

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Fakulta přírodovědecká**

**Katedra analytické chemie**

**ANALÝZA ANTHOKYANINŮ HILIC  
CHROMATOGRafiÍ  
DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce: Markéta Ponížilová

Studijní obor: Analytická chemie

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

**Olomouc 2013**

## Souhrn

Předkládaná práce je zaměřena na analýzu anthokyaninů HILIC chromatografií. Teoretická část se věnuje barvě vína a její kontrole. Zaměřuje se na anthokyaniny jako nejrozšířenější přírodní barviva a stručně shrnuje možnosti jejich analýzy. Větší pozornost je věnována kapalinové chromatografii, u které je shrnut princip a trendy vývoje chromatografického zařízení.

Experimentální část práce je věnována vývoji metody pro analýzu anthokyaninů na monolitických kolonách v systému HILIC vhodné pro spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Optimalizovaná metoda je použita pro analýzu anthokyaninů v extraktu z červeného zelí. Výsledky jsou porovnány s výsledky analýzy stejnou metodou na částicové HILIC koloně a s výsledky analýzy generickou metodou v systému reversních fází.

Získané výsledky ukazují, že HILIC chromatografie je aplikovatelná zejména v případě, že úkolem je místo detailní analýzy anthokyaninů například velmi rychlé sledování stupně jejich glykosylace. Spojení s hmotnostní spektrometrií pak může v řadě případů nižší chromatografické rozlišení vyrovnat. Vyšší obsah acetonitrilu v mobilní fázi pro HILIC oproti mobilní fázi pro reverzní fázi je výhodný pro zlepšení ionizace elektrosprejem a tím snížení limitu detekce pro HILIC systém. Polární interakce v HILIC systému nabízí nadto zajímavou selektivitu pro separaci polyglykosylovaných barviv.

## **Summary**

This diploma work is focused on analysis of anthocyanins by HILIC chromatography. Theoretical part is devoted to colour of wine and its control. It is focused on anthocyanins as the most common natural pigments and it briefly summarizes methods for their analysis. Special focus is given to liquid chromatography summarizing the principles and trends of chromatographic equipments.

The experimental part of the work is devoted to development of methods for the analysis of anthocyanins on monolithic columns in HILIC mode suitable for combination with mass spectrometric detection. Optimized method is used to analyze the extract of red cabbage. Results are compared with the results obtained by HILIC chromatography using a column with stationary phase created by particles and with the results obtained by generic reversed phase method.

Obtained results show that HILIC chromatography is especially useful in case that a fast monitoring of glycosylation degree is requested instead of a detailed analysis of particular anthocyanins. Combination of HILIC method with mass spectrometry can in some cases balance a lower chromatographic resolution. Higher content of acetonitrile in HILIC mobile phase compared to mobile phase commonly used for reversed phase mode is advantageous due to improvement of electrospray ionization and consequently decrease of detection limit in HILIC system. Moreover, polar interactions in HILIC system offer an interesting selectivity for separation of polyglycosylated dyes.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Nové Hradečné dne .....

.....

podpis

Mé poděkování patří doc. Bednářovi za cenné rady a vedení při zpracování diplomové práce, pracovníkům KACH za poskytnuté pracovní podmínky a rodině za podporu a trpělivost.

Děkuji rovněž firmě Merck Millipore za poskytnutí monolitické HILIC kolony pro experimenty prováděné v rámci mé diplomové práce.

## Obsah

1.	Úvod a cíl práce .....	2
2.	Teoretická část .....	3
2.1.	Víno – kontrola kvality a přibarvování .....	3
2.2.	Anthokyaniny .....	5
2.3.	Chromatografie .....	10
2.3.1.	Chromatografie na normálních a reversních fázích .....	15
2.3.2.	HILIC .....	15
3.	Experimentální část .....	20
3.1.	Chemikálie .....	20
3.2.	Přístroje .....	20
3.3.	Příprava roztoků standardů a jejich směsi .....	21
3.4.	Příprava reálného vzorku .....	21
3.5.	Příprava mobilních fází .....	23
3.6.	Základní parametry metod .....	25
4.	Výsledky a diskuse .....	27
4.1.	Optimalizace složení mobilní fáze pro separaci v HILIC systému .....	27
4.2.	Optimalizace HILIC metody pro analýzu anthokyaninů v reálném vzorku .....	33
4.3.	LC/MS metoda pro analýzu anthokyaninů v extraktu z červeného zelí .....	36
5.	Závěr .....	40
6.	Seznam zkratk .....	42
7.	Seznam literatury .....	43

## 1. Úvod a cíl práce

Barva potravin patří k základním parametrům používaným pro hodnocení kvality produktu a hraje důležitou roli při jejich výběru zákazníkem. V současnosti je většina potravin nějakým způsobem zpracovávána a teprve následně nabízena zákazníkovi. Při procesech zpracování však může docházet ke ztrátě původní přirozené barvy a výrobky jsou proto dobarčovány. V potravinářském průmyslu jsou dostupná různá syntetická a přírodní barviva, která jsou spolu s dalšími látkami (např.: sladidly, plnidly,...) obecně nazývána potravinová aditiva a jejich používání upravuje právní legislativa. Poměrně přísná pravidla na obsah barviv jsou stanovena například pro víno a ovocné šťávy.<sup>1,2</sup>

Kontrola kvality produktů a dodržování právních předpisů je v pravomoci státních orgánů, u nichž (ale i jinde v potravinářství) je klíčová správná, přesná, citlivá a rychlá analýza, což je vzhledem ke komplexnosti vzorků velkou analytickou výzvou. Nicméně neustálý vývoj analytických metod v současnosti nabízí nové možnosti, které lze při analýzách použít (od různých extrakcí až po samotnou identifikaci látek).<sup>1</sup>

Tato práce si klade za cíl ve své teoretické části stručně shrnout základní poznatky o kvalitě vína se zaměřením na jeho barvu a dobarčování (včetně kontroly nedovolené úpravy potravin barvivy). Věnuje se anthokyaninům a možnostem jejich analýzy. Podrobněji se potom zaměřuje na chromatografii, jako techniku nejčastěji používanou při analýze anthokyaninů. Stručně shrnuje její základy a trendy ve vývoji chromatografického zařízení (se zaměřením na chromatografické kolony).

V experimentální části je věnována pozornost vývoji metod pro kontrolu anthokyaninových barviv na monolitické i částicové koloně v systému HILIC s cílem najít jednoduchou a rychlou alternativní metodu vhodnou pro spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Víno – kontrola kvality a přibarvování

Vinná réva a produkty z ní získané jsou lidstvu známy již miliony let. Udává se, že člověk provází po celou dobu jeho existence. První doklady o výrobě vína se datují do doby 10 000 let před naším letopočtem, ale již člověk „sběrač“ sbíral hrozny a pil jejich šťávu v čerstvé i zkvašené podobě. První rozšíření vinic na našem území je spojeno již s Velkomoravskou říší a se jmény knížete Bořivoje a svatého Václava. Rozkvět vinařství u nás je však nejvíce spojován s vládou Karla IV.<sup>3</sup>

V dnešní době se může jako víno označovat podle předpisů Evropské unie výrobek, který byl získán výhradně úplným nebo částečným alkoholovým kvašením čerstvých, rozdrcených nebo nerozdrcených vinných hroznů nebo hroznového moštu. Další legislativa potom upravuje požadavky na sensorické vlastnosti, podle kterých se hodnotí jednotlivá vína – vzhled, barva, vůně a chuť. Tato kapitola se podrobněji zaměřuje na barvu vína, možnosti jejího ovlivnění a možnosti kontroly.<sup>4,5</sup>

Hlavními faktory ovlivňujícími barvu vína jsou: odrůda hroznů, jejich vyzrálost, způsob zpracování, školení vína a jeho zrání. Vyhláška říká, že „*barva by měla být u červených a bílých vín odpovídající odrůdě, ročníku a deklarované technologii*“. Co se červeného vína týče, nejvíce barviv obsahují odrůdy zvané barvířky, které obsahují barvivo nejen ve slupkách ale i v dužině. Některé odrůdy se používají v povoleném množství k vylepšení barvy jiných vín. Ke ztrátě barvy dochází v důsledku přezrávání hroznů, ale také působením plísní a hnilob vyskytujících se na hroznech. Zpracování hroznů a školení vína vyžaduje určité zkušenosti sklepmistra, a to především při maceraci (luhování), neboť její doba ovlivňuje barvu a chuť vína. Procesy následující po maceraci jako je síření, čiření a filtrace, většinou vedou k částečnému odbarvení vína. Posledním uvedeným faktorem ovlivňujícím barvu je zrání vína. Při tomto procesu se barva vína vyvíjí v závislosti na různých podmínkách, jako je přístup kyslíku, teplota skladovacích prostor a typ nádoby, ve které je víno uchováno.<sup>4,6,7,8</sup>

Ve vinařské praxi se u barvy hodnotí její jas a sytost. Pro přesnější popsání barevnosti se používá spektrofotometrie, kterou se stanovuje obsah anthokyaninů a další parametry.



Sofistikovanější analytické postupy vyžaduje měření jednotlivých anthokyaninů a kontrola případného přídavku syntetických barviv.<sup>6</sup>

Ačkoliv zákon o vinohradnictví a vinařství, vztahující se k nařízením Evropské unie stanovuje, že „do produktu je zakázáno přidávat jakékoliv látky, pokud nestanoví předpisy EU, tento zákon nebo prováděcí právní předpis jinak“, objevují se stále případy, kdy je víno nepovoleně upravováno. Vyšší výskyt vín, u kterých byla prokázána přítomnost cizorodých látek, byl zaznamenán v roce 2007. Bulharsko, které mělo legislativně povoleno přidávání syntetických barviv do vína, v tomto roce přistoupilo do Evropské unie a tato vína se dostala ve větší míře i na náš trh. Jiným případem, který byl zveřejněn českými médii v lednu 2011, je víno Hraběnka. U tohoto vína původem z Maďarska byl prokázán přídavek syntetických barviv a to konkrétně azorubinu, patentní modři V a tartrazinu. Tyto případy jsou dokladem toho, že cílená kontrola barviv ve víně je pro ochranu spotřebitele trvale potřebná.<sup>9,10,11</sup>

Možnosti kontroly dobarvování vína jsou různé. Jednoduchou a rychlou metodou pro stanovení syntetických barviv ve víně je TLC. Touto metodou lze identifikovat syntetická barviva rozpustná ve vodě v potravinách s malým obsahem tuků. Barviva se z vodného roztoku izolují v kyselém prostředí sorpcí na odtučněné vlněné vlákno, odkud se po promytí desorbují roztokem amoniaku a dělí se chromatografií na tenké vrstvě. Podle zabarvení skvrny na vysušeném chromatogramu a hodnoty  $R_f$  porovnané se standardy se provede jejich identifikace.<sup>11</sup>

Pro hodnocení dobarvování vína přírodními barvivy (především anthokyaniny) se používá tzv. fingerprinting chromatography. Tato technika využívá toho, že každé ovoce obsahující anthokyaniny má pro svůj botanický druh typické složení těchto látek. Bylo zjištěno, že hlavními anthokyaniny vyskytujícími se ve vinné révě jsou převážně 3-monoglykosidy malvidinu, cyanidinu, peonidinu, petunidinu a delfinidinu, přičemž převládá malvidin-3- $\beta$ -D-glukosid (u neevropských vín je významným anthokyaninem také malvidin-3,5- $\beta$ -D-diglukopyranosid). HPLC analýza poskytla anthokyaninové profily všech u nás pro výrobu vína povolených modrých odrůd vinné révy. Tyto profily slouží pro identifikaci původu anthokyaninů ve víně. Po filtraci je vzorek podroben HPLC analýze

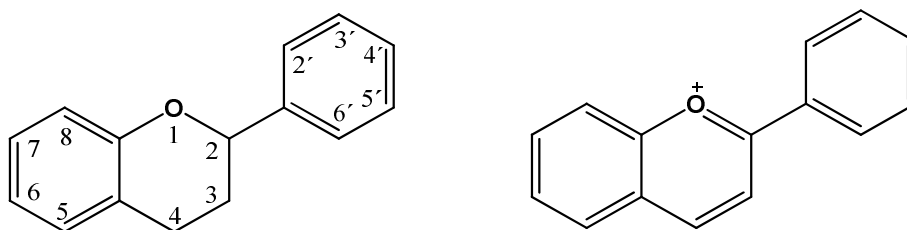
s detekcí UV při 520 nm. Záznam (anthokyaninový otisk) se porovnává s knihovnou a hledá se shoda průběhu křivky.<sup>11, 12, 13</sup>

## 2.2. Anthokyaniny

Anthokyaniny (nebo také anthokyanony) z řeckého *anthos* (květina) a *kyan* (modrý) patří do skupiny látek nazývaných flavonoidy. Flavonoidy tvoří rozsáhlou skupinu přírodních látek, které jsou významné pro svou barvu, chuť nebo biologickou aktivitu a mimo anthokyaniny do této skupiny patří také např. katechiny, flavanony, flavony či flavonoly.<sup>14, 13</sup>

