

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2023

Bc. Hana Nadhajská

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Retenční chování vybraných alkaloidů v systému s obrácenými fázemi

Bc. Hana Nadhajská

Diplomová práce

2023

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Retention behavior of selected alkaloids in a reversed phase system

Bc. Hana Nadhajská

Diploma thesis

2023

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Hana Nadhajska**
Osobní číslo: **C21414**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Retenční chování vybraných alkaloidů v systému s obrácenými fázemi**
Téma práce anglicky: **Retention behavior of selected alkaloids in reversed-phase system**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V teoretické části podejte přiměřený úvod do problematiky moderní kapalinové chromatografie. Proveďte literární rešerši separaci vybraných alkaloidů (kofein, theobromin, theofyllin, chinin, chinidin, cinchonin, cinchonidin) kapalinovou chromatografií v systému s obrácenými fázemi.
2. Na vybraných kolonách proměřte v systému s obrácenými fázemi retenční chování alkaloidů v mobilních fázích obsahujících acetonitril a vodu s iontovými aditivy.
3. Na základě izokratických retenčních dat proveďte výpočetní optimalizaci parametrů separace metodou okénkových diagramů. Pro vybranou kolonu proveďte predikci gradientových retenčních dat z isokratického retenčního modelu. Porovnejte dosažené výsledky s experimentálními daty gradientové eluce.
4. Získaná data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Ing. Michal Kašpar**
Katedra analytické chemie
Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 2.5.2023

Bc. Nadhajská Hana

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla vyjádřit poděkování vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce a cenné rady během jejího vytváření. Dále bych chtěla poděkovat také svému konzultantovi Ing. Michalu Kašparovi za jeho vstřícnost, trpělivost a poskytnutí pomoci při řešení problémů spojených s diplomovou prací. Neocenitelný dík patří také mým rodičům za umožnění studia a podporu po celou jeho délku.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá studiem separace alkaloidů chinovníku společně s kofeinem a jeho dvěma hlavními metabolity pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi. V teoretické části je nejprve charakterizována metoda kapalinové chromatografie, což zahrnuje instrumentaci kapalinového chromatografu, fázové systémy a popis procesu optimalizace chromatografických separací. V druhé polovině teoretické části jsou popsány jednotlivé skupiny alkaloidů, jejich vlastnosti a využití. Cíle experimentální práce spočívaly v optimalizaci izokratické separace na pěti chromatografických kolonách a výběru dvou nejvhodnějších kolon pro dané separace, které byly následně využity pro tvorbu metody za podmínek gradientové eluce.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alkaloidy

Kapalinová chromatografie

Optimalizace izokratické eluce

Gradientová eluce

ANNOTATION

This diploma thesis deals with the study of the separation of cinchona alkaloids together with caffeine and its two main metabolites using liquid chromatography in a reversed-phase system. In the theoretical part, at first, the method of liquid chromatography is characterized, which includes the instrumentation of the liquid chromatograph, phase systems and a description of the optimization process of chromatographic separations. In the second half of the theoretical part, individual groups of alkaloids are described including their properties and uses. The goals of the experimental work consisted of the optimization of isocratic separation on five chromatographic columns and the selection of the two most suitable columns for the given separations, which were subsequently used to create a method under gradient elution conditions.

KEYWORDS

Alkaloids

Liquid chromatography

Optimization of isocratic elution

Gradient elution

OBSAH

Úvod.....	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	16
1.1.1 Instrumentace	17
1.1.2 Systémy HPLC	24
1.1.3 Optimalizace chromatografické separace.....	26
1.2 Alkaloidy.....	29
1.2.1 Chinolinové alkaloidy	30
1.2.2 Purinové alkaloidy.....	34
1.2.3 Pyridinové alkaloidy.....	38
1.2.4 Piperidinové alkaloidy.....	39
1.2.5 Pyrrolizidinové alkaloidy	39
1.2.6 Chinolizidinové alkaloidy	40
1.2.7 Steroidní glykoalkaloidy	40
1.2.8 Kapsaicinoidy	41
1.2.9 Analýza vybraných alkaloidů separačními technikami.....	42
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	45
2.1 Materiál a chemikálie.....	45
2.1.1 Přístrojové vybavení.....	45
2.1.2 Kolony	46
2.1.3 Chemikálie.....	46
2.1.4 Standardní látky.....	46
2.2 Příprava roztoků standardů	47
2.3 HPLC analýza standardů.....	47
3 VÝSLEDKY A DISKUSE	49
3.1 Optimalizace izokratické eluce	49

3.1.1	Luna Omega Polar C18	50
3.1.2	Luna Omega PS C18	52
3.1.3	Kinetex Biphenyl.....	53
3.1.4	ACE C18-PFP	55
3.1.5	Kinetex Polar C18	56
3.1.6	Srovnání průběhu separací na jednotlivých kolonách.....	58
3.2	Analýza v podmínkách gradientu.....	61
4	ZÁVĚR	63
5	Použitá literatura	65
6	Přílohy.....	74

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma kapalinového chromatografu	17
Obrázek 2: Schéma šesticestného smyčkového dávkovače.....	19
Obrázek 3: Schéma detektoru s diodovým polem	22
Obrázek 4: Struktura chinolinu.....	30
Obrázek 5: Struktura rubanu.....	30
Obrázek 6: Struktura chininu.....	31
Obrázek 7: Struktura chinidinu.....	32
Obrázek 8: Struktura cinchoninu	33
Obrázek 9: Struktura cinchonidinu	33
Obrázek 10: Struktura purinu	34
Obrázek 11: Struktura xantinu.....	34
Obrázek 12: Struktura kofeinu.....	35
Obrázek 13: Struktura teobrominu	36
Obrázek 14: Struktura teofylinu	37
Obrázek 15: Struktura pyridinu	38
Obrázek 16: Struktura pyrrolidinu.....	38
Obrázek 17: Struktura piperidinu	39
Obrázek 18: Struktura pyrrolizidinu	40
Obrázek 19: Struktura chinolizidinu.....	40
Obrázek 20: Struktura cholestanu.....	41
Obrázek 21: Struktura vanillylaminu.....	41
Obrázek 22: Okénkovaný diagram pro kolonu Luna Omega Polar C18.....	51
Obrázek 23: Okénkovaný diagram pro kolonu Luna Omega PS C18.....	53
Obrázek 24: Okénkovaný diagram pro kolonu Kinetex Biphenyl	54
Obrázek 25: Okénkovaný diagram pro kolonu ACE C18 PFP	56
Obrázek 26: Okénkovaný diagram pro kolonu Kinetex Polar C18.....	57
Obrázek 27: Teoretický model chromatogramu za optimálních podmínek na koloně Luna Omega Polar C18.....	58
Obrázek 28: Teoretický model chromatogramu za optimálních podmínek na koloně Luna Omega PS C18.....	59
Obrázek 29: Teoretický model chromatogramu za optimálních podmínek na koloně Kinetex Biphenyl.....	59

Obrázek 30: Teoretický model chromatogramu za optimálních podmínek na koloně ACE-C18 PFP	60
Obrázek 31: Teoretický model chromatogramu za optimálních podmínek na koloně Kinetex Polar C18	60
Obrázek 32: Chromatogram v podmínkách gradientu na koloně Luna Omega Polar C18 ...	62
Obrázek 33: Chromatogram v podmínkách gradientu na koloně ACE C18-PFP	62

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení mobilních fází u jednotlivých kolon.....	48
Tabulka 2: Hodnoty retenčních faktorů pro kolonu Luna Omega Polar C18.....	51
Tabulka 3: Hodnoty retenčních faktorů pro kolonu Luna Omega PS C18.....	52
Tabulka 4: Hodnoty retenčních faktorů pro kolonu Kinetex Biphenyl	54
Tabulka 5: Hodnoty retenčních faktorů pro kolonu ACE C18-PFP	55
Tabulka 6: Hodnoty retenčních faktorů pro kolonu Kinetex Polar C18.....	57

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
C18	Oktadecyl silikagel
DAD	Detektor s diodovým polem
ESI	Elektrosprejová ionizační technika
HILIC	Chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
log P	Dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol-voda
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice
MS	Hmotnostně spektrometrická detekce
m/z	Poměr hmotnosti a náboje iontu
NIRS	Infračervené spektroskopie v blízké oblasti
NP-LC	Chromatografie v systému s normálními fázemi
RP-LC	Chromatografie v systému s obrácenými fázemi
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná oblast záření

ÚVOD

Alkaloidy jsou významnou skupinou přírodních látek s širokým celosvětovým zastoupením, jejichž molekuly se vyznačují bazickou povahou, heterocyklickou strukturou a přítomností atomu dusíku. Alkaloidy se studují především pro své fyziologické účinky na živé organismy, které bývají často doprovázeny toxicitou. V této práci byly analyzovány alkaloidy chinovníku a některé purinové alkaloidy. Alkaloidy chinovníku mají využití zejména v lékařství při léčbě malárie, ale hlavní alkaloid kůry chinovníku chinin je důležitý také pro potravinářský průmysl, kde slouží jako látka k úpravě hořké chuti nápojů. Purinové alkaloidy, mezi které patří například kofein, teobromin a teofylin, jsou součástí oblíbených nápojů a potravin konzumovaných lidskou populací na denní bázi, hlavně kvůli svým stimulačním účinkům. Na základě nejrůznějších studií se v průběhu let ukázala jako nejvhodnější metoda pro identifikaci a stanovení tohoto typu látek vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) spojená se spektrofotometrickou detekcí, která byla rovněž využita v této práci.

