují s kavitou CD (velikosti analytu je možné vhodnou volbou  $\alpha$ ,  $\beta$  nebo  $\gamma$ -CD přizpůsobit velikost kavity). Nicméně hydroxylové skupiny na povrchu CD hrají při chirální separaci rovněž významnou roli, jelikož tvoří adsorpční a/nebo vodíkové vazby s analyty a umožňují tak jejich separaci. Povrch CD je možné také modifikovat různými funkčními skupinami a takto je možné vytvořit derivatizované CD s požadovanými vlastnostmi (vyšší rozpustnost, rozdílná hloubka kavity, interakční místa apod.).<sup>14, 15</sup>



**Obrázek č. 4.** *Struktura cyklodextrinů.* (Obrázek stažen z <https://www.pvd.co.nz/vet-pages/beta-cyclodextrin>; 14. 03. 2021)

### 2.2.1. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí CE

Analytická metoda, která umožňuje separovat enantiomery a diastereomery flavanonů, resp. FGs, je kapilární elektroforéza. Mezi její hlavní výhody patří rychlost a účinnost analytické separace a malá spotřeba vzorků a elektrolytů (včetně jejich aditiv, kterými jsou např. chirální selektory). Ke zvýšení citlivosti a účinnosti analytické separace dále přispívá spojení CE s hmotnostní spektrometrií.

Diastereomery FGs byly separovány pomocí kapilární elektroforézy s přidavkem cyklodextrinů do základního elektrolytu. Byly použity nativní CD ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD), neutrální derivatizované CD (dimethyl- $\beta$ -CD, hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD), hydroxypropyl- $\gamma$ -CD (HP- $\gamma$ -CD)) a nabitě CD (karboxymethyl- $\beta$ -CD (CM- $\beta$ -CD), karboxyethyl  $\beta$ -CD (CE- $\beta$ -CD)). Diastereomery eriocitrinu a hesperidinu byly analyzovány v citrónovém džusu.<sup>19</sup> Pro zvýšení účinnosti separace diastereomerů jednotlivých FGs využili Gel-Moreto a kol. kombinaci různých CD jako aditiv do základního elektrolytu. Kombinací dvou různých CD pak byly rozděleny FGs v čerstvě připravených a komerčně dostupných citrusových džusech (pomerančový, mandarinkový, citrónový či grapefruitový).<sup>20</sup> Aturki a kol. vyvinuli metodu pro chirální separaci naringinu, hesperidinu, neohesperidinu, narirutinu a eriocitrinu pomocí CE s přidavkem sulfobutylether- $\beta$ -CD (SBE- $\beta$ -CD) do základního elektrolytu, která byla dále aplikována na vzorek citrusového džusu.<sup>21</sup> S využitím  $\gamma$ -CD byly chirálně rozlišeny některé flavanony a FGs pomocí MEKC.<sup>22</sup>

### 2.2.2. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí HPLC

HPLC je v dnešní době nejhojněji využívanou separační technikou pro chirální separaci flavonoidů. K dosažení chirálního rozlišení flavonoidů byla úspěšně použita celá řada polymerních chirálních kolon, které mohou být dále děleny na i) polysacharidové, ii) cyklodextrinové, iii) smíšené.<sup>13</sup>

#### 2.2.2.1. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí HPLC s využitím chirálních kolon na bázi polysacharidů

Ke stereoisomerní separaci některých flavanonů se využívají chromatografické kolony s chirální stacionární fází (CSP) na bázi polysacharidů (deriváty amylozy a celulózy) a to jak v uspořádání na reverzních (RP), tak na normálních fázích (NP). K separaci enantiomerů naringenu, eriodictyolu a hesperetinu v normálním separačním

módu s vysokým rozlišením byly v práci Caccamese a kol. využity kolony Chiracel OD-H a Chiralpak AS-H.<sup>23</sup> Baranowska a kol. vyvinuli metodu pro chirální separaci 12 enantiomerů flavanonů v reálných vzorcích během jediné analýzy za použití chirální kolony Chiralpak AD-3R s využitím gradientové eluce.<sup>24</sup> Magiera a kol. vyvinuli metodu pro chirální separaci naringeninů v ovocném džusu za použití chirální kolony Chiracel OJ-RH v polárně-organickém separačním módu. Reálný vzorek byl připraven po vysolení a extrakci kapalina-kapalina.<sup>25</sup>

#### **2.2.2.2. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí HPLC s využitím chirálních kolon na bázi CD**

Chirální kolony založené na nativních nebo derivatizovaných cyklodextrinech, jako například  $\gamma$ -CD, permethylovaného- $\beta$ , karboxymethylovaného- $\beta$ -CD, acetylovaného- $\beta$ -CD byly v uspořádání na reverzních fázích použity k diastereomernímu rozlišení FGs, jako je naringin, narirutin, neohesperidin, hesperidin a prunin.<sup>26, 27</sup> Tang a kol. se zabývali hodnocením polarity mobilní fáze (MP) při chirální separaci racemických směsí, mimo jiné aglykonů hesperetinu a naringeninů, za použití perfenylkarbamoyl- $\beta$ -cyklodextrinů jako stacionární fáze.<sup>28</sup> Shuang a kol. syntetizovali stilbenový diamido-můstkový bis( $\beta$ -CD), který byl navázán na stacionární fázi. V uspořádání na reverzních fázích bylo možné diastereomerní rozlišení flavanonů, jako je naringenin a hesperidin. Tato chirální stacionární fáze byla dále porovnána se stacionární fází na bázi nativních  $\beta$ -CD a zkoumané analyty vykazovaly vyšší diastereoselektivitu a tudíž vyšší rozlišení.<sup>29</sup>

Pro separaci diastereomerů FGs (naringin, hesperidin, neohesperidin, narirutin a eriocitrin) z čerstvě připravených citrusových džusů bylo využito multidimenzionální LC. Metoda, kterou vyvinula Aturki a kol. využívala dvě chromatografické kolony – RP C18 a chirální kolonu, jejíž stacionární fáze obsahovala karboxymethyl- $\beta$ -CD. Tyto chromatografické kolony byly připojeny v sérii. Pomocí ESI-MS pak bylo studováno relativní zastoupení jednotlivých isomerů FGs v citrusových džusech po jejich předchozí separaci.<sup>30</sup>

### 2.2.3. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí nano-LC

Ačkoli jsou konvenční chromatografické metody spolehlivé, robustní a reprodukovatelné, díky vysoké ceně chirálních kolon jsou metodami poměrně drahými. Nelze obvykle spolehlivě předpovědět, na které chirální stacionární fázi bude dosaženo požadované separace. Proto je běžné testování většího počtu chirálních kolon, což optimalizaci analytického postupu dále prodražuje.

Proto je vhodným východiskem miniaturizace chromatografické techniky a použití chirálních selektorů jako aditiv mobilní fáze. Výsledkem je nano-LC, která skrývá mnoho výhod, jako je již zmíněná nízká spotřeba mobilní fáze a chirálních selektorů, vysoká účinnost a selektivita. Nano-LC umožňuje rychlé analýzy a je šetrná k životnímu prostředí díky malému množství produkovaných odpadů ve srovnání s konvenční HPLC.<sup>31, 32</sup> Snižováním poloměru kolony se snižuje množství stacionární fáze potřebné pro naplnění kolony, tudíž mohou být využívány také drahé stacionární fáze či selektory, jako jsou CD.

#### 2.2.3.1. Nano-LC s chromatografickými kolonami obsahujícími CSP (chirální kolony)

Diastereomerní separace FGs pomocí nano-LC mohou probíhat na chirálních chromatografických kolonách (v případě nano-LC kapilární kolony). Si-Ahmed a kol. využili kapilární kolonu se stacionární fází na bázi fenyl-karbamát-propyl- $\beta$ -CD a v uspořádání na polárních organických fázích, normálních a reverzních fázích separovali flavanony a FGs. Většina analytů byla chirálně rozlišena na reverzních fázích v soustavě methanol/voda. Enantiomerní a diastereomerní separace hesperetinu a hesperidinu byla dosažena také v uspořádání na normálních fázích s využitím soustavy ethanol/hexan/kyselina trifluoroctová (TFA).<sup>33</sup> Chirální separace flavanonů a FGs byly prováděny také v pozdější práci Si-Ahmeda a kol. s využitím chirálních kapilárních kolon na bázi polysacharidů Sepapak® 1, 2 a 3 a v polárně-organickém, normálním a reverzním módu. Chirální separace 8 flavanonů a FGs byly s vysokým rozlišením dosaženy při použití chirální kolony Sepapak® 3, s využitím polárně-organického módu (mobilní fáze sestávající se z methanolu a isopropanolu v poměru 20:80, v/v). Horší rozlišení, rozšířené chromatografické píky a delší časy analýz byly pozorovány u separace v uspořádání normálního a reverzního separačního módu oproti polárně-organickému módu.<sup>34</sup>

Silva a kol. připravili CSP na bázi CD, kdy Staudingerovou reakcí modifikovali silikagel, na jehož povrch následně imobilizovali derivát  $\beta$ -CD (3,5-dimethylfenylkarbamoylovaného- $\beta$ -CD). Tato CSP byla naplněna do kapiláry a využita k chirální separaci flavanonů a FGs. Úplné chirální separace s krátkou dobou analýz bylo dosaženo u většiny flavanonů a FGs v reverzním separačním módu s využitím mobilní fáze sestávající z methanolu a vody s přidavkem 10 mM acetátového pufru s pH upraveným na hodnotu 4,5.<sup>35</sup>

### **2.2.3.2. Chirální separace flavanonů a FGs pomocí nano-LC s přidavkem chirálních selektorů do mobilní fáze (CMPA)**

Alternativou k využívání chirálních kapilárních kolon je přidavek chirálních selektorů (CS) do mobilní fáze. Tato metoda je díky nízkým průtokům mobilní fáze vysoce kompatibilní s nano-LC. Spotřeba chirálních selektorů je tak velice malá a metoda je cenově dostupná.