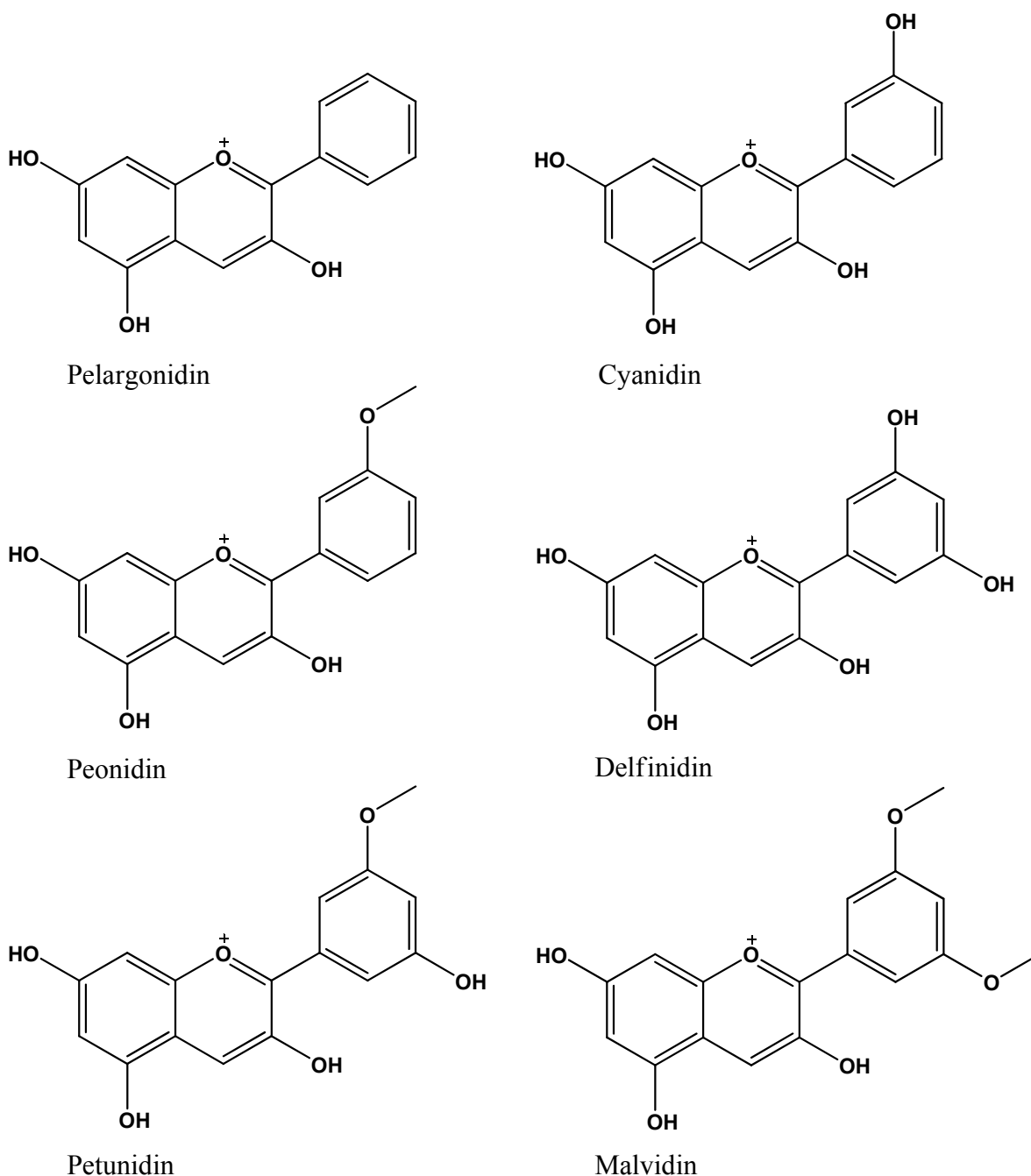
Anthokyaniny tvoří nejrozšířenější a velice početnou skupinu rostlinných barviv. Jsou zodpovědné za barvy od oranžové po modrou, ale výsledná barva přírodních materiálů nebo potravin často závisí také na přítomnosti jiných rostlinných pigmentů (jako jsou karotenoidy nebo chlorofyly). Bývají nashromážděné ve vakuolách různých rostlinných pletiv. Nejčastěji se nacházejí v epidermálních buňkách, ale je popisován i výskyt v mezofylu. V rostlinách plní podobně jako ostatní flavonoidy funkci antioxidantů, chrání proti záření, zajišťují obranný mechanismus a mohou hrát také důležitou roli v rozmnožování rostlin (barvením různých částí rostlin lákají opylovače nebo živočichy, kteří následně roznášejí jejich semena).<sup>13, 15</sup>

Struktura anthokyaninů, respektive jejich necukerných složek (aglykonů, anthokyanidinů) vychází z obecné struktury flavonoidů, jak je uvedena na obrázku 1.



**Obr. 1:** Obecná struktura flavonoidů (vlevo) a obecná struktura anthokyanidinů (vpravo)

Literatura uvádí, že je známo 21 anthokyanidinů (počet k roku 2003), přičemž nejčastěji se vyskytuje šest látek a jejich struktury jsou uvedeny na obrázku 2.<sup>13, 15</sup>



**Obr. 2:** Struktury nejběžnějších anthokyanidinů

Volné aglykony (anthokyanidiny) se v přírodě nachází pouze vzácně, neboť jejich stabilita je poměrně nízká a závislá na počtu hydroxy (methoxy) skupin ve struktuře – s rostoucím počtem methoxy skupin roste stabilita, s rostoucím počtem

hydroxy skupin naopak stabilita klesá. Jak již bylo uvedeno, nejběžněji se vyskytují glykosylované sloučeniny (anthokyaniny), protože molekuly sacharidů strukturu anthokyanidinu stabilizují. Nejčastěji je sacharid navázaný přes hydroxy skupinu v poloze 3 a pokud jsou obsaženy ještě další molekuly sacharidů, bývají tyto vázány přes hydroxy skupinu v poloze 5 nebo 7, méně často se vyskytují vazby v poloze 3' a 5'. Uvádí se, že v přírodě se vyskytují pouze anthokyaniny, u kterých nejsou současně glykosylovány více než tři hydroxy skupiny. Na molekulu anthokyanidinu bývají vázány různé typy sacharidů. Z monosacharidů jsou běžné glukosa, rhamnosa, xylosa, galaktosa, arabinosa a fruktosa, z disacharidů potom např.: rutinosa nebo sophorosa. Cukry mohou být dále acylovány alifatickými nebo aromatickými kyselinami, což také molekulu anthokyaninu stabilizuje (tzv. intramolekulární kopigmentace). Ve strukturách se vyskytují např. kyselina *p*-kumarová, sinapová, ferulová a kávová.<sup>13, 15, 16</sup>

Ve vodných roztocích se anthokyaniny vyskytují ve čtyřech různých formách, přičemž to, která forma bude převažovat, závisí na pH prostředí. Při pH od jedné do tří je převažující formou flavyliový kation, který se zvyšující se hodnotou pH přechází přes neutrální chinoidní bázi na anion se strukturou chinonu (anion chinoidní báze,  $7 < \text{pH}$ ). Při pH 4 – 5 flavyliový kation může přecházet na tzv. karbinolovou pseudobázi. V mírně kyselém nebo neutrálním prostředí může dojít k otevření heterocyklického kruhu a ke vzniku chalkonu (transformace je však pomalá – v literatuře se uvádí, že při laboratorní teplotě může trvat i několik hodin).<sup>13, 15</sup>

Přírodní zdroje anthokyaninů jsou rozmanité. Rostliny bohaté na anthokyaniny jsou například z čeledi révovité (réva vinná), růžovité (jablka, jahody, ...), lilkovité (lilek, brambory) nebo brukvovité (červené zelí). Množství anthokyaninů a jejich profil jsou závislé na druhu rostliny, ze které pocházejí. Některé druhy obsahují anthokyaniny odvozené pouze od jednoho anthokyanidinu, jiné od více různých. U některých je počet několik málo anthokyaninů (jahody, ostružiny), další obsahují i více než deset. Příkladem může být červené zelí, ve kterém bylo identifikováno 24 různých anthokyaninů (všechny odvozené od cyanidinu).<sup>13, 16</sup>

Anthokyaniny jsou pro svou atraktivní barvu využívány v potravinářském průmyslu jako potravinářská barviva (s přihlédnutím k faktu, že se změnou struktury anthokyaninu vlivem pH, teploty a dalších parametrů se mění i jejich barva). Extrakty anthokyaninů užívaných v potravinářství nesou označení E163 a získávají se především z vinných hroznů, černého rybízu, borůvek, ibišku (*Hibiscus sabdariffa*) a ze zeleniny potom z červeného zelí, černé mrkve nebo sladkých brambor. Anthokyaninová barviva jsou všeobecně povolena a většina zemí nemá ani limit pro jejich použití. Zájem o tyto barviva vzrostl v souvislosti s obecným růstem zájmu o přírodní látky a o nezávadnost a bezpečnost kupovaných potravin (náhrada syntetických barviv přírodními). Kromě anthokyaninů se jako přírodní barviva v potravinářství dále používají např.: kurkumin, lutein, betanin nebo karamelizovaný cukr.<sup>17, 13, 18</sup>

Lidé se o anthokyaniny zajímají i pro jejich dobré účinky na zdraví. Anthokyaniny jsou součástí lidské stravy již mnoho tisíciletí. Tyto sloučeniny patřily do tradiční přírodní medicíny severoamerických indiánů, ale i Evropanů a Číňanů. Jejich účinky jsou především antioxidační. Jak je uvedeno v literatuře<sup>19</sup>, směsi a extrakty bohaté na anthokyaniny se využívaly k léčbě tak rozdílných nemocí, jako je vysoký krevní tlak, horečka, poruchy jater či problémy vylučovací soustavy, jako jsou ledvinové kameny nebo infekce močových cest. Dále autorky uvádějí, že in vitro studie na směsích purifikovaných anthokyaninů potvrzují jejich účinky, jako ochrana proti poškození jater, významné snížení krevního tlaku, zlepšení zraku, inhibice mutací způsobených mutageny z potravy a jiné.<sup>20, 19</sup>

Literatura popisuje různé metody pro analýzu anthokyaninů. K jejich extrakci z rostlinného materiálu se nejčastěji používá methanol nebo ethanol s přidavkem kyseliny chlorovodíkové. Jinou možností je použít extrakci acetonem a následně reextrakci lipofilnějších složek (lipidů, karotenoidů, ev. chlorofylů aj.) do chloroformu. Tímto postupem dochází k dalšímu přečištění acetonového extraktu anthokyaninů.<sup>1, 15</sup>

Pro separaci anthokyaninů se vzhledem k jejich vzájemné podobnosti ve fyzikálně – chemických vlastnostech nejvíce používají metody chromatografické, ale uplatňují se i metody elektromigrační (např.: kapilární elektroforéza). Literatura popisuje použití papírové, tenkovrstvé i klasické kolonové chromatografie, avšak v současnosti je

primární volbou metoda HPLC. Přehledný seznam HPLC metod pro analýzu anthokyaninů v různých rostlinných materiálech podávají ve své práci Valls a jeho spolupracovníci. Z tohoto přehledu je zřejmé, že při separaci anthokyaninů převládá využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému reversních fází. Konkrétně, běžně využívané metody v rutinních analýzách jsou založeny na použití C18 kolon a mobilních fází, které jsou tvořeny směsí acetonitrilu, vody a kyseliny mravenčí.<sup>14, 15</sup>

Vzhledem k tomu, že anthokyaniny mají schopnost absorbovat záření ve viditelné části spektra, uplatňují se k jejich detekci (popřípadě charakterizaci) spektrofotometrické metody. Velmi často je jako detektor při chromatografických analýzách používán tzv. DAD detektor (diode array detektor – detektor diodového pole). Nejobvyklejší vlnová délka pro detekci je 520 nm. V dnešní době je dále poměrně běžné využití hmotnostní spektrometrie, což dokazuje také již zmíněná práce Vallse a jeho kolegů, jehož seznam metod uvádí převážně metody se systémem HPLC – DAD – MS.<sup>14, 15</sup>

### 2.3. Chromatografie

Chromatografie je separační technika, která využívá dělení složek mezi dvěma fázemi (nepohyblivou – stacionární a pohyblivou – mobilní). Základy metody položil počátkem tohoto století ruský botanik Cvet, který rozdělil listová barviva na sloupci sorbentu. Následně však byla v původním provedení téměř zapomenuta a k její renesanci došlo až koncem šedesátých let ve vysokoúčinné formě.<sup>21</sup>

V chromatografii dochází při dělení k přenosu molekul z fáze mobilní do fáze stacionární. Tento proces se natolik blíží k rovnováze, že distribuci složek lze popsat distribuční konstantou:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s \cdot V_m}{(n_A)_m \cdot V_s}$$

kde  $(n_A)_s$  je látkové množství složky A ve fázi stacionární a  $(n_A)_m$  je látkové množství složky A ve fázi mobilní.

Skutečná termodynamická rovnováha se však nevytvoří, protože pohyb mobilní fáze brání jejímu ustanovení a posune molekuly složek k další části stacionární fáze. Interakce složky a fází určují rychlost migrace složky. Rozdíly v těchto rychlostech jsou rozhodující pro rozdělení složek. Nachází-li se v analyzované směsi dvě složky, které rozdílně interagují se stacionární fází, složka se silnější interakcí je více zadržována, tzn. má vyšší retenci a dochází k jejímu oddělení od složky s nižší retencí.<sup>21</sup>

Chromatografie je v podstatě skupinou metod, u kterých se uplatňují různé separační mechanismy. Chromatografický proces může být založen na adsorpci, chemisorpci, síťovém efektu, rozdělování nebo specifické interakci biomolekul, avšak výsledná separace v daném systému je často výsledkem působení různých mechanismů.<sup>21</sup>

Míru separace jednotlivých složek lze posuzovat různými způsoby. Běžně používané je tzv. rozlišení, které udává relativní separaci dvou sousedních píků. Rozlišení ovlivňují tři faktory – kinetický, termodynamický a kapacitní – podle rovnice:

$$R_{1,2} = \frac{1}{4} \sqrt{n} \frac{r_{1,2} - 1}{r_{1,2}} \frac{k_2}{1 + k_2}$$

První člen rovnice představuje kinetický faktor ( $n$  označuje počet teoretických pater), druhý je termodynamický ( $r_{1,2}$  je retenční poměr) a poslední kapacitní ( $k$  značí kapacitní faktor).<sup>21</sup>

V praxi se užívá výpočet rozlišení podle vzorce:

$$R_{i,j} = \frac{t_{R,j} - t_{R,i}}{0,5 \cdot (Y_j + Y_i)}$$

V této rovnici  $t_{R,j}$  a  $t_{R,i}$  představují retenční časy složek, pro které je rozlišení počítáno, a  $Y_j$ ,  $Y_i$  odpovídají šířkám píků těchto složek na úrovni nulové linie (všechna tato data lze získat z chromatogramu).<sup>21</sup>

Pro hodnocení separace více jak dvou píků lze použít tzv. COF funkci, známou také jako chromatografická optimalizační funkce. Rovnici pro její výpočet lze definovat různě. Uvádí se např.:

$$COF = \sum_i \alpha \cdot \frac{\ln R_i}{R_0} + \beta \cdot (t_{R,max} - t_{R,x})$$

nebo:

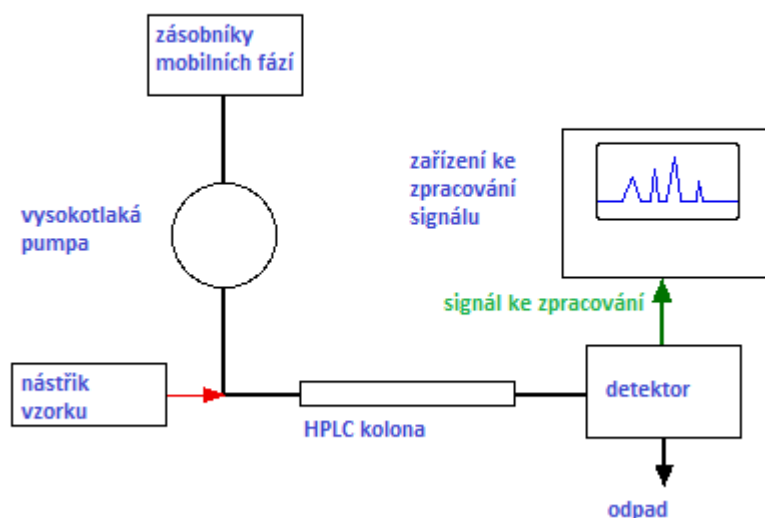
$$COF = \sum_i R_i + N^\alpha + \beta \cdot (t_{R,max} - t_{R,x}) + \gamma \cdot (t_{R,1} - t_{R,0})$$

kde  $R_i$  je rozlišení dvou sousedních píků,  $N$  celkový počet píků na chromatogramu,  $t_{R,1}$  a  $t_{R,x}$  jsou retenční časy první a poslední eluované látky a  $t_{R,0}$  a  $t_{R,max}$  jsou předem zvolené hodnoty minimálního a maximálního retenčního času, které jsou přípustné. Členy  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  představují váhové koeficienty, které je možné měnit podle toho, kterému aspektu separace je přikládána větší důležitost. Tuto funkci jako optimalizační kritérium použili ve své práci např. Miawa a jeho kolegové.<sup>21, 22</sup>

Základní schéma chromatografu je na obrázku 3. Mobilní fáze se nasává vysokotlakou pumpou ze zásobníků mobilní fáze a je tlačena dále přes chromatografickou kolonu, která je naplněna stacionární fází, na níž dochází k separaci složek analyzovaného vzorku. Vzorek se do systému nejčastěji dávkuje přes šesticečný dávkovací ventil, který bývá vybaven různě velkou dávkovací smyčkou. Odtud je vzorek po otočení ventilu a zařazení smyčky do systému



vymyt mobilní fází. Z kolony pokračují separované složky do detektoru, kde je vytvářen signál. Tento signál je zpracováván v dnešní době nejčastěji počítačem, který současně slouží k ovládání celého chromatografu.