Cílem diplomové práce bylo nalezení vhodných podmínek separace, především složení mobilní fáze, pro analýzu vybraných alkaloidů pomocí metody HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Z toho důvodu byla nejdříve vypracována literární rešerše obecně o systému HPLC, kde byl obsažen rovněž průběh optimalizace chromatografických separací. Dále byly v literární rešerši rozebírány jednotlivé skupiny alkaloidů, u nichž byly také porovnávány různé studie zabývající se analýzou alkaloidů použitých v experimentální práci. Cílem experimentální části bylo porovnat vhodnost několika různých kolon (určených pro separace v systému s obrácenými fázemi) pro využití při separaci vybraných alkaloidů. Na základě výsledků izokratické eluce byly vybrány nejlepší kolony, u kterých byla vytvořena metoda separace za podmínek gradientové eluce.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

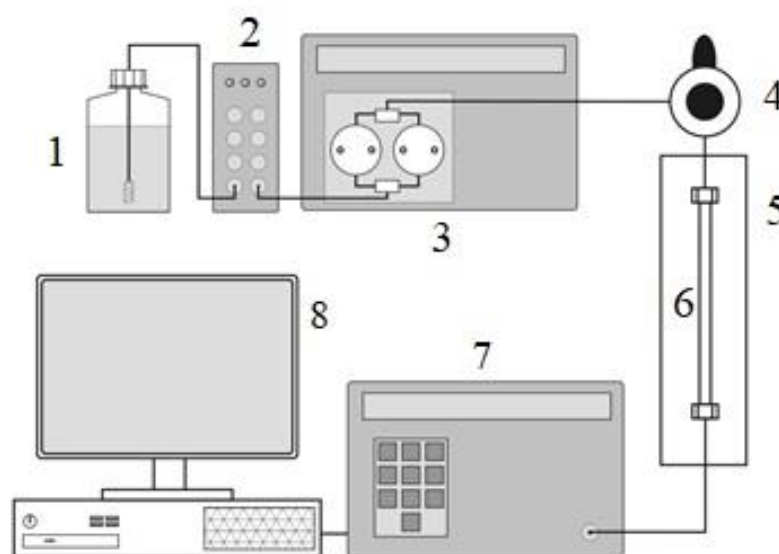
Chromatografie je separační technika, jejímž principem je dělení látek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna fáze je zakotvená v koloně (stacionární) a druhá fáze se pohybuje kolonou (mobilní). Při postupu látek kolonou dochází k transportu molekul mezi jednotlivými fázemi, přičemž se neustále obnovuje rovnováha mezi fází stacionární a fází mobilní. Při použití kapalinové chromatografie je pohyblivou fází kapalina, která prochází stacionární fází (sorbentem). Nepohyblivá fáze zde může být použita buď tuhá ve formě částecek o velikosti jednotek až desítek mikrometrů, nebo kapalná. V případě kapalně stacionární fáze se může jednat o vrstvu tenkého filmu na vnitřní stěně kapiláry, nebo o tenkou kapalnou vrstvičku nanesenou na tuhých částicích [1]. Při separaci látka prochází kolonou a každá její molekula přechází několikrát z mobilní fáze do stacionární a naopak. Jak dlouho látka zůstává v sorbentu je dáno silami vzájemných interakcí. S rostoucí silou interakcí roste doba, kterou látka v sorbentu setrvává [2].

V minulosti k průtoku mobilní fáze chromatografickou kolonou sloužila pouze gravitační síla a eluát se musel jít jednotlivě po frakcích, ve kterých se stanovení látek provádělo klasickými metodami (kolorimetrie apod.). Tento způsob byl ovšem velmi zdoluhavý a neefektivní, což vedlo ke vzniku moderní vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie vznikla až poté, kdy laboratorní přístroje dosáhly vysokého technického stupně, jelikož k toku mobilní fáze kolonou již nevyužívá pouze gravitační síly, ale je vedena do kolony pomocí vysokotlakých čerpadel. Dalšími nezbytnostmi moderních kapalinových chromatografů jsou také dávkovací zařízení, univerzální nebo selektivní stacionární fáze a vysoce citlivý detektor, který detekuje analyzované látky automaticky. Všechna tato zdokonalení vedla k dosažení daleko vyšší účinnosti separace a zkrácení celkové doby analýzy [2].

Pod pojmem HPLC je dnes známý přístroj, který jako první sestrojil maďarsko-americký chemický inženýr Csaba Horváth ze svého laboratorního zařízení. Technika HPLC byla postupně zdokonalována až do dnešní doby, kdy zaujímá na poli analýzy organických látek dominantní postavení [8].

1.1.1 Instrumentace

Moderní kapalinový chromatograf pracuje tak, že vysokotlaké čerpadlo dávkuje kontinuálně za stálého průtoku mobilní fáze na kolonu, která je dlouhá obvykle 2-30 cm, s vnitřním průměrem 0,1 - 6 mm. Kolona je plněná sorbentem, jehož částice jsou jemné a vykazují ideálně úzkou distribuci velikostí, přičemž v současné době jsou obvyklé velikosti 2,5 – 10 μm . Čím menší je velikost částic, tím roste účinnost separace, ale zároveň jsou kladeny vyšší nároky na instrumentaci. K dosažení dostatečně rychlého průtoku mobilní fáze, je nutné dodat čerpadlem vyšší pracovní tlak, až 40 MPa. Díky vysokému tlaku se zároveň výrazně zkracuje celkový čas analýzy. Eluát z kolony dále postupuje k detektoru a jeho signál se následně zpracuje v počítači nebo integrátoru. Výsledný signál detektoru může být úměrný buď koncentraci separovaných látek nebo jejich hmotnosti [3].



Obrázek 1: Schéma kapalinového chromatografu [3]

Popis: 1 - zásobník mobilní fáze, 2 - průtočný odplyňovač mobilní fáze, 3 - vysokotlaké čerpadlo, 4 - dávkovač vzorků (autosampler), 5 – termostat kolony, 6 – separační kolona, 7 - detektor, 8 - počítač s chromatografickou datovou stanicí

1.1.1.1 Zásobníky mobilní fáze

Dříve se jako zásobníky mobilní fáze používaly nádoby z nerezové oceli, protože některá rozpouštědla používaná jako mobilní fáze jsou vysoce korozivní. V dnešní době se především z bezpečnostních důvodů používají průhledné nádoby ze skla, na kterých jsou

rysky označující objem. Objem zásobníků se pohybuje nejčastěji v rozmezí 0,25 – 2,5 litru. Aby nedocházelo k úniku par rozpouštědel, jsou zásobníky opatřeny inertními plastovými víčky s předvrtanými otvory pro teflonové hadičky, čímž je sníženo riziko požáru v laboratoři [2, 4].

1.1.1.2 Odplyňovač

Odvzdušnění mobilní fáze je důležitým krokem, díky kterému je dosaženo reprodukovatelnosti retenčních časů a zároveň také objemu nástřiků. Dále je díky odplynění zaručen stabilní průtok mobilní fáze, nízký šum nulové linie a vysoká citlivost některých chromatografických detektorů. Mobilní fáze se odvzdušňuje pomocí čtyř metod, které se mohou navzájem kombinovat. Mezi tyto metody patří vakuová filtrace a sonikace, probublávání mobilní fáze heliem, vakuový degaser, nebo ohřev mobilní fáze, v případě, že mobilní fáze není těkavá [5].

1.1.1.3 Čerpadla

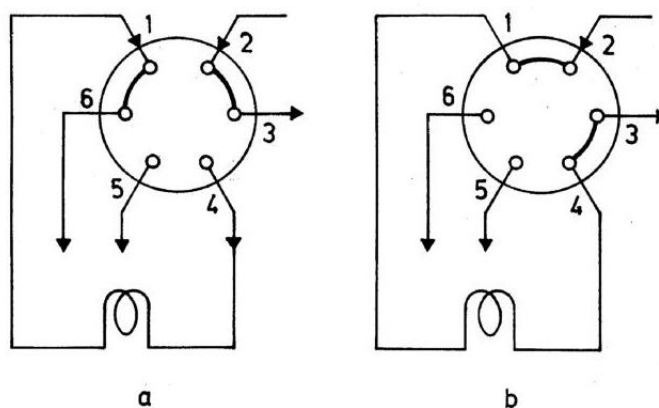
Důležitou součástí HPLC systémů jsou čerpadla mobilní fáze, která zajišťují konstantní, reprodukovatelný a bezpulsní průtok mobilní fáze systémem. HPLC kolony obsahují velmi malé částice kladoucí velký odpor, což znamená, že je nutné použití vysokých vstupních tlaků, aby bylo dosaženo optimálních průtoků mobilní fáze. Pracovní tlaky čerpadel se pohybují v řádu desítek MPa (až 40 MPa; u specializované instrumentace až 150 MPa). Konstrukční materiál musí být stejně jako u ostatních částí chromatografu odolný vůči působení agresivních chemikálií (např. nerezová ocel, titan nebo keramika).

V dnešní době ve většině případů převažuje použití pístových čerpadel. Tato čerpadla pracují na jednoduchém principu injekční stříkačky s konstantním objemovým průtokem mobilní fáze. Pístová komora má objem 10–400 μl a střídavý pohyb pístu umožňuje sání a výtlak. Moderní kapalinové chromatografy používají převážně čerpadla se dvěma pístovými komorami, jejichž pracovní cykly se rychle střídají taky, aby nedocházelo k nežádoucím tlakovým pulzům [3, 6].

1.1.1.4 Dávkovací zařízení

Vnášení vzorků na kolonu se realizuje pomocí dávkovacího ventilu, což jsou dnes výhradně smyčkové ventily, nejčastěji šesticestné. Vzorky se zavádí injekční stříkačkou do smyčky o daném objemu, který se pohybuje v rozmezí od nanolitru po mikrolitry. Dávkovací ventil má dvě polohy, přičemž v první poloze se vzorek nejdříve dávkuje do smyčky a mobilní fáze prochází z čerpadla na kolonu. Po přepnutí ventilu do druhé polohy prochází mobilní fáze smyčkou a unáší vzorek na kolonu [6].

Společně s minimalizací manuálních úkonů jako zdroje zbytečných chyb se v současnosti přistupuje k automatizaci dávkování pomocí autosamplerů. Autosampler je sofistikované zařízení, mezi jehož přednosti patří vysoká přesnost a dlouhodobá spolehlivost. Hlavními částmi automatického dávkovače jsou přihrádka pro vzorky a injektor. V přihrádce pro vzorky je možné skladovat velké množství vzorků k analýze ve speciálních lahvičkách (vialkách). Úlohou injektoru je vybrat požadovanou vialku, propíchnout její septum, odebrat přesný objem vzorku a následně tento objem dodat na kolonu [7].



Obrázek 2: Schéma šesticestného smyčkového dávkovače [6]

Popis: a – plnění smyčky, b – dávkování vzorku na kolonu

1,4 – připojení smyčky; 2 – přívod mobilní fáze od čerpadla; 3 – připojení kolony; 5,6 – odpad; nástřik v poloze 4

1.1.1.5 Kolony

Další významnou součástí chromatografického systému je kolona, která musí být vhodně zvolena, protože kvalita kolony a její náplň určuje celkový výsledek chromatografické separace. Kolony jsou rovné trubice s vnitřním průměrem od desítek mikrometrů až po několik centimetrů a délce nejčastěji do 30 centimetrů. Materiál kolony musí splňovat kritéria, mezi která patří odolnost vůči vysokým pracovním tlakům (u běžných kolon až 60 MPa), ale i chemickému působení mobilních fází a separovaných látek. Zároveň tento materiál nesmí být katalyzátorem, jelikož by mohlo dojít k rozkladu vzorku během analýzy. Dalším kritériem je hladký vnitřní povrch, proto se jako konstrukční materiál nejčastěji používá antikorozi ocel s leštěným vnitřním povrchem nebo za předpokladu nižších pracovních tlaků (do 10 až 20 MPa) speciálně tvrzené borosilikátové sklo [1].

Moderní HPLC chromatografy bývají vybaveny navíc také předkolonou, což je krátká kolona, zařazená za čerpadlem těsně před chromatografickou kolonou, se stacionární fází stejnou jako chromatografická kolona. Předkolony se zařazují z důvodu zachycení mechanických nečistot a látek, které by se mohly na kolonu nevratně navázat a poškodit ji.