Přídavek opticky aktivní molekuly (chirálního selektoru) do mobilní fáze umožňuje chirální separaci analytů s využitím achirálních stacionárních fází v reverzním separačním módu. Interakce chirálních selektorů s chirálními analyty usnadňuje tvorbu dočasných diastereomerů, které vykazují odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, a reagují odlišným způsobem s achirální stacionární fází a organickou mobilní fází. Takto dochází k odlišnému mechanismu separace ve srovnání se separací na chirálních stacionárních fázích. Nevýhodou přídavku chirálních selektorů do MP je nízká kompatibilita s detekčními technikami, které jsou založeny na detekci aerosolů, hlavně ESI-MS.

Ačkoli je nano-LC s přidavkem chirálních selektorů do mobilní fáze účinnou a levnou separační metodou, do dnešní doby bylo s využitím této metody publikováno pouze několik prací zaměřených na separaci nesteroidních protizánětlivých léčiv.

S použitím monolitické kolony a přídavku HP- $\beta$ -CD do mobilní fáze byl chirálně rozlišen naproxen a ibuprofen.<sup>36</sup> Typ stacionární fáze hraje také významnou roli při použití chirálních selektorů jako přídavku do mobilní fáze. Rocco a kol. zkoumali vliv stacionární fáze na chirální separaci kyselých protizánětlivých léčiv za použití CMPA. Nejlepších výsledků dosáhli při použití 3  $\mu$ m RP-18 a mobilní fáze sestávající se z 30 mM koncentrace heptakis-(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -CD (TM- $\beta$ -CD) v 30 % (v/v) acetonitrilu (ACN) při pH 3.<sup>37</sup> Healy a kol. vyvinuli metodu pro separaci směsi *R,S*-

naproxenu, která byla využita pro kontrolu enantiomerní čistoty komerčních tablet naproxenu. Při optimálních podmínkách pro separaci obsahovala mobilní fáze 20 % ACN v 50 mM acetátovém pufru pH 3, obsahující 20 mM koncentraci methyl- $\beta$ -CD. Pro úpravu pH pufru byla využita HCl. Detekce probíhala pomocí UV-detektoru při vlnové délce 232 nm.<sup>38</sup>

Nano-LC s využitím CMPA má také výhodu ve vyšší flexibilitě kontroly separačního procesu. Při separaci s použitím chirálních stacionárních fází je koncentrace aktivních míst konstantní. S využitím CMPA je možné separační proces „vylepšit“ z pohledu selektivity, retence tvaru chromatografických píků tím, že budeme upravovat koncentraci CS přidávaného do MP a tím zvyšovat, či snižovat množství aktivních míst. Mimoto je achirální kolona s reverzní stacionární fází mnohem stabilnější oproti chirální koloně a zkracuje se doba potřebná pro kondicionaci kolony. Ve srovnání s CE pak nano-LC umožňuje nadávkovat vyšší množství vzorku pro separaci se zachováním vysoké selektivity, citlivosti a s uspokojivými retenčními parametry.

Cílem této práce je vývoj nano-LC metody pro separaci stereoisomerů flavanonů a FGs, která kombinuje achirální RP kolonu a derivatizované  $\beta$ -CD jako chirální aditiva do mobilní fáze. V této práci je zkoumán vliv složení MP a druh a koncentrace chirálních selektorů na chirální separaci enantiomerů a diastereomerů flavanonů, resp. FGs. Vyvinutá nano-LC metoda je dále aplikována na analýzu některých diastereomerů FGs v čerstvě připravených a komerčně dostupných citrusových džusech.



## 3. Experimentální část

### 3.1. Použité chemikálie

Acetonitril (ACN) (HPLC – gradient grade), methanol (MeOH) (HPLC – gradient grade), kyselina octová (96 %) a chlorovodíková (37 %), hydroxid amonný (30 %), hydroxid sodný (p. a.) byly zakoupeny od Carlo Erba (Milán, Itálie). Ultračistá, dvakrát destilovaná voda - VWR (International, PBI, Milán, Itálie); eriodictyol, naringenin, hesperetin, eriocitrin – Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); naringin a hesperidin – Aldrich (Steinheim, Německo), narirutin – Extrasynthese (Genay, Francie); karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin a sulfobutylether- $\beta$ -cyklodextrin – Cyclolab Ltd. (Budapešť, Maďarsko).

Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním daného analytu v MeOH a jeho naředěním na koncentraci 1 mg/ml a uchovávány při +4 °C. Hesperidin byl rozpuštěn ve směsi 1 M HCl/MeOH (50:50, v/v). Pracovní standardní roztoky analytů (50 mg/ml) byly připraveny ve směsi voda/MeOH (75:25, v/v). Pufry (500 mM), které tvořily acetát sodný a amonný byly připraveny rozpuštěním daného množství kyseliny octové ve vodě a úpravou pH na požadovanou hodnotu pomocí hydroxidu sodného, resp. amonného. Pro analýzu se používaly roztoky standardů denně připravované ze zásobních roztoků.

Denně byla rovněž připravována čerstvá mobilní fáze, která vznikla smísením MeOH/ACN, cyklodextrinů, odpovídajícího množství 500 mM acetátového pufru pH 3 a ultračisté vody.

### 3.2. Instrumentace

Nano-LC experimenty byly prováděny na přístroji, který byl sestaven v laboratoři. Chromatograf se sestával z konvenční HPLC gradientové pumpy Spectra System P2000, vakuového membránového degaséru Spectra System SCM1000, UV/VIS detektoru Spectra Focus PC1000 (vše od Thermo Separation Products, San Jose, CA, USA). Pro zavedení analytů do systému se využívalo nano injektoru Sepaserve GmbH (Munster, Německo). Detekce signálů byla prováděna při 205 nm a sběr dat byl kontrolován v softwaru Clarity™ Chromatography (DataApex, České republiky). Splitter ve tvaru písmene “T”, který se využíval k dosažení průtoku v řádech nl/min, byl taktéž

sestrojen v laboratoři. Tento se skládal z nerezové „T“ spojky (VICI Valco, Houston TX, USA), která byla připojena k vysokotlaké pumpě a injektoru pomocí dvou nerezových kapilár o vnitřním průměru (id) 500  $\mu\text{m}$  o délce 50 cm a 5 cm. Třetí vstup do „T“ spojky byl připojen k rezervoáru MeOH nacházejícím se ve vysokotlaké pumpě pomocí křemenné kapiláry o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a délce 50 cm, což umožňovalo recyklaci organického rozpouštědla. Kapilární kolona pak bylo přímo připojena k modifikovanému injektoru, který byl opatřen 50  $\mu\text{m}$  smyčkou.

Nástřik vzorku byl proveden manuálně. Vzorek byl dávkován na kolonu po dobu 30 sekund a následně byla smyčka naplněna mobilní fází. Průtoková rychlost byla určena připojením 10  $\mu\text{l}$  stříkačky (Hamilton, NV, USA) ke kapilární koloně pomocí teflonové trubice a měřením objemu mobilní fáze po dobu 5 min. Při optimalizovaných podmínkách byla nastavena průtoková rychlost na 600 nl/min.

### 3.3. Příprava kapilárních kolon

Kapilární kolony pro nano-LC byly připraveny plněním suspenze stacionární fáze do křemenných kapilár způsobem již dříve popsáným.<sup>35, 39</sup> Používaly se křemenné kapiláry o vnitřním průměru 100  $\mu\text{m}$ , vnějším průměru (od) 375  $\mu\text{m}$  a délce 50 cm, které byly zakoupeny od Composite Metal Services (Hallow, UK). Konec kapiláry byl připojen k předkolonce o délce 10 cm a id 4,1 mm, která sloužila jako rezervoár suspenze, obsahující částice stacionární fáze Varian C 18 o velikosti 3  $\mu\text{m}$ . Druhý konec byl připojen k mechanické fritě Valco (Houston, TX, USA), aby nedocházelo k vymývání stacionární fáze. Několik miligramů stacionární fáze bylo suspendováno v malém množství acetonu a naplněno do křemenné kapiláry pomocí LC pumpy Perkin Elmer (Palo Alto, CA, USA) na požadovanou délku separačního lože (15 nebo 25 cm). Po naplnění byla kolona promyta vodou (30 min) a následně roztokem NaCl (10 min), aby došlo k odstranění organického rozpouštědla a mohla být vytvořena vstupní a výstupní frity. Frity byly vytvořeny slinutím částic uvnitř kapiláry žhaveným vláknem o teplotě 700 °C po dobu 8 s. Detekční okénko bylo vytvořeno odstraněním vrstvy polyimidu přibližně 2 cm od výstupní frity.