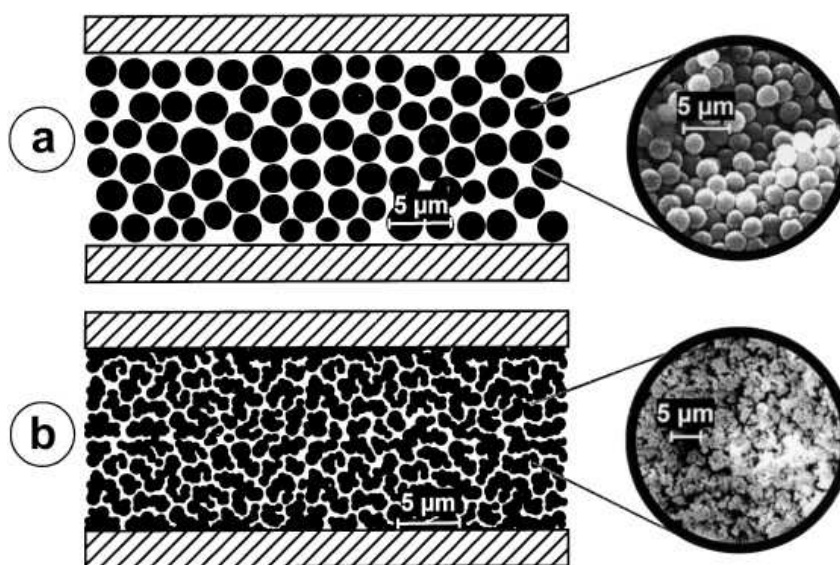


**Obr. 3:** Schéma HPLC

Chromatografické kolony jsou skleněné, nerezové nebo v některých případech plastové trubice různého průměru a délky, které jsou naplněny stacionární fází. Podle způsobu výroby stacionární fáze můžeme kolony rozlišovat na monolitické a částicové, které můžeme dále dělit ještě na kolony s plně porézními částicemi a kolony plněné částicemi s neporézním jádrem, které je potaženo porézním filmem stacionární fáze (core – shell technologie).

Základní definice monolitu v chromatografickém smyslu slova říká, že chromatografické lože se skládá z jednoho kusu spojitého, porézního materiálu (porezní tyče), který je hermeticky uzavřen v trubici. Literatura rozděluje materiál pro výrobu monolitických kolon do dvou typů – anorganický, kam patří kolony na bázi silikagelu (podle způsobu výroby se dále dělí na xerogel a polykondenzovaný silikát) a organický, který je zastoupen organickými polymery – různé hydrofilní a hydrofóbní gely – na bázi polyakrylamidových gelů, methakrylátových gelů nebo gelů z polystyren/divinylbenzenových kopolymerů.<sup>23, 24</sup>

Monolitická kolona obvykle bývá charakterizována bimodální distribucí velikosti pórů (udává se velikost meso a makro pórů). Počet kanálků prostupujících chromatografickým ložem je u monolitických kolon mnohem vyšší než u kolon částicových (jak ukazuje obrázek 4), proto oproti částicovým kolonám vykazují monolitické kolony vysokou permeabilitu. Permeabilita v současnosti dostupných monolitických kolon odpovídá permeabilitě částicových kolon naplněných částicemi s průměrem 9  $\mu\text{m}$  (u kolon s částicemi 2, 3 nebo 5  $\mu\text{m}$  je permeabilita asi o řád nižší). Permeabilita kolony úzce souvisí s pracovním tlakem. U částicových kolon se pracovní tlak pohybuje v řádu několika set barů (pro částice 5  $\mu\text{m}$ ) a mezi 1000 až 1200 bary pro kolony s částicemi 1,5  $\mu\text{m}$ , zatímco pracovní tlak monolitické kolony je v rozmezí 50 – 100 barů. Nižší pracovní tlak šetří další součásti chromatografického přístroje (především pumpu) a umožňuje použít metody s vyšším průtokem, což může vést ke zkrácení doby analýzy, nebo lze použít delší kolonu.<sup>23, 25</sup>



**Obr. 4:** Struktura částicové (a) a monolitické kolony (b) (vpravo snímky z elektronového mikroskopu)<sup>25</sup>

Literatura uvádí, že účinnost monolitické kolony (Chromolith) s velikostí makropórů asi 2  $\mu\text{m}$  při lineární rychlosti blízké optimu a při délce 10 cm je srovnatelná s účinností kolon o délce 15 cm plněných částicemi s průměrem 5  $\mu\text{m}$  (10000 – 15000 teoretických pater).<sup>26</sup>

Dostupné studie nejčastěji diskutují monolitické kolony v souvislosti s jejich využitím v podobě kapilárních kolon. Uvádí se, že většímu rozšíření monolitických kolon

v preparativním měřítku (průměr 4 – 5 mm a délka kolony 5 – 30 cm) brání především způsob výroby některých monolitů (špatná kontrola teploty při polymerizaci, která vede ke špatné reprodukovatelnosti výroby kolon), ale i takové kolony již existují. Nicméně silikagelové monolitické kolony byly a některé stále jsou chráněny patentem (jeden vypršel v roce 2011 a druhý expiruje až v roce 2020) a jediné komerčně vyráběné kolony dodává firma Merck (kolony Onyx od firmy Phenomenex jsou založeny na monolitické technologii licencované firmou Merck).<sup>23</sup>

Patentová ochrana monolitických kolon (a nemožnost tyto patenty obejít) však významně posunula vývoj v oblasti kolon částicových, neboť pouze několik let po prvním zveřejnění monolitických kolon výrobci kolon přišli s částicemi o průměru menším než 2  $\mu\text{m}$ . Metoda využívající takovéto kolony se nazývá ultraúčinná kapalinová chromatografie (zkratka UHPLC nebo obchodní značka UPLC pro kolony a systémy od firmy WATERS). Tyto systémy poskytují rychlou a účinnou separaci (uvádí se rozsah 1000 – 80 000 teoretických pater), ale musí pracovat při velmi vysokých tlacích (1000 bar).<sup>23, 27</sup>

Dobrým kompromisem mezi účinností kolony a pracovním tlakem mohou být kolony plněné tzv. core – shell částicemi. Rozdíl mezi strukturou plně porézní a core – shell částice je na obrázku 5. Tato metoda dovoluje pracovat s běžným chromatografickým vybavením (tzn. pracuje s tlakem do 400 bar), ale přitom lze získat účinnost srovnatelnou s analýzou na kolonách s částicemi pod 2  $\mu\text{m}$ .<sup>27</sup>



**Obr. 5:** Struktura core – shell částice (vlevo) a plně porézní částice (vpravo)

Jak je vidět z tohoto velmi stručného přehledu, vývoj chromatografických kolon postupuje v podstatě třemi směry a je otázkou, které kolony se nakonec prosadí. Guichon se ve své práci<sup>23</sup> přiklání k názoru, že po expiraci patentů lze očekávat evoluci v monolitických kolonách a tyto že jednoho dne budou hlavním tahounem chromatografických separací i

v rutinní praxi. Pravdou však zůstává, že použití toho či onoho typu kolony bude pravděpodobně vždy záviset na konkrétní aplikaci a ekonomických možnostech laboratoří.

### **2.3.1. Chromatografie na normálních a reversních fázích**

Chromatografie na normálních fázích je ve své podstatě nejstarším typem kapalinové chromatografie. Separační proces je založený na kompetitivní adsorpci molekul analyzovaného vzorku a molekul mobilní fáze na povrch fáze stacionární. Jako stacionární fáze se využívají polární adsorbenty, tj. například silikagel nebo alumina. Mobilní fázi obvykle tvoří směs nepolárních organických rozpouštědel. Tato metoda dnes nachází využití například při analýzách extrémně hydrofobních látek nebo látek náchylných k hydrolyze. Řadu výhod mají rovněž v preparativní chromatografii.<sup>21, 28</sup>

V současné době nepoužívanější systém ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii však je chromatografie na reversních fázích (RP-HPLC), která nachází uplatnění až v 90 % všech aplikací (od dělení malých organických molekul až po dělení proteinů). Pojem „obrácené (reversní) fáze“ značí, že stacionární fáze je nepolární a mobilní fáze polární.

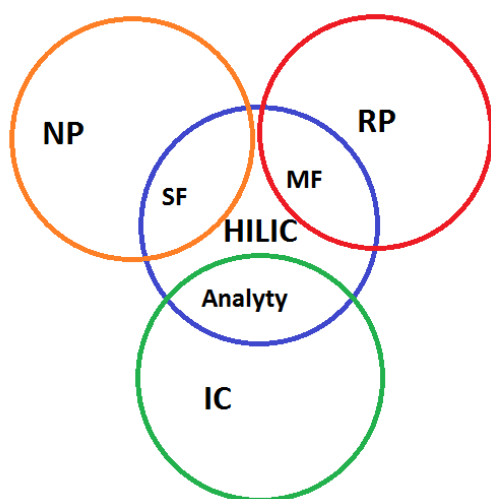
Běžně používané stacionární fáze jsou tzv. chemicky vázané fáze, kdy je na polárním nosiči (nejčastěji silikagelu) chemickou reakcí navázána nepolární skupina – často se jedná o uhlovodíkový řetězec (např. C8, C18, kde číslo udává počet uhlíků v řetězci) a dále o fenylovou či bifenylovou skupinu. Své uplatnění v tomto systému si najde i uhlík či organické polymery. Jako mobilní fáze se v těchto systémech uplatňují směsi vody (pufru) a organických rozpouštědel, jako je methanol, acetonitril popřípadě tetrahydrofuran.<sup>21</sup>

U separace na obrácených fázích se předpokládá, že při retenci se nejvíce uplatňuje tzv. solvofobní efekt. Hnací silou jsou tu polární interakce mezi molekulami mobilní fáze, které jsou silnější než interakce mezi molekulami dělených látek a mobilní fáze. Dochází tedy k vytěsňování látek do fáze stacionární. Látky jsou tím více zadržovány, čím nižší je jejich polarita.<sup>21</sup>

### **2.3.2. HILIC**

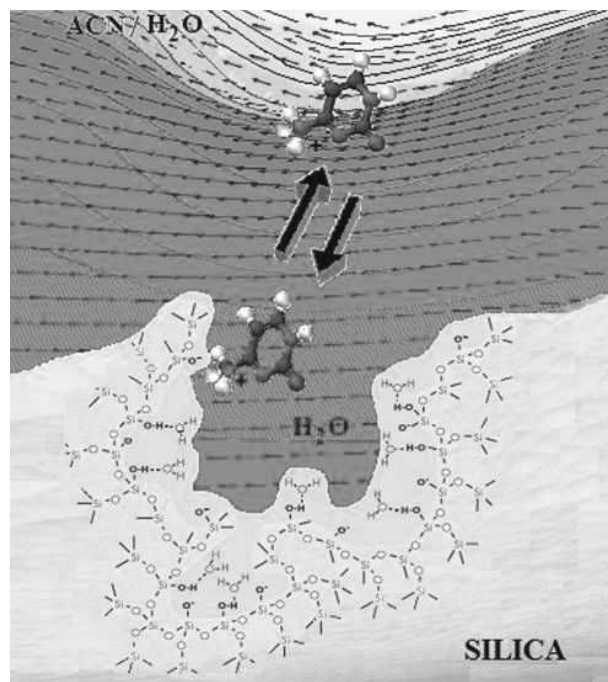
Zkratku HILIC poprvé použil ve své práci v roce 1990 Alpert k označení chromatografické techniky, ve které analyty interagují s hydrofilní stacionární fází - filmem vody na povrchu částice stacionární fáze a jsou eluovány relativně hydrofobní směsí

rozpouštědel, ve které se ale určité množství vody používá jako rozpouštědlo s větší eluční silou. Technika jako taková však byla známá již dříve (například práce Lindena a Palmera, obě v roce 1975). HILIC se někdy považuje za speciální případ chromatografie na normálních fázích, dost dobře se ale může považovat za propojení iontověměnné chromatografie a chromatografie na normálních i obrácených fázích, neboť s každou ze jmenovaných technik má něco společného, jak ukazuje obrázek 6.<sup>29, 30, 31, 32</sup>



**Obr. 6** Propojení systému HILIC s dalšími chromatografickými systémy

Přestože je HILIC mód v literatuře občas popisován jako speciální případ chromatografie na normálních fázích, je mechanismus separace v této metodě poněkud složitější a značně závislý na složení mobilní fáze, použité stacionární fázi i analyzovaných látkách. Základním separačním mechanismem u chromatografie hydrofilních interakcí je rozdělávání mezi o vodu obohacenou vrstvu mobilní fáze, která je částečně imobilizovaná na povrchu stacionární fáze, a o vodu ochuzenou mobilní fázi, která proudí přes kolonu. Nicméně, v závislosti na použitých fázích a povaze analytu se při separaci mohou uplatňovat také vodíkové vazby a elektrostatické interakce (jak ukazuje obr. 7).<sup>32</sup>

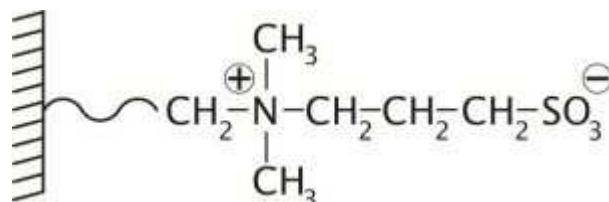


**Obr. 7:** Separace v systému HILIC<sup>32</sup>

Jako mobilní fáze se využívají směsi rozpouštědel běžných pro chromatografii na reverzních fázích s vysokým obsahem organické složky – 50 – 99 % organického rozpouštědla, obvykle acetonitrilu. Mohou být použita i aprotická rozpouštědla mísitelná s vodou, jako je tetrahydrofuran nebo dioxan. Jsou popsány i systémy, ve kterých se jako složka mobilní fáze uplatňuje některý lehký alkohol (např.: methanol nebo isopropanol). Ovšem pokud je vyžadována stejná retence, jako v systému aprotické rozpouštědlo – voda, je potřebná vyšší koncentrace alkoholu.<sup>32, 33, 34</sup>