Protože teplota kolony významně ovlivňuje separaci analytů, jsou v moderních HPLC systémech také běžně konstruované kolonové termostaty, díky kterým se dosahuje zvýšení reprodukovatelnosti retenčních časů. Kolonové termostaty je možné rozdělit na dva hlavní typy. Prvním typem jsou teplovzdušné, které mohou být dále rozděleny na termostaty pasivní a termostaty s nuceným oběhem temperovaného vzduchu (cirkulační). Pasivní termostaty jsou jednodušší zařízení pracující bez cirkulace temperovaného vzduchu na rozdíl od složitějších termostatů cirkulačních, které ohřívají nebo chladí chromatografickou kolonu rychleji a s vyšší přesností. Druhým typem kolonových termostatů jsou termostaty kapalinové (olejové). Výhodou kapalinových termostatů je možnost přesnějšího nastavení teploty a také zajištění kvalitnějšího přenosu tepla. Kapalinové termostaty se využívají především při ohřevu na teploty vyšší než 100 °C [5].

1.1.1.6 Detektory

Za chromatografickou kolonou následuje detektor, jehož signál je vyhodnocován za pomoci počítače nebo některého z dalších vyhodnocovacích zařízení. Detektory zaznamenávají určitou vlastnost systému, ze které lze reprodukovatelně pomocí známého

vztahu určit koncentraci. Na základě vyhodnoceného signálu se detektory rozlišují na univerzální a selektivní. U univerzálních detektorů odpovídá signál vlastnosti celého eluátu, oproti tomu selektivní detektory měří signál pouze analyzované látky. Použití selektivních detektorů bývá výhodnější, protože mají vyšší citlivost oproti detektorům univerzálním. Mezi nejčastěji používané detektory v HPLC analýzách patří spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, vodivostní či složitější hmotnostní spektrometr [6].

Spektrofotometrické detektory

Nejčastějšími detektory při HPLC separacích jsou spektrofotometrické detektory, protože jsou relativně jednoduché a spolehlivé [6]. Základním principem spektrofotometrických detektorů je, že separované látky absorbují záření v ultrafialové a viditelné oblasti spektra (190-800 nm). Podmínkou je ovšem schopnost separované látky absorbovat záření v této oblasti. Mezi látky schopné absorpce v ultrafialové a viditelné (UV-VIS) oblasti se řadí hlavně sloučeniny obsahující násobné vazby nebo aromatická jádra. Kvantitativní zastoupení analyzované látky se vyjadřuje Lambert-Beerovým zákonem, kde je vyjádřena velikost absorpce pomocí absorbance (A), která je úměrná koncentraci absorbující složky (c), tloušťce absorbující vrstvy (l) a molárnímu absorpčnímu koeficientu (ϵ), což je konstantní veličina pro danou látku. Vyjádření Lambert-Beerova zákona znázorňuje *Rovnice 1* [5].

Rovnice 1: Lambert-Beerův zákon

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

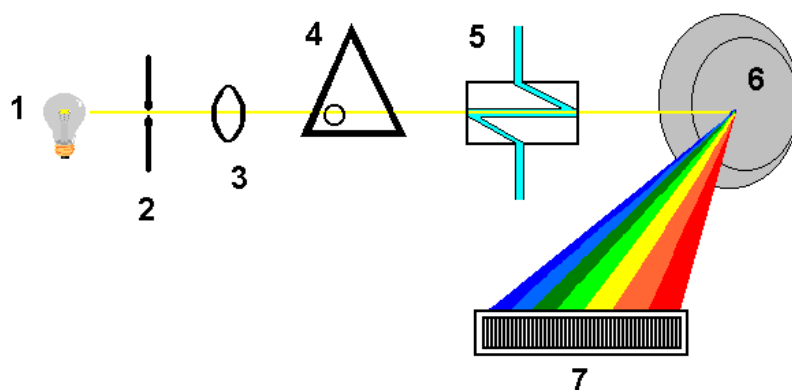
ϵ ... molární absorpční koeficient

l ... tloušťka květy

c ... koncentrace analytu

Zdrojem záření může být například nízkotlaká rtuťová výbojka s interferenčním filtrem, který umožňuje výběr vlnové délky detekce, nejčastěji 253,7 nm. Tento způsob detekce se vyskytuje u levnějších přístrojů. Dalším možným zdrojem je deuteriová výbojka,

kde je možné vlnovou délku pomocí monochromátoru programovat ve škále 190 až 600 nm. Složitější HPLC přístroje využívají detektory diodového pole, které obsahují 512-1024 plošných fotodiod upevněných na 1-2 cm dlouhé destičce z křemíku. Záření prochází měrnou celou, dále je rozloženo holografickou mřížkou, až nakonec dopadá na systém fotodiod. Každá z fotodiod detekuje záření jedné vlnové délky a detektor je schopen všechny předem zvolené vlnové délky jednotlivých fotodiod detekovat a následně integrovat všechny chromatogramy. Tyto detektory umožňují částečnou identifikaci látky, jelikož pro každý pík na chromatogramu poskytují UV spektra v reálném čase [3].



Obrázek 3: Schéma detektoru s diodovým polem [3]

Popis: 1 – zdroj záření, 2 – štěrбина, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná cela, 6 – holografická mřížka, 7 – fotodiodové pole

Fluorescenční detektory

Principem fluorescenčních detektorů je absorpce primárního a následné vyzáření sekundárního elektromagnetického záření. Fluorescenční detektory jsou velmi selektivní pro látky, které jsou schopny přirozené fluorescence (převážně látky obsahující polycyklické nenasycené sloučeniny) nebo je možné je na fluoreskující derivát převést vhodnou derivatizační reakcí (například reakcí s dansylchloridem či o-ftaldialdehydem), při které se do molekuly zavádí funkční skupiny schopné fluorescence.

Látka absorbuje primární excitační záření ze zdroje (rtuťové, deuteriové, wolframové nebo xenonové výbojky, nebo lasery), což způsobí, že se elektrony excitují na vyšší energetické hladiny a následně se molekula vrací do základního energetického stavu. Jedním

ze způsobů, jak se látka může zbavit získané přebytečné energie, je její zpětné vyzáření ve formě fluorescence (sekundární záření). Sekundární záření je zachycováno fotonásobičem konstruovaným pod úhlem 90° ke zdroji záření, aby bylo zachyceno co největší množství záření emitovaného a minimální množství záření excitačního [5, 6].

Refraktometrické detektory

Nejstaršími detektory v kapalinové chromatografii jsou detektory refraktometrické. Tyto detektory pracují na principu porovnávání indexu lomu eluátu v měrné cele s indexem lomu mobilní fáze v referenční cele detektoru. Citlivost refraktometrických detektorů je o dva až tři řády nižší než u detektorů spektrofotometrických a závisí na velikosti rozdílu mezi indexem lomu eluátu a mobilní fáze, čím větší tento rozdíl je, tím citlivější je detekce. Pro stabilní odezvu při refraktometrické detekci je nutné, aby v průběhu měření nekolísala teplota, proto musí být detekční cela vybavena termostatem [5].

Elektrochemické detektory

Elektrochemické detektory se rovněž vyznačují vysokou selektivitou, a to pro látky, které se dají oxidovat nebo redukovat (jsou elektroaktivní). Analyty protékají měrnou celou detektoru, kde se nachází elektrody s vloženým napětím. Měřenou veličinou může být elektrodový potenciál, proud nebo kapacita a detekovaný elektrický signál odpovídá látkovému množství složky vzorku. Mezi tyto detektory se řadí detektory amperometrické a coulometrické. Při amperometrické detekci je měřen proud vyvolaný průchodem elektroaktivní látky měrnou celou, kdežto při ještě citlivější coulometrické detekci je měřen náboj, který je třeba k oxidaci nebo redukci veškeré látky při průtoku celou detektoru [5].

Vodivostní detektory

Do skupiny univerzálních detektorů se řadí detektory vodivostní, které jsou ovšem méně citlivé. Jejich konstrukce je jednoduchá, skládají se z válcové průtočné cely se dvěma kovovými elektrodami. Na elektrody se vkládá střídavé napětí, aby nedocházelo k jejich polarizaci a měří se elektrická vodivost eluátu z kolony. Vodivostní detekce je využívána především v iontové chromatografii [3, 5].

Hmotnostní detektor

On-line spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru je v moderních analytických laboratořích v současnosti již běžnou záležitostí. Od ostatních detektorů se hmotnostní spektrometr odlišuje tím, že mimo univerzální a vysoce selektivní detekce složek vzorku umožňuje zároveň jejich identifikaci [3].

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří částí, a hmotnostní detekce tedy probíhá ve třech krocích. První částí hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, který převádí neutrální molekuly na nabitě částice (ionty). Pro spojení kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC-MS) se nejčastěji používají ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku, což je ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) nebo ionizace laserem za účasti matrice (MALDI). Následujícím krokem je rozdělení iontů v hmotnostním analyzátoru dle poměru jejich hmotnosti ku náboji (m/z). Mezi vhodné hmotnostní analyzátory patří kvadrupóly, iontové nebo orbitální pasti či analyzátory doby letu. Hmotnostní analyzátor ionty dále urychluje a fokusuje je na detektor, který signál iontů buď zachycuje nebo násobí [3, 6].

Výstupem hmotnostního detektoru je hmotnostní spektrum, což je graf, pomocí něhož lze určit strukturu analyzované látky. Osa x zobrazuje jednotlivé hodnoty m/z analyzovaných iontů a osa y intenzitu iontového proudu (odezvu detektoru). Takový graf ovšem není příliš vhodný pro vyhodnocování, proto se převádí do normalizovaného tvaru, který zobrazuje jednotlivé ionty jako píky v čárové formě a na ose y je vynesena relativní intenzita iontového proudu, přičemž nejintenzivnější pík spektra má hodnotu 100 % [6].

1.1.2 Systémy HPLC

Chromatografickým systémem se označuje kombinace stacionární a mobilní fáze pro danou separaci. Mechanismus separace závisí na vzájemných interakcích složek vzorku, stacionární a mobilní fází. Neiontové látky se separují především ve dvou základních módech, a to v systémech s normálními fázemi (NP-LC) a systémech s obrácenými fázemi (RP-LC). Mechanismus separací v NP-LC i RP-LC je dán polaritou složek vzorku a fázového systému. V některých speciálních případech lze využít také další techniky, například iontovou chromatografií, gelovou chromatografií, bioafinitní chromatografií, micelární chromatografie a další [3].

1.1.2.1 Systém s normálními fázemi

Charakteristickým rysem systémů s normálními fázemi je použití polárních stacionárních fází, těmi mohou být anorganické adsorbenty (silikagel, oxid hlinitý), nebo organické fáze (aminové, nitrilové, diolové a další), které jsou chemicky navázány na povrch anorganického adsorbentu. Velikost retence látek silně závisí na zvolené mobilní fázi, která je v systémech s normálními fázemi vždy méně polární než stacionární fáze. Mobilní fázi jsou typicky nepolární organická rozpouštědla, přičemž se většinou využívají jejich dvousložkové směsi, například propanol s n-hexanem. Eluce látek probíhá tak, že se nejdříve vylučují látky s nejnižší polaritou a za nimi následují látky v rostoucím pořadí polarit. Modifikací kapalinové chromatografie na normálních fázích (NP-LC) je v poslední době velmi oblíbená chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC), pomocí níž je možné ve vodně-organických mobilních fázích separovat látky, které se v čistě organických rozpouštědlech zadržují příliš silně [3].