Na začátku každého dne byla kapilární kolona nejprve vypláchnuta vodou po dobu 15 min, následně promyta mobilní fází bez cyklodextrinů (15 min) a nakonec

kondiciována mobilní fází s přidáním chirálním selektorem po dobu 15 min. Takto byla kolona připravena k analýzám.

### 3.4. Příprava vzorků

Komerčně dostupné citrusové džusy (citronový, pomerančový, grepový) a čerstvé citróny byly zakoupeny v supermarketech v Římě. FGs byly extrahovány z komerčních a čerstvě připravených citrusových džusů pomocí SPE s využitím Sep-Pak C18 kolonek (Waters, Milford, MA, USA). Byl použit dříve publikovaný postup <sup>21</sup>, jen s drobnými úpravami.

SPE kolona byla před extrakcí kondiciována 2 ml MeOH a 2 ml ultračisté vody. 1 ml vzorku (citrusového džusu) byl nadávkován na SPE kolonku, a ta byla následně promyta 2 ml vody. Analyt, který se takto zachytil na stacionární fázi, byl následně eluován 1 ml MeOH a takto získaný extrakt byl odpařen do sucha pomocí dusíku. Odparek byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l 25 % vodného roztoku MeOH (v/v) a odstředěn. Supernatant byl rozředěn 25 % vodným roztokem MeOH (1:8, v/v) a připraven k nano-LC analýze.

## 4. Výsledky a diskuze

Flavonoidy, jakožto analyty podrobené nano-LC separaci, která využívá achirální kapilární kolonu s reverzní fází a chirální aditiva v mobilní fázi, podléhají během chromatografického procesu řadě interakcí ovlivňující výslednou separaci. Mezi nimi jsou významné interakce i) s CD adsorbovanými na povrchu stacionární fáze, ii) s CD rozpuštěnými v mobilní fázi a iii) s achirální stacionární fází a mobilní fází. <sup>40</sup> Následující část je věnována optimalizaci nano-LC separace aglykonů a flavanon-7-*O*-glykosidů. Pro optimalizaci nano-LC separace byl sledován efekt druhu a koncentrace organického rozpouštědla v mobilní fázi, složení použitého pufru a jeho pH a koncentrace CD v mobilní fázi. Pozornost byla zaměřena také na délku kapilární kolony a průtokovou rychlost mobilní fáze. Při optimalizaci byla brána v úvahu i délka analýzy (retence analytů).

## 4.1. Chirální separace aglykonů flavanonů

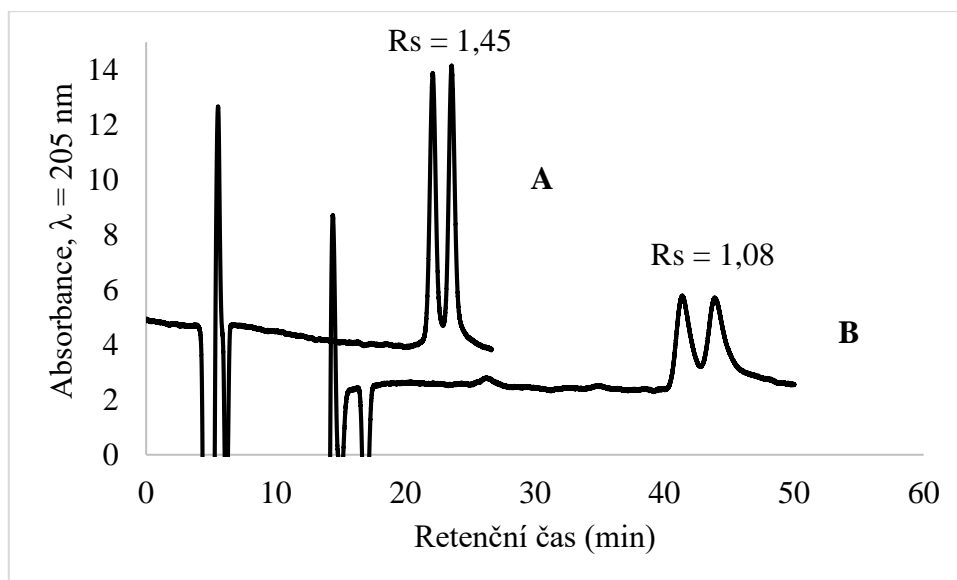
S ohledem na předchozí zkušenosti a data z literatury, byly pro chirální separace flavanonů zvoleny nabitě cyklodextriny, a to CM- $\beta$ -CD a SBE- $\beta$ -CD. Tyto dva druhy cyklodextrinů vykazovaly dobrou stereoselektivitu u vybraných flavanonů při experimentech prováděných v kapilární elektroforéze.<sup>41, 42</sup> Pro počáteční experimenty se rovněž vycházelo z podmínek vhodných pro separaci kyselých protizánětlivých léčiv pomocí nano-LC dříve publikovaných v pracích.<sup>37, 38</sup> Bylo využito obdobné mobilní fáze, která obsahovala 50 mM acetátový pufr pH 3 ve 25 % ACN. Separace probíhala v kapilární koloně (o délce 25 cm a id 100  $\mu$ m id), která byla naplněna stacionární fází Varian C 18 s částicemi o velikosti 3  $\mu$ m. Pro počáteční experimenty se využívalo CM- $\beta$ -CD, a jeho koncentrace byla nastavena na 60 mM. Prvotní experimenty umožnily částečné rozdělení enantiomerů eriodictyolu a naringenu (rozlišení ( $R_s$ ) 1,1) a rozdělení enantiomerů hesperetinu na základní linii ( $R_s$  1,5).

Úspěšné separace analytů pomocí CD se obvykle dosahováno při použití nízkého obsahu organického rozpouštědla v mobilní fázi, které interaguje s kavitou cyklodextrinu a solvuje analyt, čímž se snižuje afinita analytů k CD. Selektivita separace je pak významně ovlivněna zvoleným organickým rozpouštědlem. Bylo prokázáno, že použití MeOH namísto ACN významně zvýšilo účinnost separačního procesu a bylo dosaženo lepšího chirálního rozlišení. Tento jev je podpořen skutečností, že ACN je méně polárním rozpouštědlem oproti MeOH a vykazuje vyšší afinitu ke kavitě CD. MeOH, který je polárnějším rozpouštědlem, má díky své amfiprotní povaze slabší vytěšňovací účinek, který upřednostňuje tvorbu inkluzního komplexu mezi analytem a kavitou CD.<sup>33, 43</sup> MeOH navíc moduluje polární interakce, jako jsou vodíkové vazby a iontové interakce, které mohou napomáhat k chirálnímu rozlišení analytů.<sup>44</sup> Volba organického rozpouštědla ovlivnila potřebnou koncentraci CD pro nano-LC experimenty: methanol umožňoval rozpuštění většího množství CD a jak uvedeno výše, má menší afinitu hydrofobní kavitě CD, což se projevilo snížením koncentrace CD potřebné pro separaci flavanonů na základní linii oproti acetonitrilu. Separace flavanonů na základní linii s využitím ACN vyžadovala 60 mM CD, zatímco při použití MeOH byla dostatečná koncentrace CD 40 mM. Pro následné analýzy byl tedy využit MeOH.

Ačkoli bylo zjištěno, že pro vybrané separace je nejvhodnějším organickým rozpouštědlem methanol, i s jeho použitím bylo dosaženo poměrně nízké účinnosti chirální separace vlivem dlouhých retenčních časů jednotlivých analytů (např. hesperetin

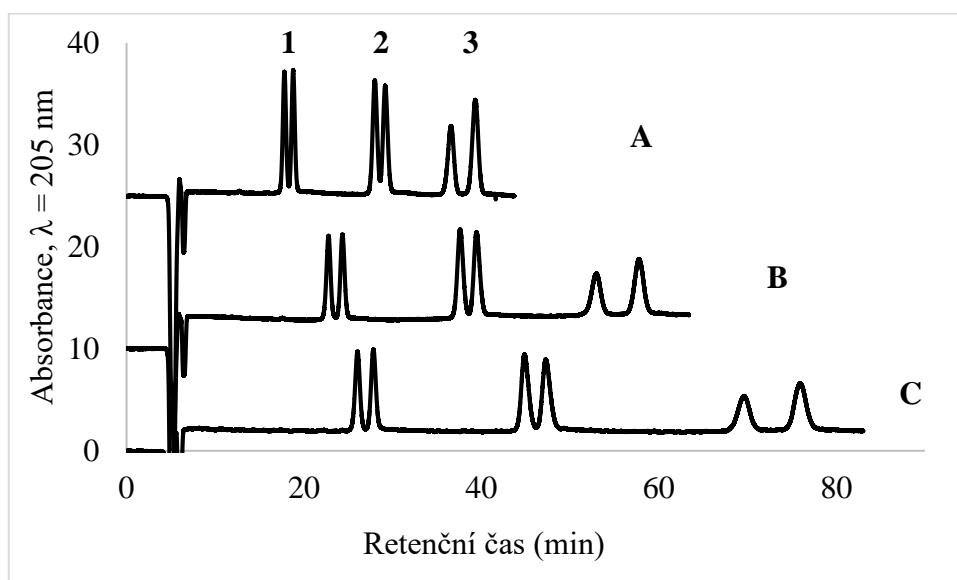
byl separován na své enantiomery během 80 min). Z toho důvodu byla zvolena kratší kapilára (100  $\mu\text{m}$  id. x 15 cm), která umožnila rychlejší analýzy a vyšší separační účinnost oproti kapilární koloně o délce 25 cm a 100  $\mu\text{m}$  id. Tím došlo ke snížení koncentrace CD potřebné pro úspěšnou separaci na 20 mM vedoucí k dalšímu snížení nákladů jak z pohledu spotřeby použitých cyklodextrinů, tak spotřeby mobilní fáze.