První stacionární fáze využívané v HILIC chromatografii byly silikagelové fáze s navázanými aminovými skupinami. Tyto fáze byly vhodné například pro separaci sacharidů. Další stacionární fáze – s navázanými diolovými skupinami – se využívaly pro separaci proteinů. Jiné stacionární fáze, které našly uplatnění v systému HILIC jsou silikagelové fáze modifikované cyano nebo amido skupinami. Druhá zmíněná fáze byla použita např. pro separaci peptidů. V systému HILIC lze využít i iontoměničové stacionární fáze. Takovým příkladem mohou být kolony, kdy jsou na silikagelový nebo polymerní nosič navázány tzv. zwitterionické ligandy (obr. 8). Tento typ kolony byl využit například pro metabolický „otisk prstu“ moči potkana. Silikagel, který není modifikovaný žádnými funkčními skupinami

(funkční skupiny tvoří pouze silanolové a silanové skupiny na povrchu silikagelu), je v systému HILIC využitelný kupříkladu pro izolaci a separaci epirubicinu. Uvedené aplikace jsou pouze malým výčtem toho, kde je možné chromatografii hydrofilních interakcí využít.<sup>33, 31, 32</sup>



**Obr. 8:** Příklad zwitteriontu<sup>35</sup>

Pro analýzu flavonoidů je často využíváno takových postupů, při kterých jsou analyzované vzorky nejprve rozděleny na reversních fázích a teprve následně v systému HILIC (nebo obráceně). V systému HILIC je popsáno využití silikagelových stacionárních fází nemodifikovaných, ale i těch, které jsou modifikovány například cyclodextriny nebo dioly.<sup>36</sup>

HILIC se zdá být vhodnou volbou pro analýzu velmi polárních látek metodou LC – MS. Při spojení těchto metod je dnes v praxi běžně užívanou ionizační technikou elektrosprej, u kterého ionizace a tím i citlivost mimo jiné závisí také na schopnosti mobilní fáze dostatečně rychle se odpařit. V porovnání s reversními fázemi lze u HILIC chromatografie předpokládat, že při spojení s hmotnostní spektrometrií bude metodou citlivější, protože vyšší obsah organické složky v mobilní fázi může zlepšit ionizaci (dochází ke zlepšení desolvatace analytu). Navíc – podle literatury – je pořadí eluovaných látek u HILIC chromatografie obvykle obrácené oproti reversním fázím, což může zajistit dobrou separaci velmi polárních látek. Nesporná výhoda HILIC chromatografie je v nižším pracovním tlaku (díky snížení viskozity mobilní fáze při vyšším obsahu organické složky), což umožňuje zvýšení průtoku mobilní fáze. HILIC poskytuje i jednu zásadní výhodu oproti analýze na normálních fázích, protože pracuje s poměrně polárními rozpouštědly a zlepšuje tak rozpustnost polárních analytů (obvykle dobře rozpustných ve vodě). Navíc, po SPE nebo L – L extrakci není třeba rozpouštědlo odpařovat a vzorek lze přímo dávkovat. Podle Heatona a Smitha je podstatnou

nevýhodou HILIC chromatografie přílišná závislost na acetonitrilu. Za velkou nevýhodu lze považovat i fakt, že ekvilibrace kolony je poměrně pomalá v porovnání s reversními fázemi.<sup>37, 38, 39</sup>



### **3. Experimentální část**

Experimentální část práce je rozdělena na dvě části. V první části jsem se věnovala optimalizaci metody pro HILIC chromatografii na monolitické silikagelové koloně (Chromolith Si 100 x 2 mm; Merck, Darmstadt, Německo) a na částicové koloně Kinetex 100 x 2,1 mm; velikost částic 2,6  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, USA). Pro optimalizaci jsem využívala připravené směsi standardů. Optimalizováno bylo složení mobilní fáze, její pH a eluční síla.

Druhá část práce se věnuje analýze reálného vzorku (extraktu červeného zelí) při použití chromatografie v systému HILIC na částicové a monolitické koloně a dále v systému reversních fází (kolona ACQUITY UPLC BEH C18 2,1 x 100 mm (velikost částic 1,7  $\mu\text{m}$ )).

#### **3.1. Chemikálie**

Byly použity standardy anthokyaninů a anthokyanidinů (Extrasynthese, Francie): malvin (malvidin-3,5-diglukosid), cyanin (cyanidin-3,5-diglukosid), oenin (malvidin-3-glukosid), ideain (cyanidin-3-galaktosid), primulin (malvidin-3-galaktosid), pelargonidin, cyanidin, delphinidin. Dále byla využita kyselina mravenčí (reagent grade, Sigma Aldrich, USA), acetonitril (gradient grade, Merck, Německo), methanol (HPLC super gradient, LachNer, Neratovice, Česká Republika), t-butylmethylether (HPLC, Sigma-Aldrich, USA), hydroxid amonný (p.a., Sigma Aldrich, Švýcarsko), deionizovaná voda (z deionizační stanice Millipore, R = 18 M $\Omega$ ), kyselina chlorovodíková (p.a, Penta, Česká Republika).

#### **3.2. Přístroje**

Experimentální část této diplomové práce byla vypracovávána na kapalinovém chromatografu od firmy Knauer (Berlín, Německo), který je vybaven dvoupístovou pumpou Smartline 1000 pracující s maximálním průtokem 10 ml a maximálním tlakem 40 MPa, řídicí jednotkou Smartline manager 5000 s vakuovým degaserem a s možností nízkotlakého míchání kvartérního gradientu, šesticestným dávkovacím ventilem s dávkovací smyčkou o objemu 20  $\mu\text{l}$  a Smartline UV detektorem 2600 (zdroj záření – deuteriová výbojka) založeném na technologii diodového pole s možností měření spektra v rozsahu 190 až 510 nm a s možností volby šířky pásu v rozmezí 4 až 25 nm.

Dále byl využit ultra účinný kapalinový chromatograf Acquity (Waters, Milford, USA) který je vybavený binárním vysokotlakým systémem čerpání mobilní fáze pracujícím s maximálním průtokem 2 ml/min a s maximálním tlakem 1034 bar. Dále je vybaven autosamplerem Acquity UPLC, sample managerem, termostatem a PDA detektorem, na kterém lze měřit v rozmezí 190 – 500 nm. UPLC byl spojený s hmotnostním spektrometrem Q-TOF Premier (Waters) vybaveným iontovým zdrojem elektrosprejem (Z-sprej geometrie) a hybridním analyzátozem v kombinaci kvadrupól a TOF (QqTOF).

Při přípravě vzorků a mobilních fází byly používány analytické váhy (Mettler Toledo, Švýcarsko), pH metr (InoLab, Německo), ultrazvuková lázeň Elmasonic (Elma, Německo) a vakuový manifold pro SPE extrakci (Supelco, Bellefonte, USA).

### **3.3. Příprava roztoků standardů a jejich směsi**

Základní roztoky standardů, jejichž koncentrace byla 1 mg/ml, se připravovaly navažováním standardu v pevném skupenství a jeho následným rozpuštěním ve směsi acetonitril/voda/kyselina mravenčí (90/5/5, v/v) (např.: navážka delfinidinu činila 0,27 mg a toto množství bylo rozpouštěno v 270  $\mu$ l připravené směsi rozpouštědel). Z důvodu nedokonalého rozpouštění látek v uvedené směsi bylo do každého roztoku standardu přidáno dalších 20 % (v/v) pětiprocentní kyseliny mravenčí. Úplného rozpouštění látek bylo následně dosaženo sonifikací vzorků v ultrazvukové lázni.

Základní směs standardů byla vytvořena z připravených roztoků tak, že z každého roztoku bylo odebráno 50  $\mu$ l a bylo přidáno ještě 100  $\mu$ l směsi acetonitril – voda – kyselina mravenčí (90/5/5, v/v). Koncentrace jednotlivých standardů anthokyaninových barviv v připravené směsi tedy byla 100 mg/l. Tato základní směs se potom dále ředila příslušnými mobilními fázemi na výslednou koncentraci 10 mg/l.

### **3.4. Příprava reálného vzorku**

Listy červeného zelí byly natrhány na drobné kousky a rozetřeny v třecí misce na hustou kaši. Do kádinky o vhodném objemu (150 ml) byl odvážen asi 1 g rozetřeného rostlinného materiálu. K rostlinnému materiálu bylo přidáno 100 ml vody okyselené kyselinou chlorovodíkovou (koncentrace kyseliny 0,01% (v/v)) a rostlinný materiál byl

extrahován v ultrazvukové lázni po dobu 1 hodiny. Při extrakci byla kontrolována teplota ultrazvukové lázně, aby nedocházelo k přehřívání vzorku (pokud se teplota dostala na 45 °C, byla lázeň vypnuta a ochlazená). Po extrakci byly pevné zbytky rostlinného materiálu odfiltrovány přes papírový filtr a filtrát byl dále zpracováván.

Filtrát (4 ml) byl přečištěn pomocí solid phase extrakce (SPE). Pro SPE byly použity kolony Strata SDB-L (100 µm, Phenomenex, Torrance, USA). Sorbent těchto kolonek byl nejprve aktivován promytím 3 ml okyseleného methanolu (0,01 % (v/v) kyselina chlorovodíková v methanolu), následně se promyl okyselenou vodou (0,01 % (v/v) kyselina chlorovodíková ve vodě) a poté se na kolonku nanese vzorek. Vzorek zachycený na sorbentu byl promyt okyselenou vodou (minimálně 4 ml, sledovalo se, zda se vzorek nevymývá). Vymytí vzorku bylo provedeno 2 ml okyseleného methanolu. Rozpouštědlo bylo od foukáno proudem dusíku a vzorek byl zamrazen pro další zpracování.

Při přípravě vzorku pro analýzu se zamrazený vzorek nechal ohřát na laboratorní teplotu a poté se rozpustil ve 2 ml příslušné mobilní fáze. Pokud byl vzorek připravován pro analýzu na ultra účinném kapalinovém chromatografu, byl navíc přefiltrován přes membránový filtr (PTFE, velikost pórů 0,22 µm).

### 3.5. Příprava mobilních fází

Mobilní fáze byly připravovány smísením jednotlivých rozpouštědel v určeném objemovém poměru. Složení jednotlivých mobilních fází použitých při optimalizaci je shrnuto v tabulce 1. Objemy byly odměřovány pomocí odměrných válců a pipet. Připravené mobilní fáze byly odplyňovány v ultrazvukové lázni minimálně 10 minut.

**Tabulka 1:** Složení mobilních fází použitých při optimalizaci

název metody	Obsah složek v MF (% v/v)					
	ACN	MeOH	voda	Pufr	HCOOH	t-BME
metoda 1	90	-	5	-	5	-
metoda 2	93	-	2	-	5	-
metoda 3	94	-	1	-	5	-
metoda 4	90	-	5	-	5	-
	95	-	-	-	5	-
metoda 5	90	2,5	2,5	-	5	-
metoda 6	90	4	1	-	5	-
metoda 7	90	-	5	-	5	-
	90	5	-	-	5	-
metoda 8	90	5	-	-	5	-
metoda 9	50	45	-	-	5	-
metoda 10	72,5	22,5	-	-	5	-
metoda 11	50	-	5	-	5	40
metoda 12	99	-	-	1	-	-
metoda 13	99	-	-	1	-	-
metoda 14	95	-	4	1	-	-

Při přípravě pufrů pro metody 12 – 14 se vycházelo z roztoku kyseliny mravenčí o koncentraci 1 mol/l. Základní roztok kyseliny mravenčí byl titrován koncentrovaným roztokem hydroxidu amonného na příslušné pH – pH 3 pro metodu 12, pH 4 pro metodu 13 a pH 5 pro metodu 14.

Protože v metodách 12 a 13 docházelo k vysrážení mravenčanu amonného, byl do mobilní fáze přidán methanol (v případě metody 12 objem 1 ml, u metody 13 objem 10 ml). Pro metodu 14 bylo změněno složení mobilní fáze (snížen obsah acetonitrilu a zvýšen obsah vody).

Při analýze reálného vzorku byly použity mobilní fáze o složení, které je uvedeno v tabulce 2. Způsob přípravy byl stejný jako u mobilních fází použitých pro optimalizaci metody. Navíc, při práci na ultraúčinném kapalinovém chromatografu byly mobilní fáze přefiltrovány přes Albet filtr ve skleněné filtrační vakuové aparatuře (Supelco).

**Tabulka 2:** Složení mobilních fází pro analýzu reálného vzorku

název metody	Obsah složek v MF (% v/v)		
	ACN	Voda	HCOOH
metoda 15	50	45	5
metoda 16	70	25	5
metoda 17	94	1	5
	70	25	5
metoda 18	94	1	5
	70	25	5
metoda 19	94	1	5
	70	25	5
metoda 20	93,5	1,5	5
	70	25	5
metoda 21	93,5	1,5	5
	70	25	5
metoda 22	94	1	5
	70	25	5
metoda 23	94,5	0,5	5
	70	25	5
metoda 24	94,5	0,5	5
	70	25	5

Je – li v metodě uvedeno složení pro dvě mobilní fáze, jedná se v této metodě o gradientovou eluci (průběh gradientu viz tabulka 3 kapitola 3.6.). Uvedené mobilní fáze jsou složky tohoto gradientu a první je uváděna složka s menší eluční silou.

Pro analýzu reálného vzorku chromatografií na reversních fázích byla připravena mobilní fáze o složení acetonitril/kyselina mravenčí v poměru 95/5 a voda/kyselina mravenčí 95/5 (metoda 25).

### 3.6. Základní parametry metod

Při optimalizaci metody na směsi standardů byla používána isokratická eluce s průtokem mobilní fáze rychlostí 0,5 ml/min. Vzorek se dávkoval částečným plněním dávkovací smyčky. Dávkovaný objem byl 5  $\mu$ l do 20  $\mu$ l dávkovací smyčky. Analýzy probíhaly za laboratorní teploty. Analyzované látky byly detekovány při vlnové délce 480 nm se záznamem spektra v rozmezí 200 – 500 nm (diode array detekce).

Analýza reálného vzorku je založena převážně na metodách s gradientovou elucí (viz tabulka 3) s průtokem mobilní fáze 0,5 ml/min. Vzorek byl dávkován přeplňováním dávkovací smyčky (20  $\mu$ l) objemem 100  $\mu$ l. Analýzy probíhaly za laboratorní teploty. Detekce probíhala při vlnové délce 480 nm se současným záznamem spektra v rozmezí vlnových délek 200 – 500 nm.