1.1.2.2 Systém s obrácenými fázemi

Separace v NP-LC režimu se již příliš neprovádí, neboť je postupně nahradily systémy s obrácenými fázemi (RP-LC) a v současné době se tímto způsobem provádí okolo 90 % separací. RP-LC systémy jsou první volbou hlavně z důvodu bezpečnosti, protože polární rozpouštědla mají nižší teploty varu a zároveň jsou méně hořlavá. Pro separace v režimu RP-LC je typické použití polárních mobilních fází, které obsahují nejčastěji vodu a jedno nebo více organických rozpouštědel, nejčastěji methanol či acetonitril. Stacionární fáze jsou v tomto režimu zpravidla nepolární a skládají se ze silikagelu s chemicky navázanou funkční skupinou. Mezi takové nepolární skupiny se řadí hlavně oktadecylové, oktylové a další alkylové nebo arylové. Výhodou reverzních fází je, že na nich lze rozdělit velké množství různorodých látek, od nepolárních, přes středně polární, až po silně polární a někdy i látky iontové [3, 8].

Prakticky nejpoužívanějšími kolonami v RP-LC jsou nepolární oktadecylsilikagelové (C18) kolony. Oktadecylsilikagel obsahuje 18 atomů uhlíku, které jsou navázané na oxid křemičitý. Díky dlouhému uhlíkovému řetězci mají tyto stacionární fáze větší povrch pro interakci s protékajícím eluátem, což zajišťuje delší dobu jejich vzájemné interakce. Vzorek se na C18 kolonách tedy eluuje pomaleji a jeho složky se lépe separují [9]. Hlavní nevýhodou tohoto typu kolon představuje jejich nepříliš vysoká chemická stabilita. Mobilní

fáze použitá pro separaci na tomto typu kolony by neměla vykazovat pH vyšší než 8-10, protože s rostoucím pH se zvyšuje vliv zbytkových silanolových skupin, což v praxi způsobuje chvostování píků separovaných látek. Klasické C18 kolony jsou navíc specifické tím, že při separaci nelze použít jako mobilní fázi 100 % vodu, jelikož by velmi pravděpodobně mohlo dojít až k hydrofobnímu kolapsu. Hydrofobní kolaps způsobuje velký rozdíl v polaritě vodné mobilní fáze s polaritou hydrofobních řetězců, které v tomto případě nemohou být smáčeny, a tak dochází k jejich zhroucení [3, 5].

1.1.3 Optimalizace chromatografické separace

Pojem optimalizace chromatografické separace označuje proces, kdy se postupnými změnami různých faktorů ovlivňujících dělení látek hledají nejvhodnější podmínky pro separaci určitých látek v daném chromatografickém systému. Z faktorů, které ovlivňují separaci látek, lze jmenovat například složení stacionární či mobilní fáze, rozměry částic náplně a kolony, průtok mobilní fáze nebo pracovní teplota. Toto jsou proměnné, jejichž změnou je možné ovlivnit některé ze členů přispívajících k rozlišení, což je účinnost, selektivita a retence (kapacita). Vztah pro rozlišení znázorňuje *Rovnice 2*.

Rovnice 2: Obecný vztah pro výpočet rozlišení

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k}{k + 1} \right)$$

N ... počet teoretických pater (účinnost)

α ... retenční/eluční poměr (selektivita)

k ... retenční faktor (retence)

Člen účinnosti závisí na rychlosti průtoku mobilní fáze, délce chromatografické kolony, velikosti částic náplně a také pracovní teplotě. Člen selektivity má na rozlišení látek největší vliv, kdy i při malé změně tohoto faktoru dochází k významnému růstu rozlišení, ale zároveň je změna proměnných selektivity mnohem složitější v porovnání se změnami účinnosti nebo kapacity. Selektivitu lze ovlivnit výměnou stacionární či mobilní fáze, rychlostí průtoku mobilní fáze, změnou teploty a v programované eluci se vyskytuje možnost upravit strmost gradientu. Poslední člen retence je možné ovlivnit výměnou

stacionární nebo mobilní fáze, množstvím stacionární fáze, teplotou a rovněž strmostí gradientu.

Před vlastním procesem optimalizace je třeba nejprve definovat separační problém, který se má řešit. Nutností je znalost vlastností vzorku, zda má jednoduché složení, nebo obsahuje více složek a zda jsou třeba jeho předběžné úpravy. Dále se dle charakteru látek ve vzorku volí detekční systém a následně dle povahy vzorku také samotný separační systém. Po zvolení systému kolona-mobilní fáze se přistupuje k prvnímu pokusu o rozdělení látek ve vzorku, kdy k uspokojivému rozdělení dochází velmi zřídka, a proto přichází na řadu vlastní optimalizace, jejímž cílem je nalezení takových podmínek, kdy separace probíhá při optimálním rozlišení (nejčastěji s hodnotou 1,5) v nejkratším možném čase a co nejmenším množstvím vzorku [2, 10, 11].

1.1.3.1 Optimalizace izokratické eluce

Jak již bylo výše zmíněno, rozlišení jednotlivých látek ve vzorku při chromatografické separaci nejvýznamněji ovlivňuje člen selektivity, kterou lze ovlivnit složením stacionární či mobilní fáze. Z tohoto faktu tedy vyplývá, že nejvhodnějším způsobem optimalizace dělení látek na dané koloně je změna složení mobilní fáze. V systémech s obrácenými fázemi platí, že s vyšším zastoupením organického rozpouštědla a jeho klesající polaritou v mobilní fázi dvousložkových systémů dochází ke snížení retence. Při izokratické eluci je složení mobilní fáze konstantní po celou dobu analýzy, proto separace vyžadují dlouhé analýzy a s tím spojenou velkou spotřebu rozpouštědel jako mobilních fází. Z toho důvodu je vhodné izokratické separace optimalizovat a celý proces tím zjednodušit [5, 11].

Vlastní optimalizace probíhá tím způsobem, že se provede analýza při zvolených počátečních podmínkách a na základě získaného chromatogramu se podmínky pro další analýzy upravují (mění se procentuální zastoupení organické složky v mobilní fázi). Podmínky se upravují do té doby, než se dosáhne požadovaného rozlišení jednotlivých složek vzorku. Vyhodnocení optimálních podmínek separace se provádí různými způsoby, jedním z nejjednodušších postupů je pomocí okénkových diagramů.

Okénkové diagramy graficky znázorňují závislost rozlišení sousedních píků jako funkci jedné či více proměnných, které mají vliv na chromatografické separace, jako je teplota nebo složení mobilní fáze. Z okénkových diagramů je možné vizuálně odečíst podmínky, za kterých je dosaženo požadovaného rozlišení v co nejkratším čase. Grafy

se vyhodnocují tak, že se na ose y nalezne hodnota požadovaného rozlišení látek (nejčastěji 1,5) a vynesou se pomyslná rovnoběžka s osou x. Následně se na ose x odečte hodnota optimálního složení mobilní fáze pro toto rozlišení. V jednodušších diagramech (kde nedochází ke změně pořadí eluce jednotlivých dvojic) se odečítá hodnota, kdy pomyslná rovnoběžka s osou x protne křivku dvojice látek nejbližší ose y. U složitějších diagramů (kde se při změně podmínek mění pořadí dvojic) je to hodnota x vrcholu nejvyššího trojúhelníku (okna), který tato pomyslná čára protíná [12, 13].

1.1.3.2 Optimalizace gradientové eluce

Gradientovou eluci charakterizuje práce s mobilní fází, jejíž složení se mění s časem a tato časová změna koncentrace je označována jako profil gradientu. Obvykle se provádí s dvousložkovou mobilní fází, kdy jedna ze složek mobilní fáze vykazuje mnohem vyšší eluční sílu než složka druhá. Použití gradientové eluce se nejvíce uplatňuje, když vzorek obsahuje složky, které se na dané koloně velmi zdržují a příliš tím prodlužují izokratické analýzy, nebo také v případě, že píky látek naměřených izokratickými metodami jsou moc široké. Gradientová eluce se tedy provádí za účelem zkrácení celkové doby analýzy a získání užších píků, což vede ke zlepšení detekčních limitů. Při optimalizaci gradientu je podobně jako u izokratických separací nutné naměřit nejméně tři experimenty, které mají rozdílnou například strmou gradientu, počáteční koncentraci organické složky mobilní fáze nebo i celkovou délku analýzy. Podmínky gradientu se často optimalizují empiricky. První gradient bývá lineární a počáteční koncentrace složky s vyšší eluční silou se volí v rozmezí 0–5 %. Matematický popis optimalizace gradientové eluce je na rozdíl od izokratické optimalizace složitější. Vztah pro rozlišení gradientové eluce znázorňuje *Rovnice 3*. Z toho důvodu se k matematickému popisu optimalizací gradientu využívají různé počítačové programy. Z takových programů lze jmenovat Drylab, Chromswordauto, Osiris nebo také ACD/LC simulator [11, 14].

Rovnice 3: Vztah pro výpočet rozlišení v gradientové eluci

$$R_{1,2} = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{1}{G \cdot (1 + b_g)} \cdot \ln \frac{k_{a2}}{k_{a1}}$$

N ... počet teoretických pater

G ... koeficient komprese píků

b_g ... strmost gradientu

k_{a1}, k_{a2} ... retenční faktory dvou látek separujících se na počátku gradientu

1.2 Alkaloidy

Alkaloidy představují skupinu přírodních látek, které se nachází v různých formách po celé planetě. Nejvíce alkaloidů pochází z rostlinné říše, v současné době bylo pojmenováno více než 40 000 takových sloučenin. Názvy mnoha alkaloidů byly odvozeny z názvů rostlin, ve kterých se nachází, přičemž rostlina se považuje za zdroj daného alkaloidu v případě, že obsahuje více než 0,001 % tohoto alkaloidu. I když se alkaloidy izolují převážně z rostlinných zdrojů, byly také prokázány v tělech některých zvířat, hmyzu, mořských bezobratlých živočichů a některých mikroorganismech [22].

Z chemického hlediska jsou alkaloidy definovány jako komplexní, převážně heterocyklické, dusíkaté sloučeniny, jejichž specifickou vlastností je bazicita, ze které byl odvozen jejich název. Tyto sloučeniny způsobují různé fyziologické změny u živých organismů a často také bývají toxické.

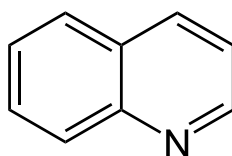
Obvykle se alkaloidy klasifikují dle svého původu do tří hlavních skupin, a to pravé alkaloidy, pseudoalkaloidy a protoalkaloidy. Za pravé alkaloidy se považují heterocyklické dusíkaté sloučeniny, kde dusík v daném heterocyklu pochází z některé aminokyseliny. Pravé alkaloidy jsou velmi reaktivní látky a pro člověka i jiné živočichy bývají toxické i v nízkých dávkách. Do této skupiny se řadí alkaloidy odvozené od pyridinu (např. nikotin), piperidinu (např. piperin), pyrrolizidinu (např. echinatin), chinolizidinu (např. lupanin) a chinolinu (např. chinin). Protoalkaloidy jsou rovněž sloučeniny odvozené od aminokyselin, ale na rozdíl od pravých alkaloidů není dusíkový atom přímo vázaný uvnitř aromatického systému. Do skupiny protoalkaloidů patří kapsaicinoidy jejichž základní skelet tvoří vanillylamidy. Nejvýznamějším zástupcem z této skupiny je kapsaicin. Odlišnější skupinou jsou pseudoalkaloidy, protože dusík v jejich molekule nemá původ v aminokyselině.