Rozdíly uvedené výše je možno detailněji popsat na příkladu separace enantiomerů eriodictyolu. Při použití 25 cm kolony byly enantiomery eriodictyolu úspěšně rozděleny ( $R_s$  1,08) při použití 40 mM koncentrace CM- $\beta$ -CD za 50 min. Při snížení koncentrace CM- $\beta$ -CD na 20 mM byl eriodictyol rozdělen pouze částečně ( $R_s$  0,95). Při použití 15 cm kolony pak bylo dosaženo rozlišení 1,45 za dobu kratší než 30 min již při použití nižší koncentrace CM- $\beta$ -CD (20 mM). Obr. č. 5 ukazuje separaci eriodictyolu na základní linii, přičemž v analýze A proběhla separace do 30 min s použitím 20 mM CM- $\beta$ -CD při separaci na koloně o délce 15 cm, zatímco v případě B trvala separace eriodictyolu 50 min a vyžadovala 40 mM CM- $\beta$ -CD na koloně o délce 25 cm. Je patrné, že rozdíly v účinnostech dosažených na různě dlouhých kolonách jsou pro enantioseparaci eriodictyolu flavonoidů podstatné. Podobné rozdíly byly pozorovány i u ostatních flavonoidů.



**Obrázek č. 5.** Separace enantiomerů eriodictyolu za použití A) 20 mM CM- $\beta$ -CD a 15 cm kapilární kolony; B) 40 mM CM- $\beta$ -CD a 25 cm kapilární kolony. Složení mobilní fáze: daná koncentrace CM- $\beta$ -CD v 30 % (v/v) MeOH v 50 mM acetátovém pufru pH 3; UV detekce při 205 nm; průtoková rychlost 400 nl/min, doba nástřiku 30 s.

Dále byl studován vliv koncentrace MeOH na separaci enantiomerů aglykonů flavanonů. Procentuální obsah MeOH v mobilní fázi byl sledován v rozmezí 25 – 35 % (v/v). Obr. č. 6 ukazuje, že se zvyšováním obsahu MeOH v mobilní fázi se snižovala jak retence všech tří zkoumaných analytů, tak jejich schopnost separace na jednotlivé enantiomery. Snižující se rozlišení jednotlivých enantiomerů flavanonů souvisí se „soupeřením“ MeOH s analyty o tvorbu inkluzních komplexů s CD a jednak se solvatací analytů tímto rozpouštědlem. Při obsahu 30 % MeOH v mobilní fázi bylo dosaženo nejlepšího chirálního rozlišení všech zkoumaných analytů. Při snížení obsahu MeOH v MF (20 %) sice byly jednotlivé enantiomery částečně rozděleny, nicméně dochází k rozšiřování píků (snižování účinnosti) a prodlužování retenčních časů.



**Obrázek č. 6.** Chirální separace aglykonů flavanonů. Kapilární kolona (100  $\mu\text{m}$  id) naplněna na délku 15 cm; mobilní fáze: 50 mM acetátový pufr pH 3 s různou koncentrací MeOH: (A) 35 %, (B) 30 %, (C) 25 %, obsahující 20 mM CM- $\beta$ -CD; UV detekce při 205 nm, průtoková rychlost 400 nl/min; doba nástřiku 30 s; (1) eriodictyol, (2) naringenin, (3) hesperetin.

Významná byla také koncentrace použitého acetátového pufru a jeho pH, které ovlivňovaly významně jak chirální separaci, tak retenci zkoumaných analytů. Za konstantního obsahu MeOH v mobilní fázi (30 %, v/v) byl studován vliv koncentrace acetátového pufru mezi hodnotami 10 – 75 mM. Bylo zjištěno, že různá koncentrace pufru ovlivňuje chirální rozlišení jednotlivých flavanonů. Optimální koncentrace byla 50 mM,

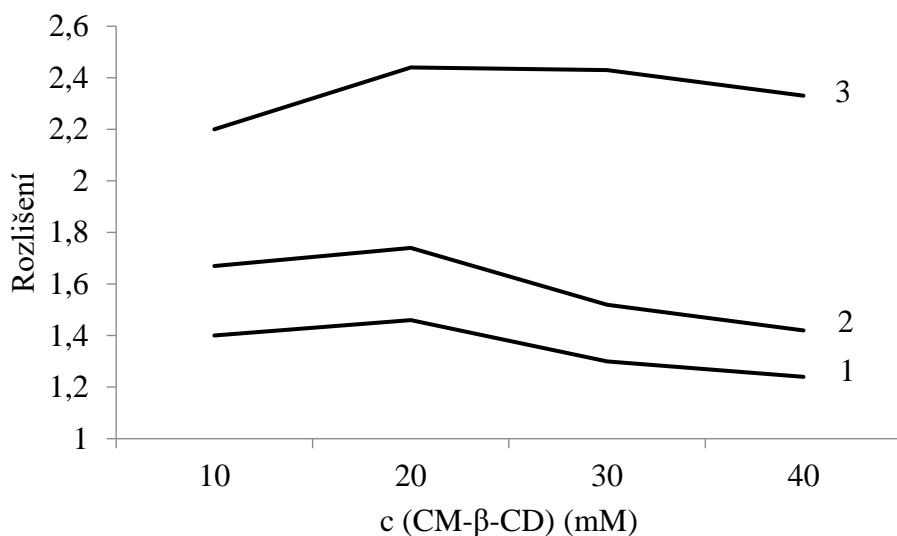
kdy hodnoty  $R_s$  u eriodictyolu, naringeninů a hesperetinu dosahovaly hodnot 1,4; 1,5 a 2,4. Nižší a vyšší koncentrace acetátového pufru pouze způsobila zhoršení rozlišení a tvar píků.

Namísto acetátového pufru byl použit také pufr amonný o stejné koncentraci (50 mM), což přineslo snížení retence jednotlivých flavanonů a současně snížení enantiorozlišovacích schopností. Ztráta rozlišení jednotlivých enantiomerů nastala pravděpodobně díky tomu, že  $\text{NH}_4^+$  ionty snižují schopnost tvorby vodíkových vazeb a interakcí dipól-dipól, které při úspěšné separaci působí mezi analyty a CD.<sup>45</sup>

Dalším parametrem byla hodnota pH pufru, která byla zkoumána v oblasti 3-7. K současné chirální separaci všech tří flavanonů došlo při pH 3. Zvyšováním pH na hodnotu 5 došlo k významnému snížení retence jednotlivých analytů spolu se snížením schopnosti jednotlivé enantiomery rozlišit. Naringenin nebylo možné při pH 5 ani při pH 7 vůbec na enantiomery rozdělit. Při zvýšení pH na hodnotu 7 zůstaly hodnoty  $R_s$  u všech analytů konstantní a nedošlo k další ztrátě rozlišovací schopnosti.

Při pH 3 se CM- $\beta$ -CD vyskytuje v protonované formě díky tomu, že jeho hodnota  $pK_a$  se nachází v rozmezí 5-7. Flavanony (hodnoty  $pK_a$  7-9), které mají ve své struktuře velké množství hydroxylových skupin, mají charakter slabých kyselin a mohou se vyskytovat v nabitě formě při pH vyšším než 5. Interakce mezi analyty a CD jsou tedy silnější při pH 3 a dochází k chirálnímu rozlišení těchto flavanonů, což je v souladu s naměřenými údaji. Při pH vyšším než 3 (nano-LC experimenty při pH 5 a výše) byla významně zhoršena schopnost separace enantiomerů flavanonů díky částečnému negativnímu náboji jak na povrchu CD, tak u jednotlivých analytů.