**Tabulka 3:** Gradienty složení mobilní fáze pro analýzu reálného vzorku

název metody	složení mobilní fáze	gradient složení mobilní fáze
metoda 15	ACN/ H <sub>2</sub> O /mravenčí k. 50/45/5	-
metoda 16	ACN/ H <sub>2</sub> O /mravenčí k. 70/25/5	-
metoda 17	A: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 94/1/5	0 - 7 min 100% A
	B: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 70/25/5	7 - 9 min 100% A do 100% B
		9 – 20 min 100% B
metoda 18	A: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 94/1/5	0 -2 min 100% MF A
	B: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 70/25/5	2 – 20 min 100% MF B
metoda 19	A: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 94/1/5	0 - 4 min 100% A
	B: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 70/25/5	4 - 6 min 100% A do 100% B
		6 – 20 min 100% B
metoda 20	A: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 93,5/1,5/5	0 - 4 min 100% A
	B: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 70/25/5	4 - 6 min 100% A do 100% B
		6 – 20 min 100% B
metoda 21	A: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 93,5/1,5/5	0 -2 min 100% MF A
	B: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 70/25/5	2 – 20 min 100% MF B
metoda 22	A: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 94/1/5	0 - 2 min 100% A
	B: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 70/25/5	2 - 7 min 100% A do 100% B
		7 – 20 min 100% B
metoda 23	A: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 94,5/0,5/5	0 -2 min 100% MF A
	B: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 70/25/5	2 – 20 min 100% MF B
metoda 24	A: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 94,5/0,5/5	0 - 4 min 100% A
	B: ACN/H <sub>2</sub> O/HCOOH - 70/25/5	4 - 6 min 100% A do 100% B
		6 – 20 min 100% B

Pro separaci v systému reversních fází byla použita kolona ACQUITY UPLC BEH C18 2,1 x 100 mm (velikost částic 1,7 µm) a eluce s gradientem složení mobilní fáze (0 – 17 minut, 95 % A - 15 % A, 17 – 18 minut, 95 % A). Průtok mobilní fáze byl 0,3 ml/min.

Pro analýzu látek s detekcí hmotnostní spektrometrií byl použit hmotnostní spektrometr Q-TOF Premier s ionizací kladným potenciálem (pozitivní mod). Byla nastavena online lock mass korekce a centrování. Lock mass byl nastavený na leucin-enkefalin (hodnota m/z 556,2771). Nastavení parametrů pro hmotnostní spektrometr je uvedeno v tabulce 4.

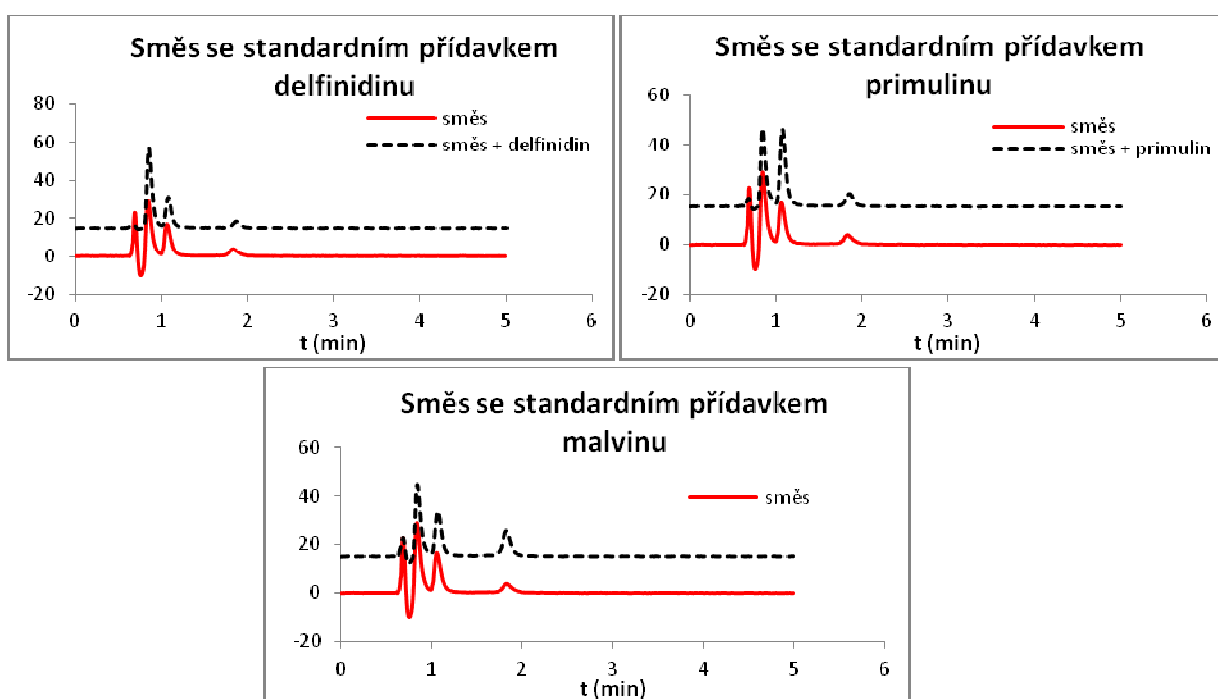
**Tabulka 4:** Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru

Parametr	HILIC monolit	HILIC částicová	RP
napětí na kapiláře	2,2 kV	2,2 kV	3,5 kV
napětí na sample cone	30 kV	30 kV	30 kV
teplota zdroje	120 °C	120 °C	120 °C
teplota desolvatace	250 °C	250 °C	250 °C
průtok plynu (cone gas)	30 l/hod	30 l/hod	30 l/hod
průtok desolvatačního plynu	250 l/hod	250 l/hod	400 l/hod
kolizní energie A	5 eV	5 eV	5 eV
kolizní energie B	30 eV	30 eV	30 eV

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. Optimalizace složení mobilní fáze pro separaci v HILIC systému

Z literatury víme, že vhodná mobilní fáze pro analýzu anthokyaninů je obvykle směs acetonitrilu, vody a kyseliny mravenčí v různém poměru a že v systému HILIC se používá vysoký obsah organické složky.<sup>14, 32</sup> Tato fakta vedla k rozhodnutí zahájit optimalizaci HILIC metody složením mobilní fáze acetonitril/voda/kyselina mravenčí v poměru 90/5/5 (v/v) (metoda 1). Obrázek 9 ukazuje chromatogram směsi v porovnání s chromatogramy směsi obohacené o konkrétní anthokyaniny.



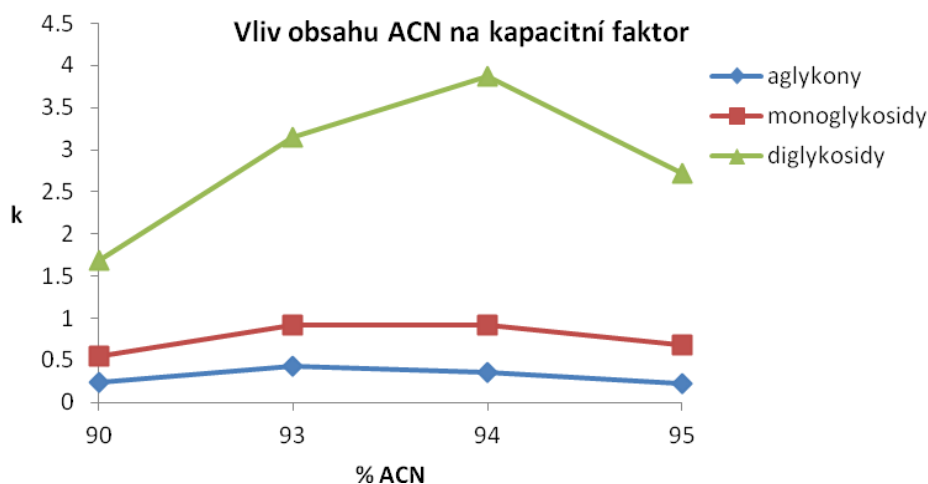
**Obr. 9:** Chromatogramy metody 1

Jak ukazují chromatogramy, zvolená metoda ve velmi krátkém čase separuje připravenou směs standardů do skupin, a to podle stupně jejich glykosylace (respektive podle rostoucí polarit). Nejvyšší retenci v tomto systému mají diglykosylované anthokyaniny (malvin a cyanin).

Úpravou poměru acetonitril/voda (při zachování 5 % (v/v) obsahu kyseliny mravenčí v mobilní fázi), při které se zvyšoval obsah acetonitrilu, byla snižována eluční síla mobilní fáze. Byly použity mobilní fáze s obsahem 90, 93, 94 a 95 % (v/v) acetonitrilu. Změna



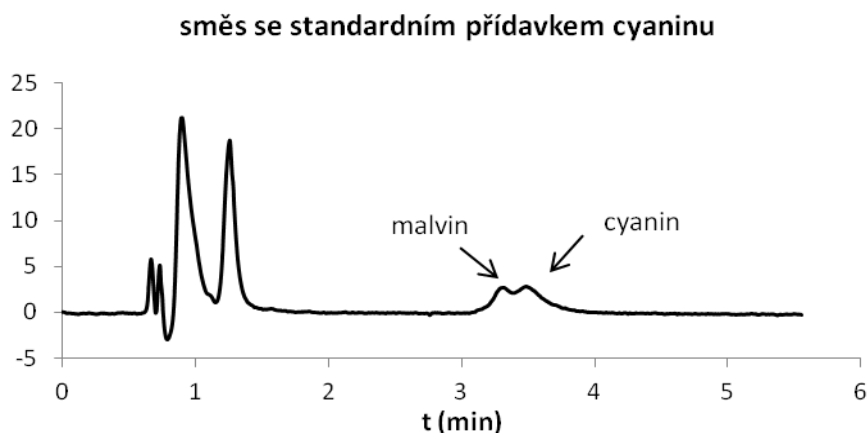
separace byla hodnocena porovnáváním chromatogramů a změnou kapacitních faktorů (obr. 10).



**Obr. 10:** Změna kapacitního faktoru v závislosti na změně obsahu acetonitrilu v mobilní fázi

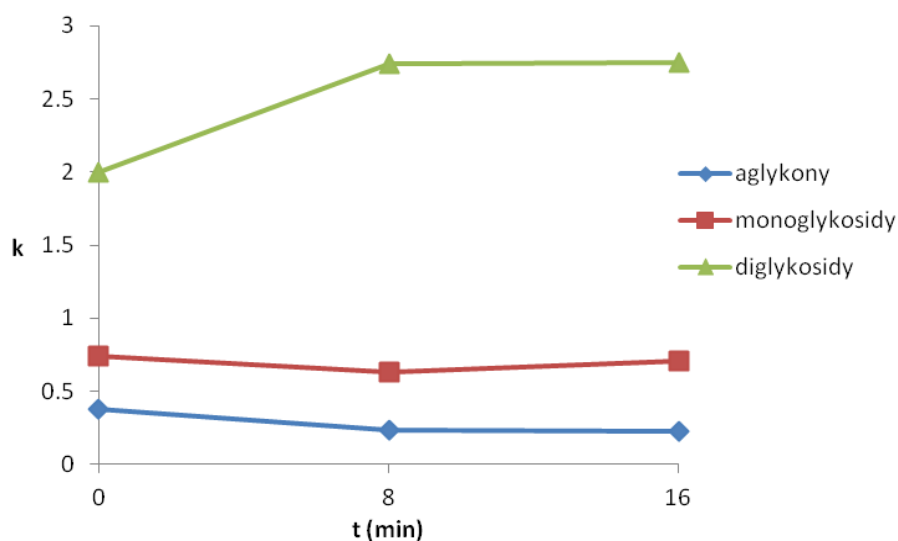
Graf ukazuje, že kapacitní faktory narůstají se zvyšujícím se obsahem acetonitrilu. V případě diglykosidů je změna kapacitního faktoru nejvýraznější, z čehož vyplývá, že jejich retence je obsahem acetonitrilu v mobilní fázi ovlivněna více než v případě aglykonů a monoglykosidů.

Z grafu je také vidět, že nejvyšší retenci vykazují diglykosidy při složení mobilní fáze acetonitril/voda/kyselina mravenčí 94/1/5. Při tomto složení mobilní fáze od sebe byly jednotlivé diglykosidy také částečně separovány, jak ukazuje chromatogram na obrázku 11.



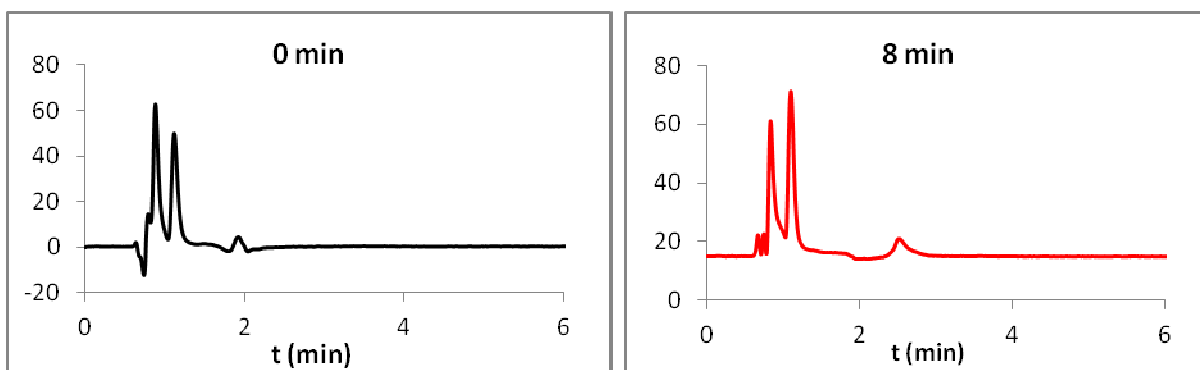
**Obr. 11:** Chromatogram směsi se standardním přídatkem cyaninu při složení mobilní fáze ACN/voda/HCOOH (94/1/5)

Pro studium retence v HILIC systému s použitím bezvodé mobilní fáze (acetonitril/kyselina mravenčí 95/5 (v/v), metoda 4) byla nejdříve kolona promyta mobilní fází acetonitril/voda/kyselina mravenčí 90/5/5 (v/v). Použitím této mobilní fáze před samotnou analýzou bylo zajištěno vytvoření vodného filmu na povrchu stacionární fáze. Opakovanými nástřiky bylo dále sledováno, jak se mění separace v závislosti na době od ustálení vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze. Změna separace je hodnocena pomocí změny kapacitních faktorů jednotlivých látek (obr. 12).