Pseudoalkaloidy mohou vznikat z prekurzorů a postkurzorů aminokyselin, při aminačních a transaminačních reakcích, nebo dokonce také z neaminokyselinových prekurzorů. Pseudoalkaloidy lze rozdělit do dvou skupin vzhledem k jejich základním skeletům, a to na alkaloidy purinové (např. kofein) a terpenoidní (např. tomatin) [15, 16].

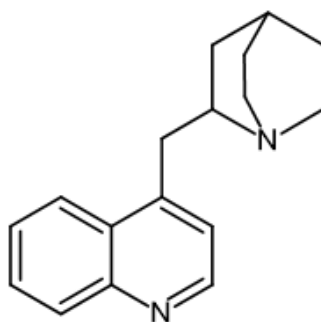
Protože se tato práce zabývá separací chinolinových a purinových alkaloidů, podrobněji budou popsány především tyto dvě skupiny.

1.2.1 Chinolinové alkaloidy

Chinolinové alkaloidy vychází z indolových prekurzorů a jejich molekuly obsahují heterocyklus chinolinu (*Obrázek 4*). Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou alkaloidy chinovníku, jejichž struktura je odvozena ze základního skeletu rubanu (*Obrázek 5*).



Obrázek 4: Struktura chinolinu



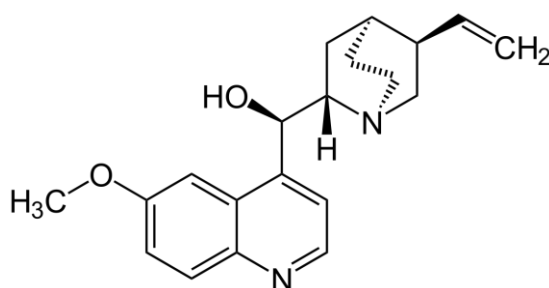
Obrázek 5: Struktura rubanu

Hlavním přírodním zdrojem chinolinových alkaloidů je kůra kořenů, větví a kmenů různých odrůd chinovníku (*Cinchona*). Kůra chinovníků obsahuje cca 5–8 % alkaloidů, přičemž z tohoto celkového množství připadá asi 70 % chininu. V kůře chinovníků se vyskytuje také optický izomer chininu chinidin. Dalším z alkaloidů kůry chinovníku je cinchonidin, který má stejné prostorové uspořádání jako chinin, ale na rozdíl od chininu

neobsahuje metoxylovou skupinu. Posledním zástupcem je cinchonin, který vykazuje optickou izomerii s cinchonidinem a jehož prostorové uspořádání odpovídá chinidinu [16, 17].

1.2.1.1 Chinin

Nejrozšířenějším alkaloidem vyskytujícím se v kůře chinovníku je chinin (*Obrázek 6*). Jeho molekula obsahuje bazický aromatický heterocyklus, zvaný chinolinový kruh, a postranní řetězec, který se skládá ze sekundárního alkoholu, alkenu a cyklického aminu. Obvykle se chinin používá ve formě solí, nejčastěji ve formě dihydrochloridu [23].



Obrázek 6: Struktura chininu

Vizuálně se chinin nijak neliší od ostatních alkaloidů, vyskytuje se jako bílý amorfní prášek, který po čase hnědne na vzduchu. Chinin taje při 177 °C a jeho dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol-voda (log P) je roven 3,44, což vypovídá o jeho hydrofobicitě. Ve vodě je rozpustný špatně, ale dobře se rozpouští v alkoholu, chloroformu a dalších polárních rozpouštědlech. Ze smyslových vlastností chininu převládá chuť, která je typicky velmi hořká [26].

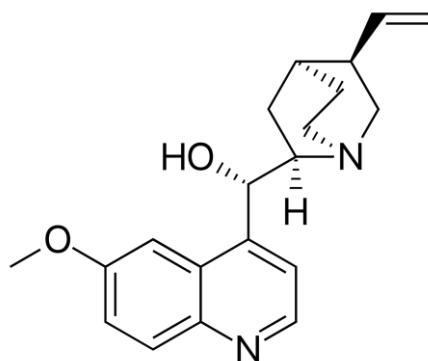
Díky svým výrazným chuťovým vlastnostem nachází chinin významné uplatnění v potravinářském průmyslu. Chinin se uplatňuje jako standardní látka pro hořkou chuť a využívá se k úpravě hořkosti různých alkoholických i nealkoholických nápojů. Z takových nápojů lze jmenovat například tonik, tonikovou vodu či vermut [20].

Již od dávných dob se chinin používá jako účinné antimalarikum, protože působí na lidský organismus antipyreticky (snižuje tělní teplotu) a vykazuje specifickou toxicitu vůči prvokům rodu *Plasmodium*, kteří malárii způsobují a nemají vůči chininu žádnou

rezistenci [20]. Léčba chininem musí být prováděna pod lékařským dohledem, jelikož se jeho užívání spojuje rovněž s některými nežádoucími účinky, typicky s cinchonismem, hypoglykemií (pokles krevního cukru) nebo i méně častou hypotenzí (snížení krevního tlaku). Cinchonismus se projevuje zvoněním v uších, poruchami slyšení vysokých tónů, poruchami vidění, úzkostnými stavy, bolestmi hlavy, či hypotenzí. Cinchonismus se při léčbě chininem objevuje poměrně často, ale brzy po vysazení léků jeho příznaky postupně vymizí [25].

1.2.1.2 Chinidin

Chinidin (*Obrázek 7*) je optickým izomerem hlavního alkaloidu kůry chinovníku chininu. Původně byl extrahován z kůry chinovníku, ale v dnešní době se již běžně syntetizuje chemicky. Podobně jako chinin disponuje chinidin antimalarickými účinky, v medicíně má ovšem důležitější uplatnění při léčbě srdečních arytmií. Principem ovlivnění srdečního rytmu chinidinu je jeho působení na napěťově řízené sodíkové a draslíkové kanály, čímž ovlivňuje akční potenciál srdce a inhibuje fibrilaci, při které dochází k nekoordinovaným kontrakcím svalových vláken v srdci [27, 28, 29, 30].

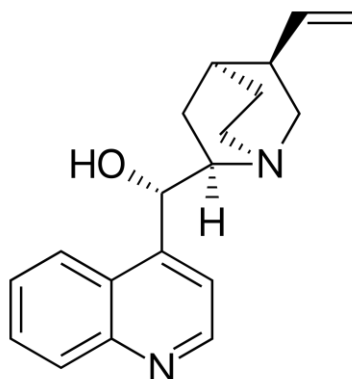


Obrázek 7: Struktura chinidinu

1.2.1.3 Cinchonin

Dalším alkaloidem kůry chinovníku je cinchonin (*Obrázek 8*), který se strukturně podobá chinidinu. Jediný rozdíl spočívá v tom, že cinchonin postrádá metoxylovou skupinu na chinolinovém jádře a v jeho molekule ji v této poloze nahrazuje atom vodíku [30]. Přítomnost metoxylové skupiny nemá žádný vliv na antimalarickou aktivitu chinolinových

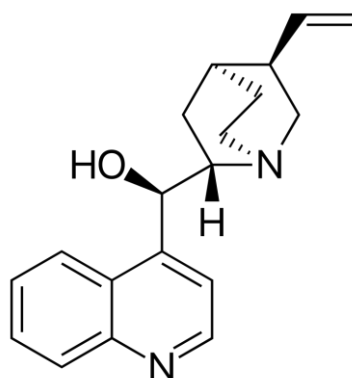
alkaloidů, z čehož vyplívá, že cinchonin také disponuje antimalarickými účinky [31]. Dnes se cinchonin používá především jako heterogenní organokatalyzátor, protože byla prokázána jeho vysoká selektivita k enantiomerům při chirálních reakcích [32, 33].



Obrázek 8: Struktura cinchoninu

1.2.1.4 Cinchonidin

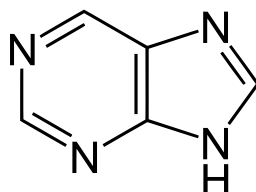
Posledním příbuzným této rodiny alkaloidů je optický izomer cinchoninu s názvem cinchonidin (*Obrázek 9*). Strukturální vztah cinchonidinu a chininu je identický jako vztah cinchoninu a chinidinu. Liší se tedy pouze v přítomnosti methoxyskupiny [30]. Stejně jako ostatní alkaloidy kůry chinovníku má protimalarické účinky a podobně jako cinchonin je cinchonidin a jeho deriváty využíván jako katalyzátor při enantioselektivních reakcích [31, 32, 34].



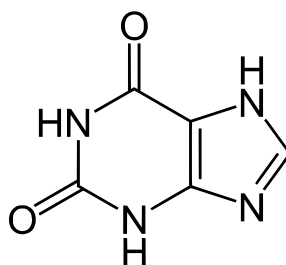
Obrázek 9: Struktura cinchonidinu

1.2.2 Purinové alkaloidy

Malou, ale velmi významnou skupinou alkaloidů jsou alkaloidy purinové, jelikož mají největší uplatnění v potravinářském průmyslu. Základním stavebním prvkem purinových alkaloidů je xantin (Obrázek 10), což je oxidační produkt purinu (Obrázek 11), podle něhož byla celá tato skupina pojmenována [16]. Purinové jádro se skládá ze dvou kruhů, a to šestičlenného pyrimidinového a pětičlenného imidazolového. Skupina purinových alkaloidů se vymezuje na metylované deriváty xantinu a vychází ze stejných prekurzorů jako puriny nukleových kyselin. Tvorba jejich základní struktury probíhá spojováním jedno- a dvou-uhlíkatých sloučenin (například glycinu, glutaminu, kyseliny mravenčí, CO₂ nebo aspartátu) a následně se tato základní struktura metyluje pomocí S-adenosylmethioninu [17].



Obrázek 10: Struktura purinu



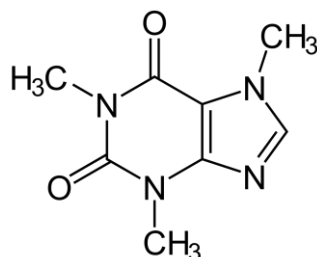
Obrázek 11: Struktura xantinu

Z důvodu rozšíření této skupiny látek v živých hmotách po celé planetě a také specifického způsobu biosyntézy, který nemá nic společného s nukleovými kyselinami, nebývají tyto látky klasifikovány čistě jako alkaloidy a v dnešní době se setkáváme spíše s označením purinové báze. V přírodě jsou alkaloidy obsahující purinový cyklus zastoupeny v různých poměrech v mnoha rostlinách. Purinové alkaloidy se vyskytují jako hlavní složky

v semenech kávovníku, listech čajovníku, listech maté, guaraně, či semenech kakaovníku. Lidé tyto rostlinné produkty využívají především k přípravě nápojů, které mají díky obsahu purinových alkaloidů stimulační účinky na lidský organismus [17, 18].