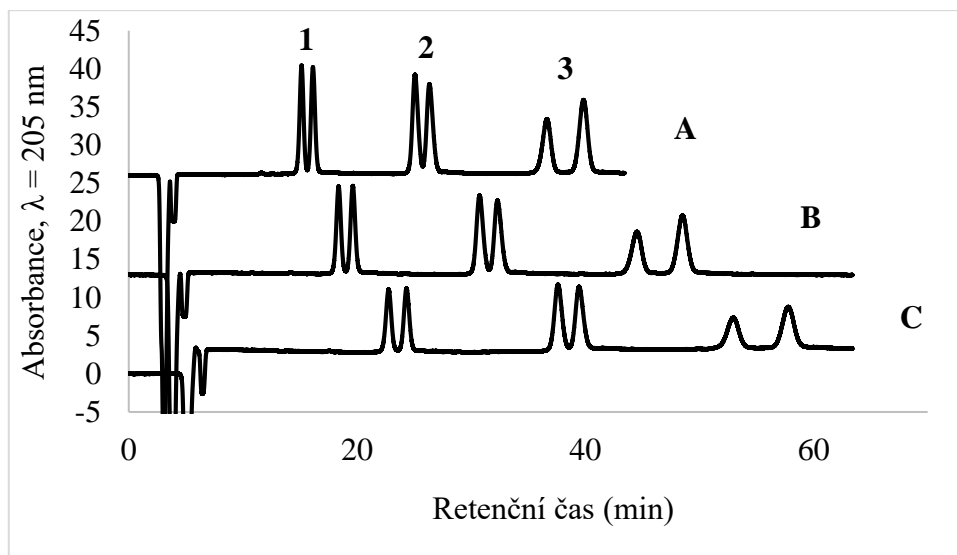
Další optimalizovaným parametrem nano-LC separace flavanonů byla koncentrace CM- $\beta$ -CD. Koncentrace chirálního selektoru významně ovlivňuje jak retenci analytů, tak schopnost jejich chirálního rozlišení. Koncentrace použitých CD byla zkoumána v rozmezí 10 – 40 mM. Nejlepšího rozlišení jednotlivých enantiomerů eriodictyolu, naringeninů a hesperetinu bylo dosaženo při použití 20 mM CM- $\beta$ -CD. Zvyšování koncentrace CD v mobilní fázi na vyšší hodnoty vedlo pouze ke snižování schopnosti jednotlivé enantiomery rozdělit, viz obr. 7.



**Obrázek 7.** Vliv koncentrace CM-β-CD na chirální separaci (1) naringenin, (2) eriodictyolu a (3) hesperetinu. Kapilární kolona (100 μm id x 15 cm), podmínky separace: mobilní fáze: 50 mM acetátový pufr pH 3 v 30 % MeOH (v/v), obsahující 10 – 40 mM CM-β-CD; průtoková rychlost 400 nl/min, doba nástřiku 30 s.

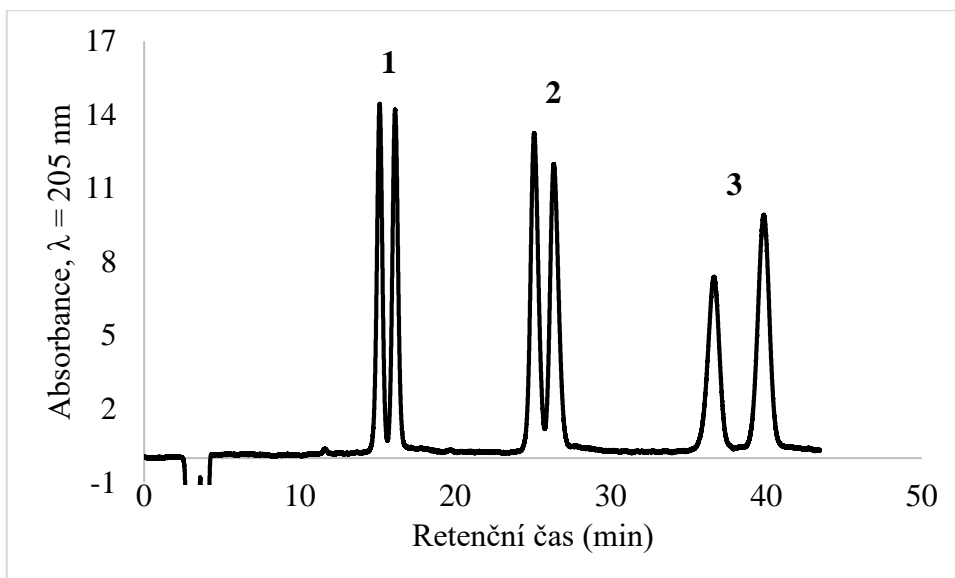
Všechny předchozí experimenty byly prováděny při průtokové rychlosti 400 nl/min. Za účelem urychlení nano-LC experimentů byly sledovány možnosti zvýšení průtokové rychlosti. Při průtokové rychlosti 600 nl/min došlo sice k nepatrnému snížení rozlišovací schopnosti, nicméně bylo dosaženo významného zkrácení doby analýzy – všechny tři flavanony byly chirálně rozlišeny za dobu kratší než 45 min. Obr. č. 8 ukazuje vliv průtokové rychlosti při nano-LC experimentech na rozlišení analytů a dobu této separace.





**Obrázek č. 8.** Vliv průtokové rychlosti na nano-LC separaci aglykonů flavanonů. Kapilární kolona 100  $\mu\text{m}$  id naplněna na délku 15 cm; mobilní fáze: 50 mM acetátový pufr pH 3 v 30 % MeOH (v/v), obsahující 20 mM CM- $\beta$ -CD; UV detekce při 205 nm, průtoková rychlost (A) 400 nl/min, (B) 500 nl/min, (C) 600 nl/min; doba nástřiku 30 s; (1) eriodictyol, (2) naringenin, (3) hesperetin.

Separaci za optimálních podmínek pro chirální separaci eriodictyolu, naringeninu a hesperetinu popisuje obr. č. 9. Tabulka č. 1 shrnuje parametry nano-LC separace.



**Obrázek č. 9.** Optimální podmínky pro nano-LC separaci aglykonů flavanonů. Podmínky separace: stejné jako na obr. 8; průtoková rychlost 600 nl/min; (1) eriodictyol, (2) naringenin, (3) hesperetin.

**Tabulka č. 1.** Výsledky nano-LC separace vybraných flavanonů za optimálních podmínek.

Analyt	$t_1$	$k_1$	$t_2$	$k_2$	$\alpha$	$R_s$
Eriodictyol	14,44	4,66	16,14	5,33	1,43	1,49
Naringenin	25,04	8,82	26,33	9,33	1,06	1,29
Hesperetin	36,66	13,38	39,90	14,65	1,09	2,28

Podmínky separace viz obr. č. 8;  $t_1$  ( $t_2$ ), retenční čas prvního (druhého) diastereomeru analytu;  $k_1$  ( $k_2$ ), kapacitní faktor prvního (druhého) diastereomeru analytu;  $\alpha$ , separační faktor (selektivita).

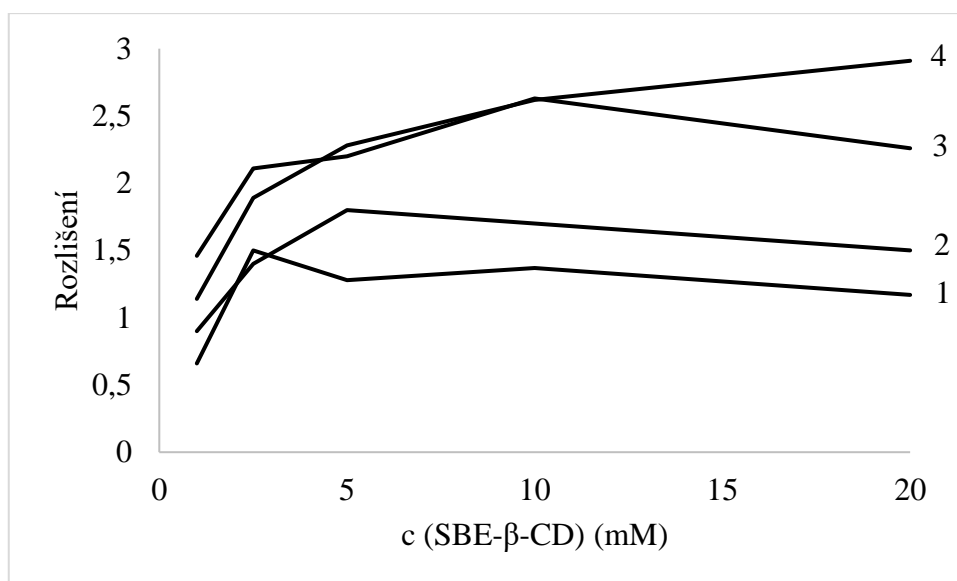
Účinnost nano-LC metody je vyjádřena jako počet teoretických pater na metr chromatografické kolony ( $n$ ). Počet teoretických pater byl stanoven na 76500, 68620 a 54120 N/m pro první enantiomer eriodictyolu, naringeninu a hesperetinu.

## 4.2. Diastereomerní separace FGs

Metoda, která byla vyvinuta pro enantiomerní separaci flavanonů, byla použita jako odrazový můstek optimalizace metody pro diastereomerní separaci FGs. Pro následující separace byly vybrány: eriocitrin, naringin, narirutin a hesperidin. Mobilní fáze, při které docházelo k separaci enantiomerů aglykonů, neumožňovala diastereomerní separaci vybraných FGs, s výjimkou naringinu, který se však podařilo rozdělit pouze částečně.