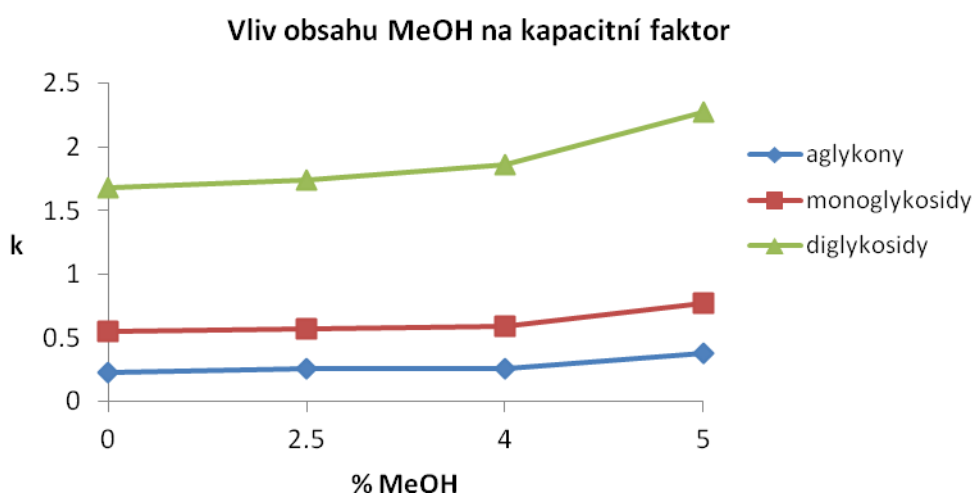
**Obr. 12:** Změna kapacitního faktoru v závislosti na době od ustálení vodné vrstvy

Je vidět, že kapacitní faktor s dobou výrazněji naroste u diglykosidů a u aglykonů a monoglykosidů se téměř nemění. V souvislosti se změnou kapacitního faktoru se mění i tvar píku, což ukazuje na změnu mechanismu retence z rozdělování na adsorpci (obr. 13). Otázkou pro podrobnější studie může být, jak by se analyty chovaly při prodlužujících se časech od ustálení vodné vrstvy. Hledání odpovědi přesahuje rámec této studie. Je však zřejmé, že ani při prodlužujících se časech metoda nevykazovala jinou než skupinovou selektivitu.

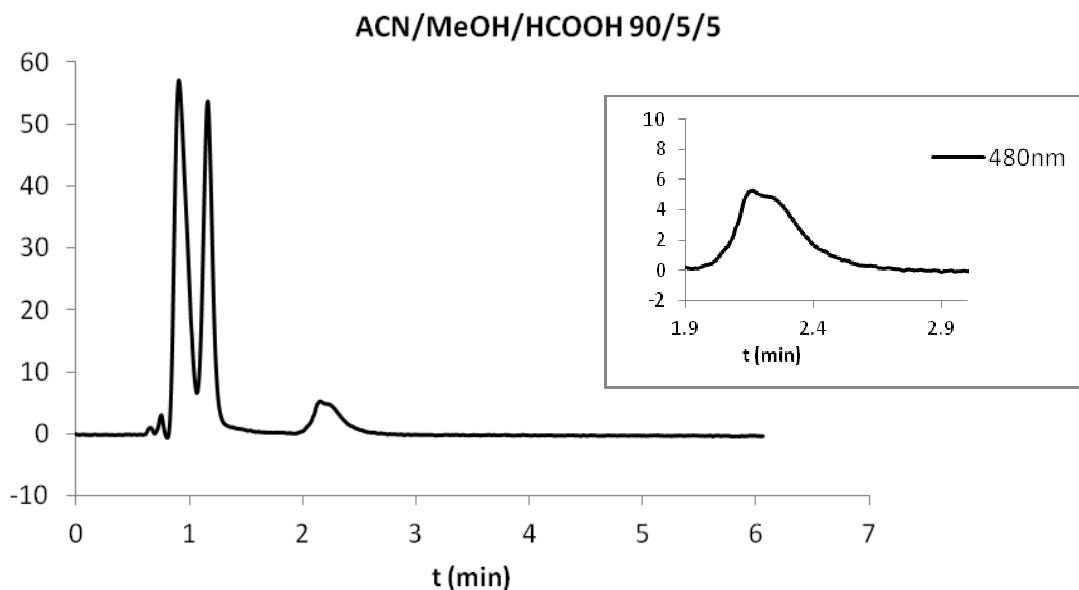


**Obr. 13:** Separace směsi standardů ihned po ustálení vodné vrstvy a 8 minut od ustálení vodné vrstvy

Literatura uvádí, že přidavek alkoholu k mobilní fázi pro systém HILIC může být výhodný především k maximalizaci retence.<sup>40</sup> Určitý podíl vody byl tedy nahrazen v mobilní fázi methanolem. S rostoucím podílem obsahu methanolu – při konstantním obsahu acetonitrilu a kyseliny mravenčí – jsme pozorovali (v souladu s teorií), že kapacitní faktor mírně roste (viz obr. 14). V případě 5 % (v/v) obsahu methanolu se na chromatogramu objevuje i náznak separace diglykosidů, jak ukazuje obr. 15.

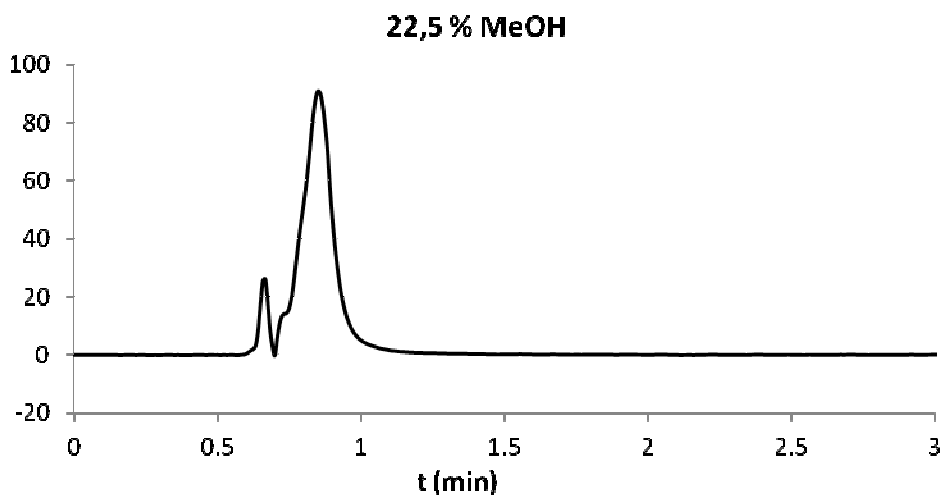


**Obr. 14:** Vliv přidavku methanolu na kapacitní faktor



**Obr. 15:** Chromatografický záznam pro mobilní fázi obsahující 5 % methanolu s detailem píku diglykosidů

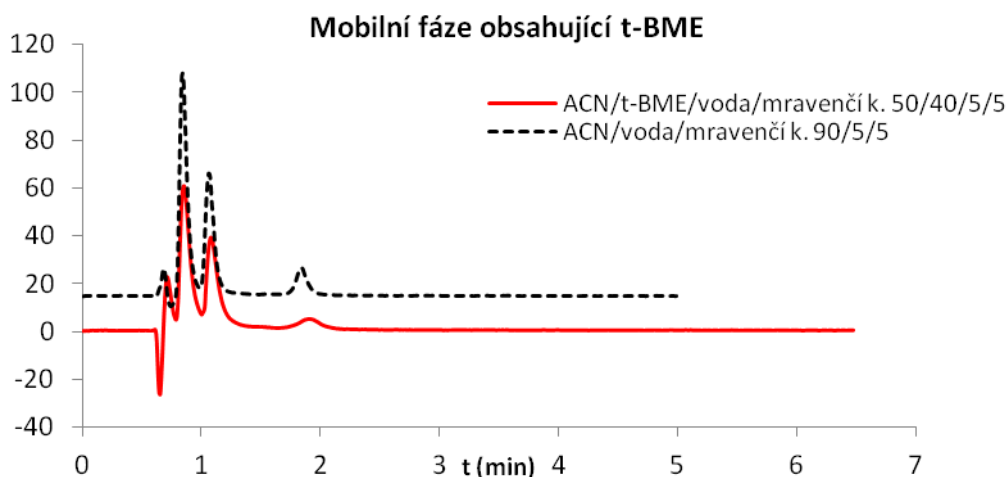
Dalším zvyšováním obsahu methanolu na úkor obsahu acetonitrilu se separace výrazně zhoršuje. Při složení mobilní fáze acetonitril/methanol/kyselina mravenčí 72,5/22,5/5 (v/v) v podstatě nedochází k žádné separaci, jak ukazuje obrázek 16.



**Obr. 16:** Chromatogram pro metodu se složením mobilní fáze acetonitril/methanol/kyselina mravenčí (72,5/22,5/5)

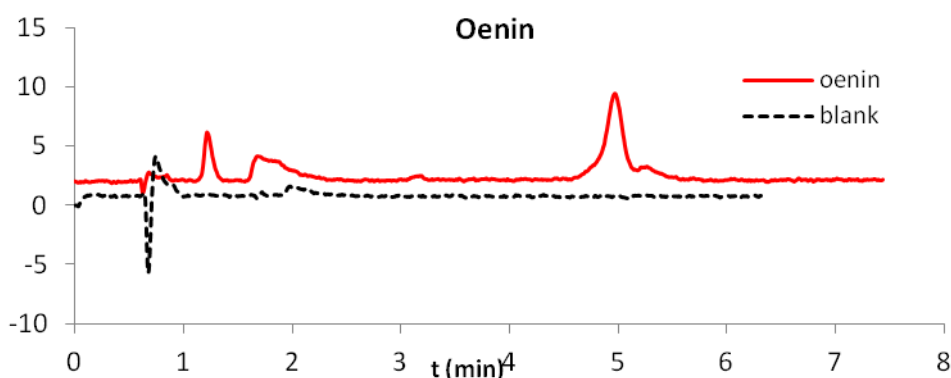
Jako další složka mobilní fáze byl zkoušen t-butylmethylether. Předpokládali jsme, že přidavkem t-butylmethyletheru dojde ke snížení polaritě mobilní fáze a tím ke zvýšení retence analyzovaných látek. Polaritní index u ACN je 5,8 a u t-butylmethyletheru je 2,5,

snížení polariry je tedy významné. Jeho použití však separaci nijak nezlepšilo. Směs standardů je opět separována podle stupně glykosylace s o něco vyšší retencí diglykosidů. Nicméně tvar píku diglykosidů se oproti metodě s mobilní fází ACN/voda/kyselina mravenčí 90/5/5 zhoršil (obr. 17).



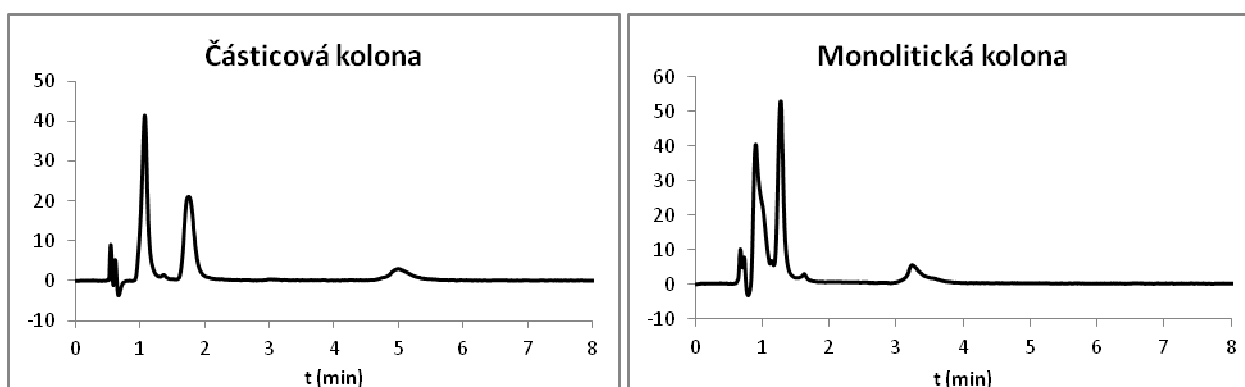
**Obr. 17:** Separace metodou s mobilní fází ACN/t-BME/voda/mravenčí k. 50/40/5/5

V chromatografii je často důležité pH použité mobilní fáze, proto jsme v další skupině metod zkusili složení mobilní fáze acetonitril/pufr při různém pH. Bylo použito pH 3, 4, 5. Při zvolených pH se separace značně zhoršovala. Navíc, i identifikace jednotlivých anthokyaninů ve směsi se stávala problémem. Uplatňují se zde pravděpodobně již další acidobazické formy anthokyaninů, které mají různou retenci a kinetika jejich vzájemné přeměny je poměrně pomalá. I při analýze jednoho anthokyaninu vidíme na chromatogramu více píků.



**Obr. 18:** Analýza standardu oeninu při pH 5

Možnosti HILIC chromatografie byly vedle monolitické fáze testovány i na moderní fázi částicové. Byla testována kolona Kinetex HILIC naplněná povrchově porézním sorbentem. Pro analýzu byla vzata jako nejvhodnější metoda se složením mobilní fáze acetonitril/voda/kyselina mravenčí 94/1/5 a kolona Kinetex 100 x 2,1 mm s částicemi o velikosti 2,6  $\mu\text{m}$ . Jak je vidět z obrázku 19, částicová kolona za použití stejného složení a průtoku mobilní fáze poskytuje lepší separaci než monolitická kolona. Dochází ke zvýšení retence všech antokyaninů. Retence diglykosylovaných barviv se prodloužila o necelé 2 minuty.



**Obr. 19:** Srovnání separace na částicové a monolitické koloně

#### 4.2. Optimalizace HILIC metody pro analýzu anthokyaninů v reálném vzorku

Jako reálný vzorek byl v této práci použit extrakt z červeného zelí. Tuto rostlinu jsme si vybrali proto, že je bohatým zdrojem anthokyaninů a tyto jsou dobře popsány. Jde z velké části o diglykosylovaná a acylovaná barviva. Arapitsas a jeho kolegové ve své práci<sup>16</sup> analyzovali extrakt červeného zelí optimalizovanou metodou na koloně Zorbax SB-C18 (100 x 2,1 mm,  $d_p = 1,8 \mu\text{m}$ ) a identifikovali 24 různých anthokyaninů. Data z jejich LC/MS analýzy byla využita pro potvrzení identifikace anthokyaninů při LC/MS analýze, která následovala po optimalizaci chromatografické metody pro reálný vzorek.

Protože se při optimalizaci na směsi standardů ukázala být velmi vhodná metoda se složením mobilní fáze ACN/voda/kyselina mravenčí 94/1/5, vycházelo se při analýze (respektive při optimalizaci metody pro analýzu) reálného vzorku právě z ní. Vedle toho byly vyzkoušeny dvě metody s vyšší eluční silou (metoda 15 a 16, tabulka 3). Optimální mobilní fáze (ACN/voda/kyselina mravenčí 94/1/5, v/v/v) v kombinaci s mobilní fází o složení acetonitril/voda/kyselina mravenčí 70/25/5 byla použita pro gradientovou eluci.

Bylo vyzkoušeno 8 metod s různým gradientem složení mobilní fáze a s různou mobilní fází s nižší eluční silou. Metoda 17 (tabulka 3) je přípravným experimentem pro optimalizaci gradientové eluce a je z hlediska gradientu hraniční. Analyty jsou separovány izokraticky a složka s vyšší eluční silou je použita pro vymytí balastních látek z kolony.