1.2.2.1 Kofein

Triviálním názvem kofein se běžně označuje organická molekula složená ze čtyř základních prvků (uhlíku, vodíku, dusíku a kyslíku) se systematickým názvem 1,3,7-trimethylxantin. Kofein je přírodní alkaloid nacházející se v mnoha rostlinách (kávovníku, čajovníku, maté a dalších), ze kterých se může získávat dvěma způsoby. Z přírodních zdrojů lze kofein získat buď přímou extrakcí pomocí organických rozpouštědel nebo ho lze izolovat jako vedlejší produkt při výrobě bezkofeinových výrobků. Kofein je možné získávat také polosyntetickou cestou, která spočívá v metylaci různých xantinů například teofylinu či teobrominu.



Obrázek 12: Struktura kofeinu

Za pokojové teploty se kofein projevuje jako stabilní nereaktivní bílý prášek bez zápachu s jemně nahořklou chutí. Jakmile se teplota začne zvyšovat k teplotě blízké bodu tání, začíná tato látka přecházet z pevné fáze do plynné (cca při 160 °C). Hodnota log P se pro kofein přibližně rovná nule, což znamená, že rozpustnost v oleji a vodě je téměř identická. Kofein je rozpustný v chloroformu, ale i ve vodě. Rozpustnost ve vodě je možné zvýšit zahříváním nebo přidávkem alkalických benzoátů, citrátů či salicylátů do vodného roztoku [19].

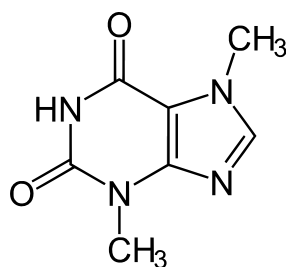
V dnešní době se kofein řadí k nejrozšířenějším složkám potravin po celém světě. Lidé si ho oblíbili hlavně pro jeho stimulační účinky na lidský organismus a na denní bázi ho užívají ke zlepšení bdělosti, nálady, zvýšení energetické hladiny, a dokonce i sportovního

výkonu. Kofein se v některých potravinách vyskytuje přirozeně. K takovým patří například káva, čaj nebo kakao, a tudíž také čokoláda a výrobky z ní. Zároveň se ovšem kofein do potravin může přidávat uměle, kdy vznikají potraviny s koncentrovanou dávkou kofeinu ve srovnání s běžnými potravinami. Příkladem mohou být různé energetické nápoje, žvýkačky nebo dokonce kofeinové tablety [35].

Kofein se vstřebává v žaludku a tenkém střevě během 45 minut od požití a jakmile je absorbován přes tenké střevo do jaterního oběhu, volně proniká do všech tělesných tkání. K počátečnímu metabolismu dochází ještě před vstupem do oběhu pomocí enzymu cytochromu P450 přítomného ve střevní stěně. Primární metabolismus není příliš efektivní a jeho hlavní metabolismus probíhá v játrech, kde kofein metabolizuje především systém oxidáz cytochromu P450. Tyto enzymy transformují kofein N-demetylačními reakcemi na příbuzné dimetylxantiny, ze kterých 84 % připadá paraxantinu, 12 % teobrominu a 4 % teofylinu. Vyloučení kofeinu z lidského těla se charakterizuje pomocí poločasu rozpadu, který se pohybuje od 2 do 4,5 hodin, jeho zmíněné metabolity mají tyto poločasy rozpadu ovšem vyšší a v lidském těle se zdržují delší dobu [46, 47].

1.2.2.2 Teobromin

Velmi podobnou molekulu kofeinu představuje rovněž přírodní alkaloid s triviálním názvem teobromin. Jediným strukturálním rozdílem oproti molekule kofeinu je jedna chybějící methylová skupina v heterocyklickém systému xantinu a systematicky ho tedy lze pojmenovat 3,7-dimetylxantin. Přírodním zdrojem teobrominu jsou sušená zralá semena kakaovníku, ale zároveň lze teobromin vyrábět také synteticky z xantinu.



Obrázek 13: Struktura teobrominu

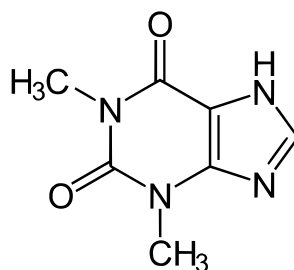
Fyzikálně-chemické vlastnosti teobrominu se rovněž podobají vlastnostem kofeinu. Teobromin se v čisté formě vyskytuje jako bílý krystalický prášek s hořkou chutí, který při zahřátí na teplotu přibližně 260 °C sublimuje. Mezi další vlastnosti patří nepříliš dobrá rozpustnost ve vodě a alkoholu, která se ovšem výrazně zlepší přidávkem solí ze zásaditých roztoků, jako je salicylát vápenatý, octan sodný nebo salicylát sodný.

Na lidský organismus působí teobromin stimulačně na centrální nervový systém, ale ve srovnání s kofeinem je tento efekt výrazně nižší. Silnější efekty v souvislosti s lidským organismem vykazuje spíše z hlediska vazodilatace (rozšiřování krevních cév) a odvodňování organismu.

Zajímavostí je, že obsah teobrominu v čokoládě se pohybuje mezi 0,5-2,7 %, což je dostatečně nízká koncentrace pro to, aby ho lidé mohli bezpečně konzumovat. Uvádí se, že některá zvířata, například psi, teobromin metabolizují pomaleji a tato látka jim může způsobit otravu [20, 21].

1.2.2.3 Teofylin

Teofylin je dalším z rodiny sloučenin s purinovým heterocyklem, který patří mezi tři nejdůležitější metylxantiny. Podobnost s kofeinem a teobrominem vyplývá již ze systematického názvu 1,3-dimethylxantin a stejně jako jeho strukturní analogy se vyskytuje v některých přírodních produktech. Ve stopovém množství ho přirozeně obsahují kakaové boby a čajové listy, ze kterých byl původně extrahován. V současnosti se teofylin vyrábí spíše synteticky [36, 37].



Obrázek 14: Struktura teofylinu

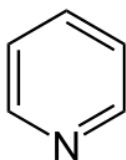
Fyzikálně-chemické vlastnosti teofylinu se příliš neliší od jeho příbuzných metylxantinů. Extrahovaný či syntetizovaný teofylin se má podobu bílého prášku

bez zápachu s hořkou chutí, jeho teplota tání dosahuje 273 °C a jeho hodnota log P má zápornou hodnotu blížíící se nule (-0,02). Ve studené vodě a organických rozpouštědlech se rozpouští špatně, lépe se rozpouští v horké vodě, ale nejlepší rozpustnost vykazuje v alkalických roztocích [38].

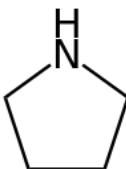
Teofylin se díky své biologické aktivitě využívá pro léčbu respiračních onemocnění, hlavně astmatu a chronické plicní obstrukční nemoci. Jeho výhodou je nízká cena a široká dostupnost. Mechanismus terapeutického účinku teofylinu spočívá v uvolnění hladkého svalstva průdušek za účelem uvolnění dýchacích cest. Dalším účinkem na lidský organismus je zvýšení srdeční frekvence a krevního tlaku, čímž ovládá průtok krve v ledvinách a působí protizánětlivě [39, 40].

1.2.3 Pyridinové alkaloidy

Pyridinové alkaloidy jsou sloučeniny, kde základ molekuly tvoří pyridinové jádro (*Obrázek 15*), odvozené z nikotinové kyseliny, a jeho přidruženou jednotku může tvořit buď pyrrolidinový (*Obrázek 16*) nebo piperidinový (*Obrázek 17*) kruh.



Obrázek 15: Struktura pyridinu



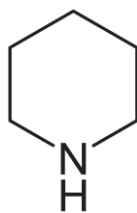
Obrázek 16: Struktura pyrrolidinu

Nedůležitějším zdrojem pyridinových alkaloidů jsou listy tabáku, které obsahují až 10 % nikotinu. Nikotin v tabákových listech téměř vždy doprovází i další pyridinové alkaloidy, z nejvíce zastoupených lze jmenovat nornikotin, antabin a anabasin. V nízkých

koncentracích působí nikotin na lidský organismus stimulačně, ve větších dávkách zvyšuje dýchací a pohybovou aktivitu a v takových dávkách může vyvolávat žaludeční nevolnosti. Velmi vysoké dávky způsobují svalový třes, který může končit kómatem. Nebezpečí pro člověka představuje rovněž pyrolytický produkt nikotinu kyanovodík, který vzniká při spalování usušených tabákových listů [16, 41].

1.2.4 Piperidinové alkaloidy

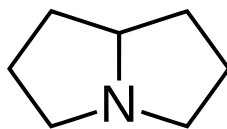
Pod pojmem piperidinové alkaloidy se skrývá okolo 700 známých sloučenin. Jedná se o deriváty esenciální aminokyseliny L-lysinu, které ve své molekule obsahují piperidinový kruh (*Obrázek 17*). Mezi významné přírodní alkaloidy této skupiny se řadí například lobelin, který má léčebné účinky na dýchací ústrojí (působí proti astmatu a podporuje dýchání), nebo piperin, který se nachází v pepři, jemuž společně s chavicinem dodává ostrou chuť [16, 22, 41].



Obrázek 17: Struktura piperidinu

1.2.5 Pyrrolizidinové alkaloidy

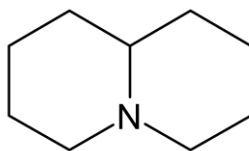
Pyrrolizidinové alkaloidy představují rozsáhlou skupinu alkaloidů, kterých bylo dosud identifikováno více než 500 a v přírodě je produkuje okolo 6000 druhů rostlin. Tyto látky patří mezi deriváty aminokyseliny ornithinu a jejich struktura vychází z molekuly pyrrolizidinu (*Obrázek 18*). V přírodě se vyskytují ve formě svých esterů (necinů), v poloze 7 mohou obsahovat hydroxylovou skupinu, navíc mohou mít hydroxylovanou také polohu 2 a 6. Většina pyrrolizidinových alkaloidů pro člověka a domácí zvířata vykazuje toxicitu, kterou určuje přítomnost dvojné vazby v poloze 1 a 2. Tyto sloučeniny se v játrech transformují na toxické pyrrolové struktury, které poškozují játra a zároveň jsou karcinogenní. Ze zástupců lze jmenovat echinatin či heliotrin nacházející se v kostivalu lékařském [16, 22].