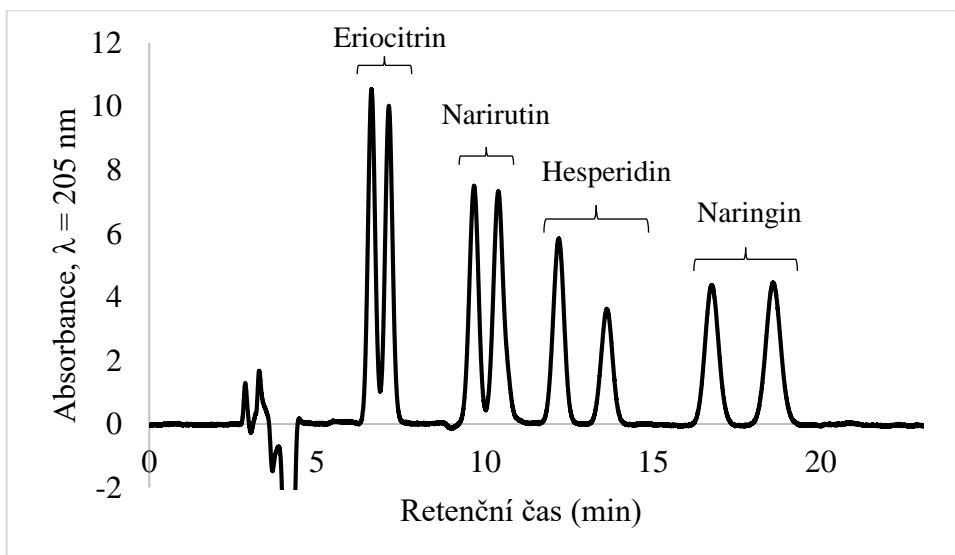
V literatuře byla již popsána CE separace některých FGs s využitím SBE- $\beta$ -CD jako aditiva základního elektrolytu.<sup>21</sup> Možnosti SBE- $\beta$ -CD byly proto studovány i v této nano-LC studii. Složení mobilní fáze bylo pro další analýzy ponecháno stejné jako v předchozí studii (50 mM acetátový pufr pH 3 v 30 % MeOH, v/v) a byla optimalizována koncentrace SBE- $\beta$ -CD v rozmezí 1 – 20 mM.

Při koncentraci 2,5 mM SBE- $\beta$ -CD bylo dosaženo separace na základní linii u diastereomerů naringinu a hesperidinu ( $R_s$  1,8, resp. 2,2), zatímco rozlišení eriodictyolu a narirutinu bylo nižší než 1,5. Zvyšováním koncentrace SBE- $\beta$ -CD obecně docházelo ke zvyšování rozlišovací schopnosti diastereomerů hesperidinu a naringinu, zatímco u eriocitrinu a narirutinu docházelo postupně k jejímu snižování, viz obr. 10.



**Obrázek 10.** Optimalizace koncentrace SBE-β-CD pro enantioseparaci jednotlivých FGs: (1) eriocitrin, (2) narirutin, (3) hesperidin, (4) naringin. Kapilární kolona (100 μm id, délka 15 cm), podmínky separace: mobilní fáze: 50 mM acetátový pufr pH 3 v 30 % MeOH (v/v), obsahující 1 – 20 mM SBE-β-CD; UV detekce při 205 nm; průtoková rychlost 600 nl/min, doba nástřiku 30 s.

Při nízkých koncentracích SBE-β-CD však měly jednotlivé analyty dlouhé retenční časy, například separace naringinu na základní linii ( $R_s$  1,8) proběhla při koncentraci 2,5 mM CD během 50 min. Zvyšování koncentrace SBE-β-CD pak vedlo ke snižování retenčních časů FGs. Kompromisem mezi vysokým rozlišením diastereomerů jednotlivých FGs a přiměřenou dobou analýzy, bylo použití 10 mM koncentrace SBE-β-CD, kdy všechny studované FGs byly stereoselektivně rozděleny během 20 minut. Chromatogram této separace je znázorněn na obr. č. 11.



**Obrázek č. 11.** Diastereomerní separace studovaných FGs. Mobilní fáze obsahovala 10 mM SBE- $\beta$ -CD, ostatní podmínky separace jsou stejné jako u obr. 10.

Porovnáním nano-LC metody využívající chirální aditiva mobilní fáze, která byla v této práci vyvinuta, s metodami, využívajícími pro separaci chirální kolony, <sup>33, 34, 35</sup> bylo v předložené práci dosaženo vyšších hodnot  $R_s$  při kratších časech analýz, se zachováním vysoké účinnosti separace. Stereoselektivní separace vybraných FGs pak trvá kratší dobu, protože (i) není potřeba připravovat chirální kapilární kolony (pro přípravu frity na chirální koloně, obsahující CD, je potřeba většího množství kroků, na rozdíl od přípravy frity u kolony naplněné C18), (ii) doba kondicionace kolony naplněné C18, využívající chirální selektor v mobilní fázi je kratší a (iii) syntéza chirální stacionární fáze je časově náročná. <sup>36</sup>

Pokud je nám známo, nebyla dosud vyvinuta HPLC metoda pro diastereomerní separace FGs během jediné analýzy. Jak již bylo zmíněno v úvodu, Aturki a kol. vyvinuli HPLC metodu pro stanovení několika FGs v citrusovém džusu během jediné analýzy, avšak za použití dvou různých chromatografických kolon. <sup>30</sup> Optimalizace metody zahrnovala náročnou studii, zabývající se výběrem mobilní fáze, která je kompatibilní s oběma použitými kolonami, což mělo za následek dlouhé časy analýzy. Srovnáním vyvinuté nano-LC metody v této práci s CE, která byla publikována dříve <sup>21</sup>, vyvinutá nano-LC metoda umožňuje vyšší selektivitu separace diastereomerů čtyř vybraných FGs během jediné analýzy díky různým mechanismům separace (výše popsáným), zatímco v CE dochází ke ko-migraci párů eriocitrin-naringin a narirutin-hesperidin. Mimo vysoké

selektivity separace umožňuje nano-LC nadávkování vyššího množství vzorků k analýze, což vede k vysoké citlivosti separace.

### 4.3. Validace nano-LC metody

Práce, dostupné ve vědecké literatuře, které jsou zaměřené na stanovení flavonoidů v citrusových džusech, prokázaly přítomnost majoritního množství FGs oproti aglykonovým formám, které vznikají při biosyntéze.<sup>12</sup> Přítomnost FGs v citrusových džusech pak může být využívána jako marker pro charakterizaci džusů na poli kvality a bezpečnosti těchto produktů.<sup>30</sup> Z toho důvodu byla provedena částečná validace vyvinuté nano-LC metody.

Byly ověřeny validační parametry vyvinuté nano-LC metody pro diastereomerní separaci FGs, mezi které patří opakovatelnost (krátkodobá a dlouhodobá přesnost), kolonová reprodukovatelnost, citlivost (mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ)), linearita a s ní související korelační koeficienty.

Opakovatelnost metody (krátkodobá a dlouhodobá přesnost), vyjádřena jako RSD % retenčních časů ( $t_r$ ) a plochy píků (A) obou diastereomerů, byla ověřena hodnocením šesti měřeními standardního roztoku FGs o koncentraci 50  $\mu\text{g/ml}$  během jednoho dne (krátkodobá) a čtyřmi měřeními v různých dnech (dlouhodobá). Hodnoty RSD % pro retenční časy ( $t_r$ ) byly nižší než 2,7 a 4,5 % u krátkodobé, resp. dlouhodobé přesnosti a přijatelné byly rovněž hodnoty RSD % ploch píků (<5,7 %, resp. 7 %), jak je uvedeno v tabulce č. 2.

S použitím tří různých kapilárních kolon, které byly naplněny shodným způsobem a shodnou stacionární fází, byla hodnocena kolonová opakovatelnost, kdy RSD % retenčních časů byla nižší než 5,2 % a pro plochu píků nižší než 8,9 % při separaci FGs. Na jedné kapilární koloně pak bylo možné provést více než 250 analýz, včetně experimentů využívajících reálných vzorků.

Citlivost nano-LC metody byla stanovena jako LOD a LOQ, které se udávají jako trojnásobek, resp. desetinásobek poměru signál/šum. Meze detekce a kvantifikace každého diastereomeru byly stanoveny v rozmezí 1,3 – 2,5, resp. 7,5 – 12,5  $\mu\text{g/ml}$ . Linearita metody byla hodnocena v rozmezí LOQ a 50  $\mu\text{g/ml}$ , stanovením šesti koncentračních hladin pro každý analyt, a každé měření bylo provedeno dvakrát. Kalibrační křivky byly stanoveny vynesáním relativních ploch píků jako funkci

koncentrace analytu. Zjištěné korelační koeficienty  $R^2$  se pohybovaly v rozmezí 0,9918 – 0,9967 a poukazují na akceptovatelnou linearitu nano-LC metody. Tyto validační parametry jsou uvedeny v tabulce č. 2.