K vyhodnocení separace složek reálného vzorku metodami 18 – 24 byla použita chromatografická optimalizační funkce. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.3., může být chromatografická funkce definována různě. Pro účely této práce jsme definovali chromatografickou funkci rovnicí:

$$COF = \alpha \sum R_i + N^\beta + \gamma(t_{R,\max} - t_{R,x}) + \delta(t_{R,1} - t_{R,0})$$

kde  $R_i$  je rozlišení dvou sousedních píků,  $N$  celkový počet píků na chromatogramu,  $t_{R,1}$  a  $t_{R,x}$  jsou retenční časy první a poslední eluované látky a  $t_{R,0}$  a  $t_{R,\max}$  jsou předem zvolené hodnoty minimálního a maximálního retenčního času, které jsou přípustné. Členy  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$  představují váhové koeficienty.

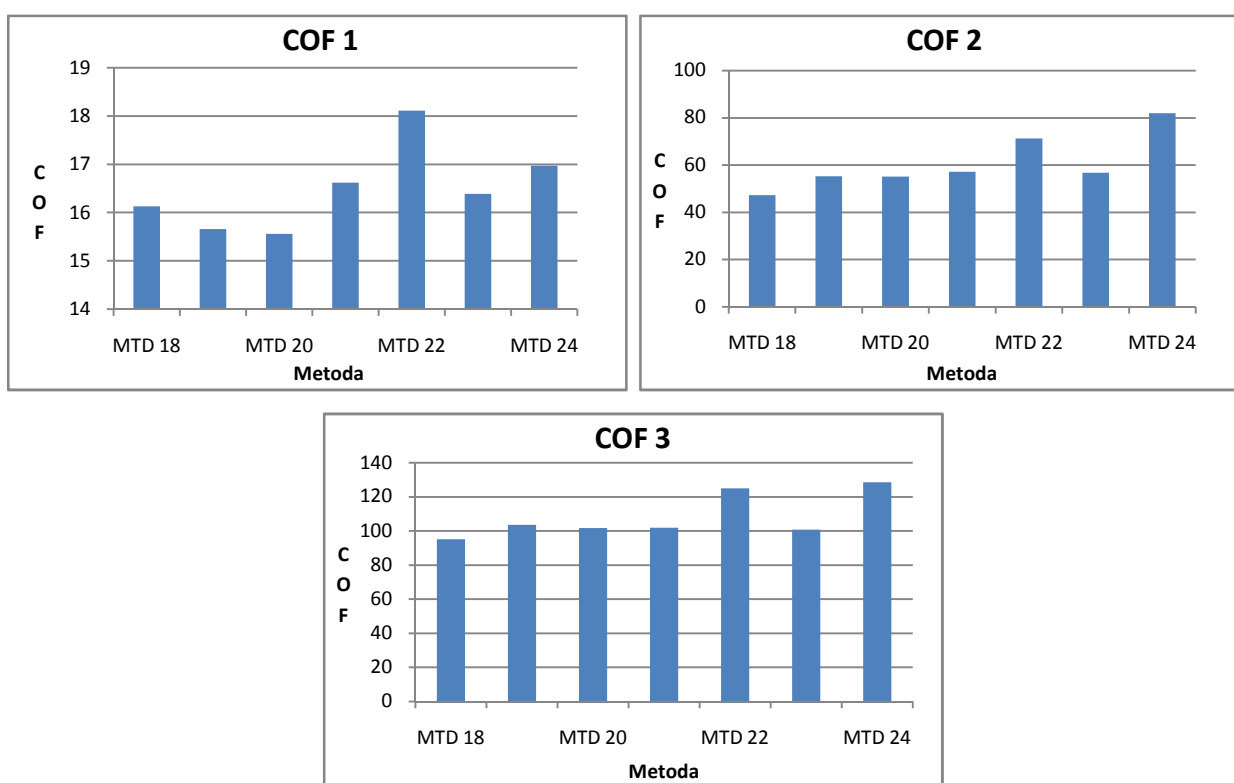
V této rovnici je volen maximální přípustný retenční čas ( $t_{R,\max}$ ) 12 minut a minimální retenční čas ( $t_{R,0}$ ) 1,2 minuty. Oba tyto parametry mají svůj význam – vyvíjená metoda by měla být rychlá, nejrychleji eluující anthokyanin by však měl být dostatečně separován od případných balastních složek eluujících s velmi malou retencí (téměř) v mrtvém čase.

Funkce COF byla počítána pro různé váhové koeficienty (tab. 4). Tyto koeficienty byly voleny podle důležitosti přikládání jednotlivým parametrům. Tedy, váhové koeficienty při výpočtu COF 1 dávají všem parametrům ve výpočtu stejnou váhu. Za těchto podmínek jsou číselné hodnoty jednotlivých členů ve funkci srovnatelné (s výjimkou minimálního času), nicméně jejich důležitost není brána v potaz. Při výpočtu COF 2 je číselná hodnota váhových koeficientů zdvojnásobena, ale ponechána stejná pro všechny členy funkce. Z nedefinování funkce COF vyplývá, že takto zvolenými parametry se klade větší důležitost na počet píků v chromatogramu, protože v tomto členu je závislost na váhovém koeficientu exponenciální ( $N^\beta$ ). Hodnoty váhových koeficientů v posledním případě jsou voleny tak, aby průměrná hodnota členů zohledňujících rozlišení a počet píků byla číselně srovnatelná, příspěvek maximálního času poloviční a minimální čas měl desetkrát menší váhu než rozlišení.

Takovéto nastavení chromatografické funkce dává největší význam kvalitě separace, ale efektivně zohledňuje i dobu analýzy. Vypočtené hodnoty srovnávají grafy na obrázku.

**Tabulka 5:** Váhové koeficienty pro výpočet COF

COF	váhový koeficient			
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
1	1	1	1	1
2	2	2	2	2
3	8	2	5	7



**Obr. 20:** Porovnání hodnot COF funkce pro jednotlivé váhové koeficienty

Z jednotlivých grafů je vidět, že s měnícími se váhovými koeficienty se poměrně výrazně mění i hodnoty COF. Vyplývá z nich, že v případě stejné důležitosti všech parametrů je nejvýhodnější metodou metoda 22. Pokud však přidělíme větší důležitost počtu píků v chromatogramu, pořadí metod se výrazně změní a jako nejvýhodnější se ukáže být metoda 24. Při výpočtu podle nastavení parametrů pro COF 3 se hodnoty COF funkce výrazně srovnávají. I v případě použití váhových koeficientů třetím způsobem však nabývá největší hodnoty COF metoda 24.



### 4.3. LC/MS metoda pro analýzu anthokyaninů v extraktu z červeného zelí

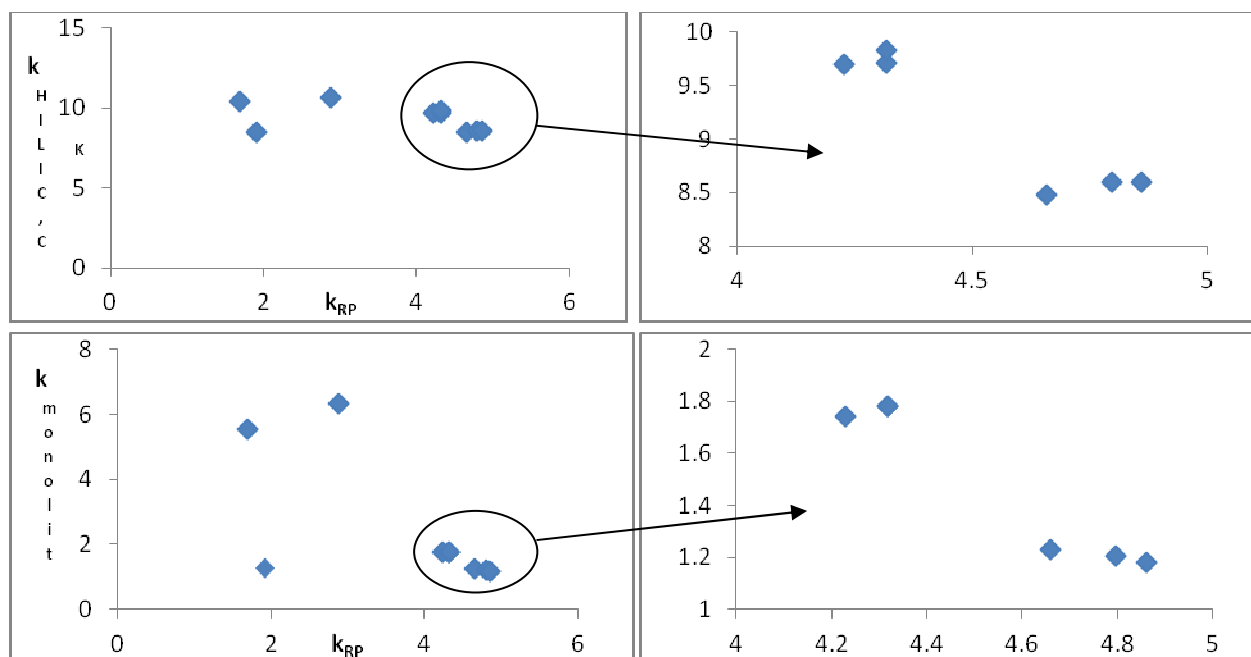
Metoda 24 byla dále použita pro analýzu technikou LC/MS. Touto technikou byl analyzován extrakt červeného zelí na monolitické a částicové koloně v systému HILIC. Dále byla použita metoda 25 na částicové koloně v systému reversních fází. Z hodnot m/z s přihlédnutím k fragmentaci a porovnáním s daty Arapitsase a kol.<sup>16</sup> bylo identifikováno 9 různých anthokyaninů, které jsou v červeném zelí obsaženy (viz tabulka 6).

**Tabulka 6:** Anthokyaniny nalezené v extraktu červeného zelí

Název molekuly	přesná hmota	naměřená hmota	sumární vzorec	t <sub>r</sub> HILIC CK	t <sub>r</sub> HILIC monolit	t <sub>r</sub> RP
cyan-3,5-diglu	611,1612	611,1563	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> <sup>+</sup>	4,95	1,77	2,3
cyan-3-soph-5-glu	773,214	773,2211	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>21</sub> <sup>+</sup>	5,94	5,1	2,12
cyan-3-(p-coum)diglu-5-glu	919,2508	919,2562	C <sub>42</sub> H <sub>47</sub> O <sub>23</sub> <sup>+</sup>	5,56	2,14	4,13
cyan-3-(fer)soph-5-glu	949,2614	949,2697	C <sub>43</sub> H <sub>49</sub> O <sub>24</sub> <sup>+</sup>	5,57	2,17	4,2
cyan-3-(sin)soph-5-glu	979,2719	979,2832	C <sub>44</sub> H <sub>51</sub> O <sub>25</sub> <sup>+</sup>	5,63	2,17	4,2
cyan-3-(caf)(p-coum)soph-5-glu	1081,283	1081,31	C <sub>51</sub> H <sub>53</sub> O <sub>26</sub> <sup>+</sup>	6,08	5,71	3,07
cyan-3-(fer)(fer)-diglu-5-glu	1125,309	1125,316	C <sub>53</sub> H <sub>57</sub> O <sub>27</sub> <sup>+</sup>	4,93	1,74	4,47
cyan-3-(sin)(fer)soph-5-glu	1155,319	1155,327	C <sub>57</sub> H <sub>59</sub> O <sub>28</sub> <sup>+</sup>	4,99	1,72	4,58
cyan-3-(sin)(sin)soph-5-glu	1185,33	1185,341	C <sub>55</sub> H <sub>61</sub> O <sub>29</sub> <sup>+</sup>	4,99	1,7	4,63

cyan = cyanidin, glu = glukosid, soph = sophorosid, p-coum = p-kumaroyl, fer = feruloyl, sin = sinapoyl, caf = caffeoyl

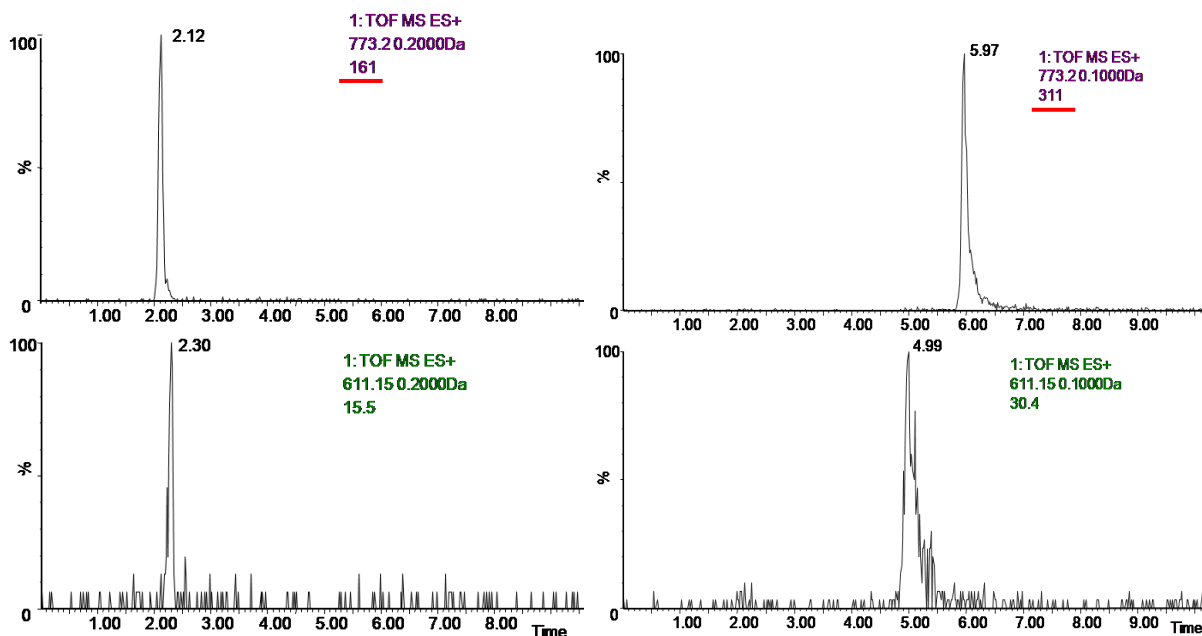
Obrázek 21 hodnotí separaci látek na částicové a monolitické koloně proti separaci látek v reversních fázích (pomocí kapacitních faktorů).