Obrázek 18: Struktura pyrrolizidinu

1.2.6 Chinolizidinové alkaloidy

Podobně jako pyridinové nebo piperidinové alkaloidy tato skupina alkaloidů vychází z aminokyseliny lysinu, přičemž chinolizidinové alkaloidy ve své struktuře obsahují chinolizidinový heterocyklus (*Obrázek 19*). Nejvýznamnějšími alkaloidy této skupiny se nachází ve všech odrůdách vlničky (lupiny) a patří mezi ně například lupanin či spartein. Vlnička představuje hospodářsky důležitou rostlinu, protože produkuje luštěniny hodnotné pro lidskou stravu i zvířecí krmivo. Jednotlivé lupinové alkaloidy vykazují různou toxicitu, proto je nutné jejich obsah v lupinových bobech snižovat, což se provádí nejčastěji extrakcí mletých bobů vodou (máčením či vařením). Tímto procesem dochází až k stonásobnému snížení obsahu alkaloidů, které se následně využívají především jako pesticidy [16, 22].

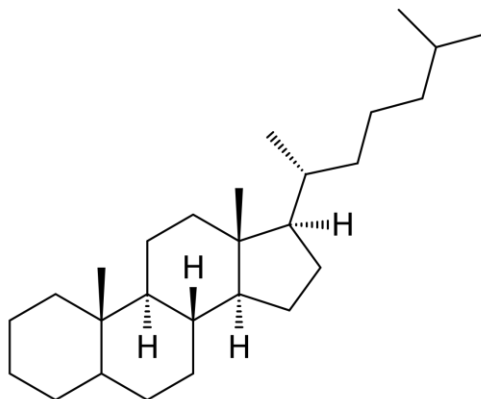


Obrázek 19: Struktura chinolizidinu

1.2.7 Steroidní glykoalkaloidy

Základní skelet steroidních glykoalkaloidů je tvořen třemi kondenzovanými šestičlennými kruhy s jedním kruhem pětičlenným. Tato struktura připadá cholestanu (*Obrázek 20*), který má původ v cholesterolu. V přírodě se nacházejí většinou ve formě esterů a glykosidů. Primárně se vyskytují v rostlinné říši jako složky ekonomicky důležitých rostlin, které slouží jako potraviny. Z rostlin je obsahují brambory, rajčata, lilek a další. Přítomnost steroidních glykoalkaloidů byla ovšem prokázána i v říši živočišné, například v ropuším jedu. Steroidní glykoalkaloidy mají významné postavení také v medicíně, protože vykazují širokou škálu biologických účinků jako jsou antimikrobiální,

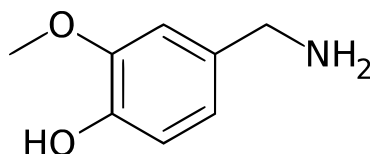
analgetické, hepatoprotektivní, imunomodulační, protirakovinné či neurogenetické [16, 41, 42, 43].



Obrázek 20: Struktura cholestanu

1.2.8 Kapsaicinoidy

Název kapsaicinoidy odpovídá skupině protoalkaloidů, které se v přírodě vyskytují ve formě vanililamidů, derivátů odvozených od vanillylaminu (*Obrázek 21*). Kapsaicinoidy vznikají jako sekundárními metabolity některých rostlinných produktů, převážně zeleniny, které dodávají hořkou chuť tzv. štiplavost. Neznámějším z rodiny kapsaicinoidů s názvem kapsaicin je aktivní složkou chilli papriček. Pro svou štiplavou chuť se používá jako potravinová přísada s jedinečným účinkem na sensorický systém bolesti. Využití kapsaicinu se neomezuje pouze na kulinářské aplikace, ale má rovněž terapeutické účinky při léčbě některých onemocnění například neuropatické bolesti, poruchách močového systému či obezity. Jeho farmakologické aplikace jsou však značně omezené kvůli celé řadě nežádoucích a toxických účinků [16, 44, 45].



Obrázek 21: Struktura vanillylaminu

1.2.9 Analýza vybraných alkaloidů separačními technikami

1.2.9.1 Analýza alkaloidů chinovníku

Alkaloidy chinovníku mají širokou škálu využití v různých oborech včetně lékařství, a proto pro jejich kvalitativní i kvantitativní analýzu již bylo vyvinuto mnoho různých chromatografických postupů. Publikováno bylo již mnoho prací, které se zabývaly separacemi alkaloidů pomocí chromatografie na tenké vrstvě [57, 58], plynové chromatografie [59, 60] či kapilární elektroforézy [61, 62, 63], žádná ze zmíněných technik ale nedosahovala výsledků vysokoúčinné kapalinové chromatografie a tyto techniky představují pouze možnou alternativu k propracovaným HPLC postupům.

Zdaleka nejrozšířenějším typem separací se pro tento typ látek ukázaly RP-HPLC analýzy na silikagelu s chemicky vázanými stacionárními fázemi, pravděpodobně z důvodu jejich obecně platných výhod, včetně příznivé ceny mobilních fází a jejich propustnosti pro UV záření, dále reprodukovatelnosti retenčních časů, kompatibility s vodnými vzorky a celkově vysoké účinnosti. Použití RP-HPLC má při separaci alkaloidů svá omezení, protože jejich bazická povaha sebou přináší možné interakce se silanolovými skupinami stacionární fáze. Tyto problémy lze vyřešit úpravou podmínek separace, například použitím alternativní stacionární fáze nebo úpravou pH mobilní fáze. Přestože převážná většina separací alkaloidů chinovníku využívá RP-HPLC, rozumné výsledky poskytují rovněž separace na normálních fázích. První práce využívající NP-HPLC pro separaci tohoto typu látek vznikaly už v počátcích HPLC [48].

Autoři Gatti, Gioia a Cavrini ve své publikaci představují jednoduchou a specifickou metodu pro současné stanovení čtyř hlavních alkaloidů kůry chinovníku, jejich dihydroderivátů a vitamínu B6. Chromatografickou separaci prováděli pomocí HPLC s fluorescenční detekcí ($\lambda_{em} = 420 \text{ nm}$ s $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$) na koloně Phenomenex Prodigy ODS (délka: 250 mm; vnitřní průměr: 3,2 mm; zrnitost: 5 μm). Jednalo se o izokratické separace v reverzním módu. Mobilní fáze obsahovala 0,5 M fosfátový pufr, připravený přidáním kyseliny ortofosforečné do vodného roztoku triethylaminu do požadované hodnoty pH 3, a acetonitril (88:12, v/v) [50].

Bajtai, Ilisz, Berkwicz, Fülöpa, Lindner a Péter se zabývali diastereo- a enantioseparací přírodních i syntetizovaných analogů alkaloidů chinovníku. Autoři zde aplikovali metody kapalinové chromatografie na normálních fázích a superkritické fluidní chromatografie,

kde používali stacionární fáze na bázi chirálních polysacharidů a mobilní fázi tvořila buď směs n-hexanu, alkoholu a dietanolaminu, nebo oxid uhličitý, alkohol a diethanolamin. Porovnávaly se separace na sedmi kolonách Chiralpak IA-IG (délka: 250 mm; vnitřní průměr: 4,6 mm; zrnitost: 5 μm). Analyty byly detekovány pomocí UV detektorů při vlnové délce 215-230 nm [51].

Bekoe, Orman, Adjabui a další vyvinuli HPLC metodu zaměřenou na chinolinové a indolchinolinové alkaloidy pro hodnocení antimalarických přípravků a jejich výchozích materiálů. Separace daných alkaloidů byla provedena na koloně Zorbax (délka: 250 mm; vnitřní průměr: 4,6 mm; zrnitost: 5 μm) v izokratickém elučním systému s mobilní fází složenou z metanolu a destilované vody s 0,1% kyseliny trifluoroctové (15:85, v/v). Detekce probíhala na UV detektoru při vlnové 223 nm [52].

Holmfred, Cornett, Maldonado, Rønsted a Hansen publikovali optimalizovanou HPLC metodu účinnou pro separaci a kvantifikaci čtyř hlavních alkaloidů kůry chinovníku. K separacím využili kolonu Kinetex XB-C18 (délka: 150 mm; vnitřní průměr: 2,1 mm; zrnitost: 2,6 μm) v systému s reverzními fázemi. Pracovalo se v podmínkách gradientu, kde organickou složku mobilní fáze tvořil 100% methanol a vodná fáze obsahovala 0,2 M pufr mravenčanu amonného s 0,1% kyseliny mravenčí (pH 3,5). Látky byly detekovány pomocí dvou typů detektorů, a to fluorescenční ($\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ s $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$) a UV detektor (250 a 330 nm) [53].

1.2.9.2 Analýza příbuzných metylxantinů

Kofein společně s jeho metabolity teobrominem a teofylinem jsou pravděpodobně nejdůležitějšími alkaloidy z této kategorie. Tyto sloučeniny vykazují významné bioaktivní účinky, proto jim věnuje pozornost hlavně potravinářský a farmaceutický průmysl. K současnému stanovení všech tří alkaloidů v různých matricích bylo do této doby aplikováno velké množství chromatografických technik. V současnosti se však nejčastěji přistupuje k využití kapalinové chromatografie, kdy se ve většině postupů uplatňují separace na reverzních fázích s UV detekcí. Navrženy byly také metody RP-LC pracující s fosforimetrickou [64, 65], hmotnostně spektrometrickou [66, 67, 68] či elektrochemickou detekcí [69, 70, 71]. Jako vhodnou alternativní technikou se ukázala i iontová [72] nebo micelární kapalinová chromatografie s UV detekcí [24], které rovněž poskytují uspokojivé výsledky [49].

Bispo společně s kolektivem dalších autorů vyvinuli analytickou metodu pro současné stanovení tří metylxantinů (kofeinu, teobrominu a teofylinu) v nápojích a vzorcích moči. Tato metoda je založena na RP-HPLC separaci a nevyžaduje žádný extrakční krok ani derivatizaci. Separace prováděli na koloně Bondesil C18 (délka: 150 mm; vnitřní průměr: 4 mm; zrnitost: 5 μ m) s mobilní fází obsahující alkohol (metanol či etanol), destilovanou vodu a kyselinu octovou (20:75:5, v/v/v). Identifikace látek zde byla provedena při vlnové délce 273 nm pomocí UV detektoru [54].

Srdjenovic, Djordjevic-Milic, Grujic, Injac a Lepojevic představili rychlou a selektivní RP-HPLC metodu pro separaci tří hlavních metylxantinů, kterou lze použít pro rutinní kontrolu kvality potravin, nápojů a rostlinných produktů. Separaci prováděli na koloně Zorbax Eclipse XDB-C8 (délka: 150 mm; vnitřní průměr: 4,6 mm; zrnitost: 5 μ m), kde vodnou fází tvořila destilovaná voda s 0,1 % tetrahydrofuranu a organickou složku čistý acetonitril. Složky byly smíseny v poměru 90:10, v/v a k detekci byl využit UV detektor s nastavenou vlnovou délkou 273 nm [55].