**Tabulka č. 2.** Validační parametry nano-LC metody.

Analyt	Krátkodobá opakovatelnost ( <i>n</i> = 6) RSD%				Dlouhodobá opakovatelnost ( <i>n</i> = 12) RSD%				LOD (µg/mL)*	LOQ (µg/mL)*	Rovnice lineární regrese		Korelační koeficienty $R^2$	
	<i>tr</i> <sub>1</sub>	<i>tr</i> <sub>2</sub>	( <i>A</i> <sub>1</sub> )	( <i>A</i> <sub>2</sub> )	<i>tr</i> <sub>1</sub>	<i>tr</i> <sub>2</sub>	( <i>A</i> <sub>1</sub> )	( <i>A</i> <sub>2</sub> )			Diastereomer (1)	Diastereomer (2)	$R^2_1$	$R^2_2$
Eriocitrin	1,31	1,55	3,48	3,03	2,51	2,96	7,46	7,45	1,3	7,5	y= 4,503x-17,531	y= 4,547x-18,619	0,9913	0,9904
Narirutin	1,93	2,08	4,43	3,90	3,95	4,53	7,6	7,11	2,5	7,5	y= 4,3305x-16,209	y= 4,5741x-26,159	0,9948	0,9967
Hesperidin	1,55	1,80	5,26	5,70	3,91	4,32	7,87	7,70	2,5	12,5	y= 4,0545x-25,325	y= 2,4711x-6,8307	0,9945	0,9908
Naringin	2,66	2,69	4,98	5,61	3,34	3,22	7,29	7,64	2,5	12,5	y= 3,9037x-23,459	y= 3,9902x-15,905	0,9959	0,9939

\* shodné hodnoty pro oba diastereomery analytů

*t*<sub>1 (2)</sub>, retenční čas prvního (druhého) diastereomeru analytu; *A*<sub>1 (2)</sub>, plochy píků prvního (druhého) diastereomeru analytu



#### 4.4. Stanovení obsahu FGs v citrusových džusech

Vyvinutá nano-LC metoda byla aplikována na stanovení obsahu FGs v citrusových džusech. Identifikace jednotlivých FGs byla provedena porovnáním retenčních časů píků, vyskytujících se v chromatogramu jednotlivých citrusových džusů s dostupnými referenčními standardy FGs a standardního přídávku roztoků jednotlivých FGs do extraktů. Stanovovány byly pouze majoritní FGs v citrusových džusech, viz tabulka č. 3.

Příprava extraktů pro analýzu byla nejprve provedena pouhým naředěním džusů 25 % roztokem MeOH ve vodě, odstředěním po dobu 5 min a takto připravený vzorek byl nastříkovan do nano-LC systému. Úskalím této přípravy vzorku byl výskyt neznámých píků, které interferovaly s píky zkoumaných FGs, což neumožňovalo jejich dokonalou identifikaci. Proto byly citrusové džusy zbaveny interferujících látek na sloupci sorbentu SPE kolonky způsobem popsaným v sekci 3.4.

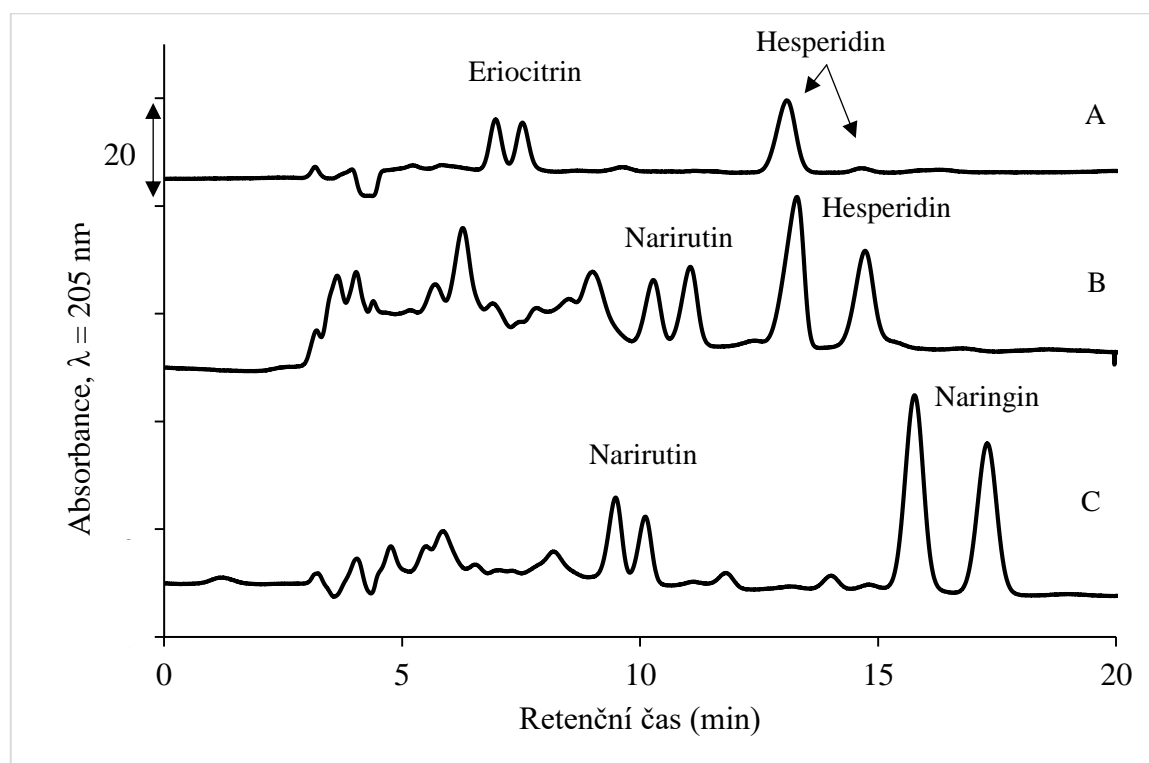
Výtěžnost SPE extrakce byla vypočítána ze standardních přídávků FGs na dvou koncentračních hladinách do komerčně dostupného citrónového džusu v rozmezí kalibrační přímky (12,5 a 50 µg/ml). Experimenty byly prováděny vždy dvakrát na obou koncentračních hladinách. Data týkající se výtěžnosti jednotlivých diastereomerů FGs v citrusových džusech, a odpovídající hodnoty RSD %, jsou uvedena v tabulce č. 3, stejně jako stanovené množství jednotlivých stereoisomerů FGs v těchto džusech.

Z tabulky č. 3 je patrné, že jak komerční, tak čerstvě připravený citrónový džus obsahoval převážně eriocitrin a hesperidin. Diastereomery eriocitrinu se v citrónovém džuse vyskytují v poměru 1:1, zatímco v případě diastereomerů hesperidinu převažuje stereomer *S* (-) hesperidin, což je ve shodě se starší relevantní literaturou.<sup>46</sup> Je na místě upozornit na skutečnost, že eluční pořadí diastereomerů hesperidinu v této práci se shoduje pořadím, které bylo pozorováno v elektroforegramu při použití stejného chirálního selektoru,<sup>41</sup> zatímco v HPLC je při použití imobilizovaného chirálního selektoru na stacionární fázi eluční pořadí diastereomerů hesperidinu opačné.<sup>46</sup> Koncentrace eriocitrinu byla ve dvou vzorcích citrónového džusu přibližně stejná, zatímco koncentrace a poměr diastereomerů hesperidinu byly ve vzorcích komerčně dostupného a čerstvě připraveného citrónového džusu odlišné. Stanovená množství eriocitrinu a hesperidinu ve vzorcích citrónového džusu jsou nicméně v souladu s daty nalezenými v literatuře.<sup>47</sup>

Komerčně dostupný grapefruitový džus je charakteristický přítomností narirutinu a naringinu, což jsou nejvíce zastoupené FGs v grapefruitu zodpovědné mimo jiné za

charakteristicky hořkou chuť tohoto ovoce. Odrůdy bílého, růžového a červeného grapefruitu mají odlišný obsah výše zmíněných FGs a jejich kvantifikace může vést ke stanovení odrůdy grapefruitu. Literatura popisuje vysokou koncentraci narirutinu a naringinu v grapefruitech <sup>48</sup> a tato práce se o tyto skutečnosti opírá (stanovené koncentrace byly 46,15 mg/100 ml pro naringin a 18,23 mg/100 ml pro narirutin).

Analýza pomerančového džusu odhalila majoritní zastoupení hesperidinu (54,47 mg/100 ml) a narirutinu (17,45 mg/100 ml). Profil FGs stanovený v extraktu pomerančového džusu je vodítkem pro určení odrůdy pomeranče. Protože v analyzovaném vzorku nebyl přítomen naringin (který je přítomen v kyselých pomerančích), profil FGs potvrzuje, že byl analyzován džus připravený ze sladkých pomerančů (*Citrus sinensis*). <sup>48</sup> Obr. č. 12 znázorňuje chromatogramy získané nano-LC analýzou extraktů citrónového, grapefruitového a pomerančového džusu po předchozí SPE purifikaci.



**Obrázek č. 12.** Nano-LC chromatogramy extraktů citrusových džusů po předchozí SPE purifikaci. (A) komerčně dostupný citrónový džus, (B) džus ze sladkého pomeranče, (C) grapefruitový džus. Mobilní fáze obsahovala 50 mM acetátový pufr pH 3 v 30 % MeOH (v/v), obsahující 10 mM SBE- $\beta$ -CD; UV detekce při 205 nm; průtoková rychlost 600 nl/min, doba nástřiku 30 s.