**Obr. 21:** Srovnání kapacitních faktorů anthokyaninů na monolitu a částicové koloně v systému HILIC s kapacitními faktory na reversních fázích

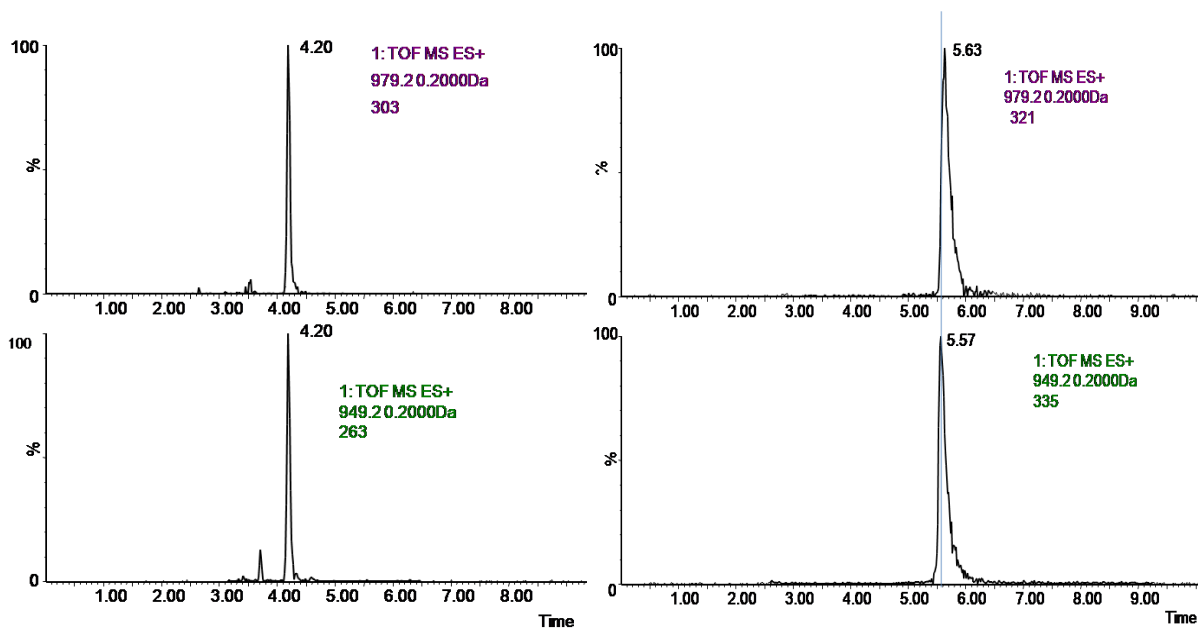
Srovnáme – li výsledky pro monolitickou a částicovou kolonu v systému HILIC, dojdeme k závěru, že pro některé látky poskytuje lepší separaci kolona monolitická (látky s  $m/z$  611,15 a 773,2), pro jiné zase kolona částicová (látky s  $m/z$  949,2 a 979,2). Dále je vidět, že studované látky mají na částicové koloně v systému HILIC vyšší retenci než v případě separace na koloně monolitické i na reversních fázích. Nicméně velkou výhodou monolitické kolony je pracovní tlak. Při průtoku mobilní fáze (složení metoda 24) rychlostí 0,5 ml/min byl na monolitické koloně tlak do 40 bar, zatímco u částicové kolony se tlak pohyboval mezi 150 a 160 bar.

Vidíme, že látka s  $m/z$  611, která je v systému reversních fází jen částečně separována od látky s  $m/z$  773,2 se v systému HILIC separuje lépe, což pro reversní fáze a částicovou kolonu v systému HILIC dokazuje i obrázek 22. Z tohoto obrázku je i zřejmá vyšší intenzita signálu v systému HILIC.



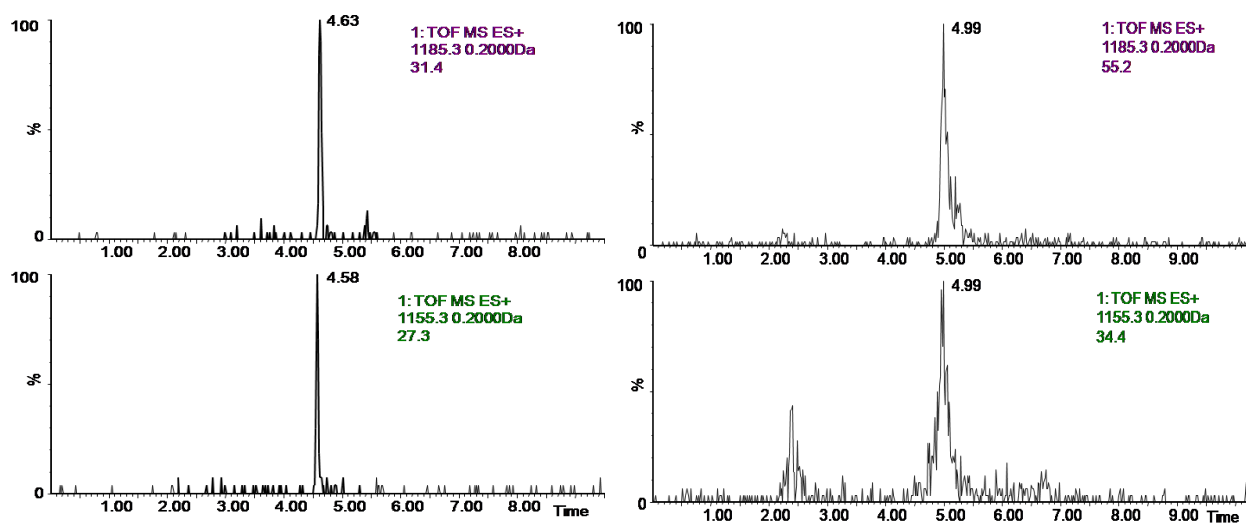
**Obr. 22:** Separace látky s  $m/z$  611,1 a látky s  $m/z$  773,2 na reversních fázích (vlevo) a na částicové koloně v systému HILIC (vpravo)

Z grafů je také zřejmé, že zde jsou dvě trojice barviv s vzájemně velmi blízkou retencí v systému HILIC i na reversní fázi. Ukázalo se však, že látky s  $m/z$  979,2 a 949,2, které se na reversních fázích nedělí, jsme v systému HILIC na částicové koloně schopni částečně rozlišit, což ukazuje také obr. 23.



**Obr. 23:** Separace iontů o  $m/z$  979,2 a 949,2 v systému reversních fází (vlevo) a na částicové koloně v systému HILIC (vpravo)

Naopak, látky s  $m/z$  1155,3 a 1185,3 jsou částečně separovány v systému reversních fází, ale systém HILIC tyto látky neseparuje (jak ukazuje obr. 24).



**Obr. 24:** Separace látky s  $m/z$  1155,3 a 1185,3 na reversních fázích (vlevo) a na částicové koloně v systému HILIC (vpravo)

## 5. Závěr

V předložené práci jsem se věnovala analýze anthokyaninů pomocí HILIC chromatografie.

Teoretická část práce se zabývala barvou vína (za kterou mohou převážně anthokyaniny ve víně obsažené) a možnostmi její kontroly. Věnovala se anthokyaninům, jako široce rozšířeným přírodním barvivům. Seznámila nás s jejich strukturou, vlastnostmi a popsanými metodami pro jejich analýzu. Dále se zabývala chromatografií, jako nejběžnější technikou pro analýzu anthokyaninů. Ve stručnosti shrnula základní princip této metody a podrobněji se věnovala chromatografii v systému HILIC a chromatografickým kolonám.

Experimentální část práce byla věnována optimalizaci metody pro HILIC chromatografii. Optimalizovalo se složení, eluční síla a pH mobilní fáze. Optimalizovaná metoda byla použita pro analýzu extraktu červeného zelí metodou LC/MS. V systému HILIC byly provedeny analýzy na částicové a monolitické koloně. Tyto analýzy byly srovnávány mezi sebou a dále s analýzou, která byla provedena generickou metodou v systému reverzních fází.

Získané výsledky ukazují, že HILIC chromatografie i přes velmi pečlivou optimalizaci v širokém rozsahu experimentálních parametrů neumožňuje rozlišení jednotlivých anthokyaninů tak kvalitně jako reverzní fáze. Je ovšem aplikovatelná v případě, že úkolem je místo detailní analýzy anthokyaninů například velmi rychlé sledování stupně jejich glykosylace. Spojení s hmotnostní spektrometrií pak může v řadě případů nižší chromatografické rozlišení vyrovnat. Vyšší obsah acetonitrilu v mobilní fázi pro HILIC oproti mobilní fázi pro reverzní fázi je výhodný pro zlepšení ionizace elektrospřejem a tím snížení limitu detekce pro HILIC systém.

V extraktu červeného zelí lze nalézt některé dvojice látek, které jsou v systému HILIC chromatografie separovány lépe než na reverzní fázi. Jde o látky diglykosylované, u kterých se polární interakce mohou dobře uplatnit. To ukazuje na možný směr dalšího zkoumání – separace polyglykosylovaných flavonoidů.

HILIC chromatografie na monolitické stacionární fázi dovoluje nadto práci za velmi nízkých tlaků a otevírá tak cestu k rychlé chromatografické analýze bez nutnosti použití drahých chromatografických čerpadel (respektive může výrazně zvýšit jejich životnost).

## 6. Seznam zkratk

ACN	acetonitril
COF	chromatografická optimalizační funkce
DAD (PDA)	detektor diodového pole (diode array detector)
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí (Hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
IC	iontově výměnná chromatografie (ionexchange chromatography)
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
L – L	(extrakce) kapalina – kapalina (liquid – liquid (extraction))
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NP	normální fáze (normal phase)
PTFE	polytetrafluorethylen
R <sub>f</sub>	retardační faktor
RP	reverzní fáze (reversed phase)
SF	stacionární fáze
SPE	extrakce tuhou fází (solid phase extraction)
UHPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography)
UV	(záření) ultra fialové (ultra violet)
t – BME	t-butylmethyleter
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
TOF	(analyzátor) doby letu (time of flight)

## 7. Seznam literatury

1. Wrolstad R. E., Acree T. E., Decker E. A., Penner M. H., Reid D. S., Schwartz S. J., Shoemaker Ch. F., Smith D., Sporns P. (Eds): *Handbook of Food Analytical Chemistry*. Wiley & Sons, New Jersey 2005.
2. Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Sbírka zákonů 2008, částka 3.
3. <http://www.prodej-vina.info/o-vine/historie-vina/>, staženo 28. března 2013.
4. Vyhláška č. 323/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o vinohradnictví a vinařství. Sbírka zákonů 2004, částka 105.
5. Nařízení rady (ES) č. 479/2008, o společné organizaci trhu s vínem, o změně nařízení (ES) č. 1493/1999, (ES) č. 1782/2003, (ES) č. 1290/2005 a (ES) č. 3/2008 a o zrušení nařízení (EHS) č. 2392/86 a (ES) č. 1493/1999. Úřední věstník L148 2008.
6. Stávek J., Balík J., Šimonovič D., Tománková E.: *Barevný potenciál vín z modrých odrůd révy vinné*. <http://www.enolog.cz/>, staženo 27. prosince 2012.
7. <http://www.wineofczechrepublic.cz/4-2-vyroba-vina-cz.html>, staženo 3. ledna 2013.
8. <http://www.moraviavitis.cz>, staženo 3. ledna 2013.
9. [http://www.lidovky.cz/kontrola-odhalila-pancovana-vina-obsahovala-az-66-vody-pd5-/zpravy-domov.aspx?c=A110124\\_223507\\_firmy-trhy\\_ape](http://www.lidovky.cz/kontrola-odhalila-pancovana-vina-obsahovala-az-66-vody-pd5-/zpravy-domov.aspx?c=A110124_223507_firmy-trhy_ape), staženo 3. února 2013.
10. Zákon č. 321/2004 Sb., o vinohradnictví a vinařství a o změně některých souvisejících zákonů (zákon o vinohradnictví a vinařství). Sbírka zákonů 28. 2004, částka 105.
11. Šottníková V., Cwíková O., Králová L.: *Potravinářstvo* 2, 69 (2010).
12. Vošmerová D., Vespalcová M., Mikušová R., Suský J.: *XXXIII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr, 27. – 29. května 2002*, Sborník souhrnu sdělení (bez editora), str. 7. České společnosti chemické, Odbor potravinářské techniky a technologie ČAZV, Odbor výživy obyvatelstva a jakosti potravin ČAZV, Výzkumný ústav potravinářský Praha, Ústav chemie a analýzy potravin VŠCHT Praha, 2002.
13. Velíšek J.: *Chemie potravin* 3. OSSIS, Tábor 1999.
14. Valls J., Millán S., Marti M. P., Borràs E., Arola L.: *J. Chromatogr. A* 1216, 7143 (2009).
15. Santos – Buelga C., Williamson G. (Eds): *Methods in Polyphenol Analysis*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2003.



16. Arapitsas P., Sjöberg P. J. R., Turner Ch.: *Food Chem.* 109, 219 (2008).
17. Bridle P., Timberlake C. F.: *Food Chem.* 58, 103 (1997).
18. Bechtold T., Mussak R. (Eds): *Handbook of Natural Colorants*. John Wiley & sons, Chichester 2009.
19. Konzczak I., Zhang W.: *J. Biomed. Biotechnol.* 5, 239 (2004).
20. Kong J. M., Chia L. S., Goh N. K., Chia T. F., Brouillard R.: *Phytochemistry* 64, 923 (2003).
21. Churáček J., Jandera P., Krupčík J., Polonský J., Popl M., Vláčil F.: *Analytická separace látek*. SNTL, Praha 1990.
22. Miawa J. H., Alasandro M. S., Riley Ch. M.: *J. Chromatogr. A* 769, 145 (1997).
23. Guichon G.: *J. Anal. Chem.* 1-2, 101 (2007).
24. Houston Smith J.: *Dissertation*. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 2002.
25. Oberacher H., Huber Ch. G.: *Trac – Trend. Anal. Chem.* 3, 166 (2002)
26. Kobayashi H., Ikegami T., Kimura H., Hara T., Tokuda D., Tanaka N.: *Anal. Sci.* 4, 491 (2006).
27. Gritti F., Guiochon G.: *J. Anal. Chem.* 10, 1604 (2010).
28. Kazakevich Y., Lobrutto R. (Eds): *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Wiley & Sons, New Jersey 2007.
29. <http://www.hilic.com>, staženo 31. října 2012.
30. Beumer J. H.: *Hydrophilic Interaction Chromatography*. <http://www.labint-online.com>, staženo 31. října 2012.
31. Hemström P., Irgum K.: *J. Sep. Sci.* 29, 1784 (2006).
32. Buszewski B., Noga S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 1, 231 (2012).
33. Jandera P.: *J. Sep. Sci.* 31, 1421 (2008).
34. Jandera P.: *Chemagazin* 2, 8 (2011).
35. [http://www.infoagil.ch/e/hilic/zic\\_hilic.html](http://www.infoagil.ch/e/hilic/zic_hilic.html), staženo 1. listopadu 2012.
36. Petruczynik A., Waksmundzka - Hajnos M.: *Acta Chromatogr.* 1, 1 (2013).

37. Brown S. D., White C. A., Bartlett M. G.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* *16*, 1871 (2002).
38. Itoh S., Roemling R.: *HILIC-MS - High Resolution and Sensitivity for the Analysis of Very Polar Compounds*. <http://www.separations.eu.tosohbioscience.com>, staženo 26. března 2013.
39. Heaton J., Smith N. W.: *Chromatography today 2012*, 44.
40. Grumbach E. S., Diehl D. M., Neue U. D.: *J. Sep. Sci.* *31*, 1511 (2008).