**Tabulka č. 3.** Výtěžnost a koncentrace vybraných flavanon-7-*O*-glykosidů v různých citrusových džusech.

Analyt	Výtěžnost (%) (n= 2)		Koncentrace flavanon-7- <i>O</i> -glykosidů v citrusových džusech (mg/100 ml) <sup>a</sup>			
	12,5 µg/ml (RSD%)	50 µg/ml (RSD%)	Citronový džus (komerčně dostupný)	Citronový džus (čerstvě připravený)	Grapefruitový džus (komerčně dostupný)	Pomerančový džus (komerčně dostupný)
Eriocitrin (1)	95,22 (3,84)	99,88 (2,54)	11,75 ± 1,80	12,37 ± 0,94	nd	nd
Eriocitrin (2)	96,86 (3,21)	98,21 (2,92)	11,34 ± 2,50	12,81 ± 1,33	nd	nd
Narirutin (1)	95,78 (4,11)	98,17 (3,11)	nd	nd	10,42 ± 2,49	7,95 ± 1,48
Narirutin (2)	94,33 (3,55)	98,81 (2,67)	nd	nd	7,81 ± 1,91	9,50 ± 2,34
Hesperidin (1)	87,47 (3,91)	94,73 (3,15)	15,24 ± 2,15	24,92 ± 2,28	nd	18,60 ± 1,95
Hesperidin (2)	85,83 (4,78)	93,87 (2,94)	nq	15,26 ± 2,73	nd	35,87 ± 3,67
Naringin (1)	92,78 (4,15)	99,68 (4,23)	nd	nd	26,11 ± 3,15	nd
Naringin (2)	89,82 (5,61)	97,25 (5,19)	nd	nd	20,04 ± 2,92	nd

1 (2), první (druhý) eluující diastereomer analytu

nd, nedetekováno

nq, nekvantifikovatelné množství

<sup>a</sup> Hodnoty vyjádřeny v mg/100 ml džusu (n = 2, hodnota = X ± RSD %)

## 5. Seznam použitých zkratek

ACN	acetonitril
CD	cyklodextrin
CE	kapilární elektroforéza
CE- $\beta$ -CD	karboxyethyl- $\beta$ -cyklodextrin
CMPA	přídavek chirálního selektoru do mobilní fáze
CM- $\beta$ -CD	karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin
CS	chirální selektor
CSP	chirální stacionární fáze
FGs	flavanon-7- <i>O</i> -glykosidy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HP- $\beta$ -CD	hydroxypropyl- $\beta$ -cyklodextrin
HP- $\gamma$ -CD	hydroxypropyl- $\gamma$ -cyklodextrin
id	vnitřní průměr
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti (kvantifikace)
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	metanol
MP	mobilní fáze
Nano-LC	nanokapalinová chromatografie
NP	normální fáze
od	vnější průměr
RP	reverzní fáze
Rs	rozlišení

RSD	relativní směrodatná odchylka
SBE- $\beta$ -CD	sulfobutylether- $\beta$ -cyklodextrin
TFA	kyselina trifluoroctová

## 6. Závěr

Byla vyvinuta nano-LC metoda umožňující stereoselektivní separace aglykonů flavanonů (eriodictyolu, naringenin a hesperetinu), která využívala achirální RP kapilární kolonu a chirální selektory, které byly přidávány do mobilní fáze. Pro separaci aglykonů flavanonů se jako chirální selektor osvědčil karboxymethyl- $\beta$ -cyklodextrin. Enantioseparace trojice aglykonů byla za optimálních podmínek dosažena za dobu kratší než 45 minut. Vyvinutá metoda byla použita jako odrazový můstek pro optimalizaci nano-LC metody pro diastereomerní separaci FGs. Nejúčinnějším chirálním selektorem pro separaci těchto analytů byl sulfobutylether- $\beta$ -cyklodextrin. Diastereomerní separace čtyř FGs (eriocitrinu, naringinu, narirutinu a hesperidinu) během jediné analýzy trvala 20 minut. Tato metoda byla dále validována, a to z pohledu opakovatelnosti, limitu detekce, limitu stanovitelnosti a linearitě s uspokojivými výsledky. Další část práce byla věnována identifikaci a stanovení majoritních FGs v citrusových džusech. Výsledky této práce byly v souladu s daty publikovanými v relevantní literatuře.

Vyvinutá nano-LC metoda je velmi citlivou a selektivní technikou a umožňuje pracovat s velmi nízkým množstvím mobilní fáze, a tedy s malým množstvím cyklodextrinu jako selektoru potřebným pro chirální separace. Výdaje spojené s náklady na chirální separace analytů pomocí nano-LC jsou nižší v porovnání s konvenčními chromatografickými technikami. Využití přísady chirálních selektorů do mobilní fáze zvyšuje flexibilitu separace a umožňuje rychlejší změny podmínek v porovnání s nano-LC metodami využívajícími kapilární kolony s chirálními stacionárními fázemi.

Data z této studie a vyvinutá analytická metoda by mohly najít uplatnění v potravinářském průmyslu k podrobnějšímu hodnocení nápojů a pokrmů a sledování chirálních látek v těchto výrobcích obsažených.

## 7. Literatura

1. Zátopková, R., Aturki, Z., Bednář, P., *J. Sep. Sci.* 43 (2020) 3382–3390.
2. Hollman, P. C. H. & Arts, I. C. W., *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1081–1093.
3. Moufida, S. & Marzouk, B., *Phytochemistry* 62 (2003) 1283–1289.
4. Bouskela, E., Cyrino, F.Z.G.A., Lerond, L., *J. Pharmacol* 122 (1997) 1611–1616.
5. Marín, F. R., Martínez, M., Uribesalgo, T., Castillo, S. & Frutos, M. J., *Food Chem.* 78 (2002) 319–324.
6. Tanaka, T. et al., *Carcinogenesis* 18 (1997) 957–965.
7. van Acker, F., *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 31–37.
8. Si-Ahmed, K. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 225–229.
9. Yáñez, J. A. & Davies, N. M., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 164–169.
10. Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H. T., Champan and Hall (1975).
11. Iwashina, T., *J. Plant Res.* 113 (2000) 287–299.
12. Harborne, J. B. Champan and Hall (1994).
13. Yáñez, J. A., Andrews, P. K. & Davies, N. M., *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 848 (2007) 159–181.
14. Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 89–122.
15. Vespalec, R. & Bocek, P., *Electrophoresis* 20 (1999) 2579–2591.
16. Gübnitz, G., *Review* 336 (2001) 291–336.
17. Ward, T. J., College, M. & Street, N. S., 74 (2002) 2863–2872.
18. Szejtli, J., *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes*, Akadémiai Kiadó, Budapest (1982).
19. Gel-Moreto, N., Streich, R. & Galensa, R., *J. Chromatogr. A* 925 (2001) 279–289.
20. Gel-Moreto, N., Streich, R. & Galensa, R., *Electrophoresis* 24 (2003) 2716–2722.
21. Aturki, Z. & Sinibaldi, M. S., *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 844–850.

22. Asztemborska, M., Miśkiewicz, M. & Sybilska, D., *Electrophoresis* 24 (2003) 2527–2531.
23. Caccamese, S., Caruso, C., Parrinello, N. & Savarino, A., *J. Chromatogr. A* 1076 (2005) 155–162.
24. Baranowska, I., Hejniak, J. & Magiera, S., *Anal. Methods* 9, (2017) 1018–1030.
25. Magiera, S. & Kwietniowska, E., *Food Chem.* 211 (2016) 227–234.
26. Krause, M., Galensa, R., *J. Chromatogr* 588 (1991) 41–45.
27. Asztemborska, M. & Zukowski, J., *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 95–100.
28. Tang, J., Pang, L., Zhou, J., Tang, W., *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 3177–3144.
29. Shuang, Y., Zhang, T. & Li, L., *J. Chromatogr. A* (2019) 460-702.
30. Aturki, Z., Brandi, V. & Sinibaldi, M., *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 5303–5308.
31. Vissers, J. P. C., Claessens, H. A. & Cramers, C. A., *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 1–28.
32. Hernández-Borges, J., Aturki, Z., Rocco, A. & Fanali, S., *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1589–1610.
33. Si-Ahmed, K. et al., *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1175–1182.
34. Si-Ahmed, K., Aturki, Z., Chankvetadze, B. & Fanali, S., *Anal. Chim. Acta* 738 (2012) 85–94.
35. Silva, M. et al., *J. Chromatogr. A* 1490 (2017) 166–176.
36. Rocco, A., Maru, A. & Fanali, S., *Anal. Bioanal. Chem.* (2012) 2935–2943.
37. Rocco, A. & Fanali, S., *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1696–1703.
38. Healy, L. O. et al., *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 459–464.
39. Fanali, S., Aturki, Z., D’Orazio, G. & Rocco, A., *J. Chromatogr. A* 1150 (2007) 252–258.
40. León, A. G., Olives, A. I., Martín, M. A. & del Castillo, B., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 57 (2007) 577–583.



41. Aturki, Z. & Sinibaldi, M., *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 844–850.
42. Wistuba, D., Trapp, O., Gel-Moreto, N., Galensa, R. & Schurig, V., *Anal. Chem.* 78 (2006) 3424–3433.
43. Mitchell, C.R., Armstrong, D.W., Gübnitz, G., Schmidt, M. G., Humana Press (2004).
44. Ng, S. C., Ong, T. T., Fu, P. & Ching, C. B., *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 31–40.
45. D’Orazio, G., Aturki, Z., Cristalli, M., Quaglia, M. G. & Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 105–113.
46. Aturki, Z., Brandi, V. & Sinibaldi, M., *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 5303–5308.
47. Peterson, J. J. et al., *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 74–80.
48. Bronner, W. E. & Beecher, G. R., *J. Chromatogr. A* 705 (1995) 247–256.