Huck, Guggenbichler a Bonn ve své studii porovnávali analýzu kofeinu, teobrominu a teofylinu pomocí infračervené spektroskopie v blízké oblasti (NIRS) s HPLC ve spojení s UV a hmotnostně spektrometrickou detekcí s ionizací elektrosprejem (HPLC-ESI-MS). K HPLC-UV separaci používali dvě kolony, a to neporézní Kovalsil (délka: 33 mm; vnitřní průměr: 4,6 mm; zrnitost: 1,5 μ m) a porézní Nucleosil MS-C18 100-5 C18 (délka: 250 mm; vnitřní průměr: 4,6 mm; zrnitost: 5 μ m). Mobilní fáze obsahovala destilovanou vodu s 0,1 % kyseliny octové a acetonitril (98:2, v/v) a k detekci byla zvolena vlnová délka 280 nm. HPLC-ESI-MS separace prováděli pouze na neporézní koloně Kovalsil MS-C18 za použití stejné mobilní fáze jako při HPLC-UV separacích. Tyto optimalizované HPLC metody byly vyhodnoceny jako vhodné referenční metody pro NIRS analýzu této skupiny alkaloidů [56].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Náplní experimentální části bylo navrhnout a optimalizovat izokratickou metodu pro pět různých kolon při separaci vybraných alkaloidů pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi ve spojení s UV/VIS detektorem. Použitými alkaloidy byly konkrétně cinchonin, kofein, chinidin, hydrochinin, hydrochinidin, cinchonidin, hydrocinchonin, teofylin, teobromin a chinin. Při izokratických separacích se hledalo optimální složení mobilní fáze pro jednotlivé kolony a na základě izokratických dat byly následně vybrány dvě kolony, na kterých se dané látky dělily nejlépe a tyto dvě kolony byly využity pro tvorbu metody v podmínkách gradientové eluce.

2.1 Materiál a chemikálie

2.1.1 Přístrojové vybavení

Navazování chemikálií a standardních látek bylo provedeno na analytických digitálních vahách (Sartorius, Ústí nad Labem, Česká republika).

K odměřování objemů v řádech mikrolitrů byly použity automatické mikropipety (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Analýza za izokratických podmínek byla prováděna pomocí HPLC systému Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), jehož součástí bylo binární čerpadlo, autosampler, termostat kolony a UV/VIS spektrofotometrický detektor, schopný měřit jednu konkrétní vlnovou délku.

Separace s využitím gradientové eluce byly provedeny za využití UHPLC systému Agilent Infinity II PRIME (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), který se skládal z kvartérního čerpadla, autosampleru, termostatu kolony, detektor s diodovým polem (DAD) a MS detektoru typu jednoduchého kvadrupólu (ten ovšem nebyl v této práci využit). Tento systém byl využit pro gradientové separace z důvodu nižšího zpoždění gradientu.

2.1.2 Kolony

Pro tuto práci bylo vybráno pět kolon určených pro separaci v módu reverzních fází:

1. Luna Omega Polar C18 (délka: 150 mm; vnitřní průměr: 3 mm; zrnitost: 3 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA)
2. Luna Omega PS C18 (délka: 150 mm; vnitřní průměr: 3 mm; zrnitost: 3 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA)
3. Kinetex Biphenyl (délka: 150 mm; vnitřní průměr: 2,1 mm; zrnitost: 2,6 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA)
4. ACE C18-PFP (délka: 150 mm; vnitřní průměr: 3 mm; zrnitost: 3 μm ; Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, UK)
5. Kinetex Polar C18 (délka: 150 mm; vnitřní průměr: 3 mm; zrnitost: 2,6 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA)

2.1.3 Chemikálie

- Acetonitril (HPLC grade, Scharlau, Barcelona, Španělsko)
- Demineralizovaná voda opatřená purifikací v systému Mili-Q® (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- Kyselina octová ($\geq 99,8\%$, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)
- Metanol ($\geq 99,9\%$, Honeywell, Charlotte, NC, USA)
- Octan amonný ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)

2.1.4 Standardní látky

- Cinchonin (čistý, Lachema, Brno, Československo)
- Cinchonidin (96 %, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)
- Hydrocinchonin ($\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)
- Hydrochinidin ($\geq 95\%$, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)
- Hydrochinin (96 %, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)
- Chinidin ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)
- Chinin ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)
- Kofein (ze zásob Univerzity Pardubice)
- Teobromin ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)
- Teofylin ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA)
- Thiomočovina (ze zásob Univerzity Pardubice)

2.2 Příprava roztoků standardů

Nejdříve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých standardů o koncentraci 1 mg/ml. Na analytických vahách byl navážen 1 mg každého standardu, který byl následně převeden do vialky a rozpuštěn v 1 ml metanolu, s výjimkou chininu, který se v čistém metanolu rozpouštěl špatně. Zásobní roztok chininu byl připraven tak, že byl navážen 1 mg této látky, který byl rozpuštěn ve 1 ml směsi metanolu a destilované vody (1:1).

Z takto připravených zásobních roztoků byly připraveny roztoky standardů (každý zvlášť a směs) o koncentraci 10 mg/l a celkový objem byl doplněn destilovanou vodou na objem 1 ml. Stejným způsobem byl připraven i roztok thiomocoviny, který byl využit pro zjištění mrtvého času u každé kolony. Tyto roztoky byly následně použity pro HPLC analýzy.

2.3 HPLC analýza standardů

2.3.1.1 Separace za izokratických podmínek

Analýzy standardních roztoků byly prováděny v systémech s obrácenými fázemi. Jako mobilní fáze byl použit acetonitril (ACN) a destilovaná voda, jejichž vzájemné poměry byly v průběhu optimalizace měněny. Z důvodu bazických vlastností alkaloidů byl nutný přídavek kyseliny octové, a to konkrétně 0,1 % (v/v). Pro separaci látek na 3. koloně (Kinetex Biphenyl) byl navíc nutný také přídavek octanu amonného jako pufru o koncentraci 5 mM. Teplota kolony byla udržována na hodnotě 30 °C, objem dávkovaný na kolonu byl nastaven na 1 µl a pro detekci látek byla použita vlnová délka 250 nm. Průtok mobilní fáze byl pro kolony č. 1; 2; 4 a 5 nastaven na hodnotu 0,4 ml/min. Z důvodů nižšího vnitřního průměru kolony č. 3 a tlakových limitů systému byl průtok u této kolony nastaven na hodnotu 0,27 ml/min.

Hodnoty úrovní koncentrací ACN v mobilní fázi byly voleny pro každou kolonu individuálně v rozmezí 2–30 %, přičemž pro každou kolonu, resp. byly využity 4 takové úrovně. Použité koncentrace ACN jako organického modifikátoru mobilní fáze pro každou kolonu jsou shrnuty v *Tabulce 1*.

Tabulka 1: Rozdělení mobilních fází u jednotlivých kolon

	Kolona	Mobilní fáze	Koncentrace ACN	Průtok
1.	Luna Omega Polar C18	ACN/H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH	10, 15, 20, 25 %	0,4 ml/min
2.	Luna Omega PS C18	ACN/H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH	2, 5, 10, 13 %	0,4 ml/min
3.	Kinetex Biphenyl	ACN/H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH + 5 mM CH ₃ COONH ₄	5, 10, 15, 20, 25, 30 %	0,27 ml/min
4.	ACE C18-PFP	ACN/H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH	10, 15, 20, 25 %	0,4 ml/min
5.	Kinetex Polar C18	ACN/H ₂ O + 0,1 % CH ₃ COOH	3, 6, 9, 12 %	0,4 ml/min

2.3.1.2 Gradientová eluce

Na základě výsledků optimalizací za izokratických podmínek eluce, byly vybrány dvě nejlepší kolony, které byly využity pro separace za podmínek gradientové eluce. Separace v izokratickém módu pro dané látky dopadly nejlépe na 1. a 4. koloně (Luna Omega Polar C18 a ACE C18-PFP), a tudíž byly upřednostněny právě tyto.

Analýza byla prováděna v systému s obrácenými fázemi při různě strmých gradientových profilech. Mobilní fáze zde byla tvořena směsí destilované vody s 0,1 % (v/v) kyseliny octové (složka A) a acetonitrilu (složka B). Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min, dávkovaný objem na 1 μ l a teplota kolony byla udržována na 30 °C. K detekci látek byl využit DAD detektor. Průběh finálního profilu gradientu pro kolonu Luna Omega Polar C18 byl následující: 5–20 % B od 0 do 30 min. Průběh finálního profilu gradientu pro kolonu ACE C18-PFP byl následující: 5–25 % B od 0 do 15 min.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 Optimalizace izokratické eluce

Izokratická analýza byla provedena na kapalinovém chromatografu Agilent 1260 Infinity v systému s reverzními fázemi, jehož součástí je spektrofotometrický UV/VIS detektor. Vzhledem k odlišným hodnotám vlnových délek absorpčních maxim jednotlivých látek byla na základě informací z dostupných zdrojů k detekci zvolena vlnová délka 250 nm, při které bylo možno detekovat všechny látky.

Na jednotlivých kolonách byl nejprve proměřen směsný roztok při vhodné koncentraci acetonitrilu (ACN). Na základě retenčního času posledního píku v chromatogramu byla vybrána vhodná délka analýzy a následně byl celkem ve třech opakováních proměřen každý standard zvlášť. Následně byl tento proces urychlen a vhodná doba analýzy byla pro každou látku hodnocena individuálně. Takto byly pro každou kolonu naměřeny čtyři různé úrovně koncentrace ACN v mobilní fázi, s výjimkou separace na třetí koloně, kde bylo nutné použít šest úrovní koncentrace ACN. Zároveň byl na každé koloně proměřen třikrát roztok thiomochoviny pro získání hodnoty mrtvého objemu kolony.

Ze změřených chromatogramů byly odečteny retenční časy jednotlivých látek. U roztoku thiomochoviny se odečítala kromě retenčního (mrtvého) času navíc také šířka píku v polovině jeho výšky a tato data byla následně použita pro výpočet účinnosti chromatografické kolony pomocí *Rovnice 4*. Retenční časy jednotlivých látek sloužily pro výpočet retenčního faktoru k dle *Rovnice 5*, jehož logaritmické hodnoty byly použity k sestrojení retenčních modelů, které poskytly základní informace pro výpočet rozlišení jednotlivých dvojic látek (*Rovnice 6*). Lineární regresí experimentálních dat byly určeny parametry modelu a a m , které sloužily k výpočtu rozlišení (*Rovnice 2*). Vypočtené hodnoty rozlišení byly použity k sestrojení okénkových diagramů, z nichž se následně odečítala hodnota koncentrace ACN, při které má separace optimální průběh.

Rovnice 4: Výpočet účinnosti chromatografické kolony

$$N = 5,545 \cdot \left(\frac{t_M}{w_{0,5}} \right)^2$$

N ... účinnost kolony

t_M ... mrtvý čas kolony

$w_{0,5}$... šířka píku v polovině výšky

Rovnice 5: Výpočet retenčního faktoru k

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

k ... retenční faktor

t_R ... retenční čas látky

t_M ... mrtvý čas kolony

Rovnice 6: Izokratický retenční model

$$\log k = a - m \cdot \varphi_{ACN}$$

k ... retenční faktor

a ... parametr modelu (úsek)

m ... parametr modelu (směrnice)

φ_{ACN} ... koncentrace ACN

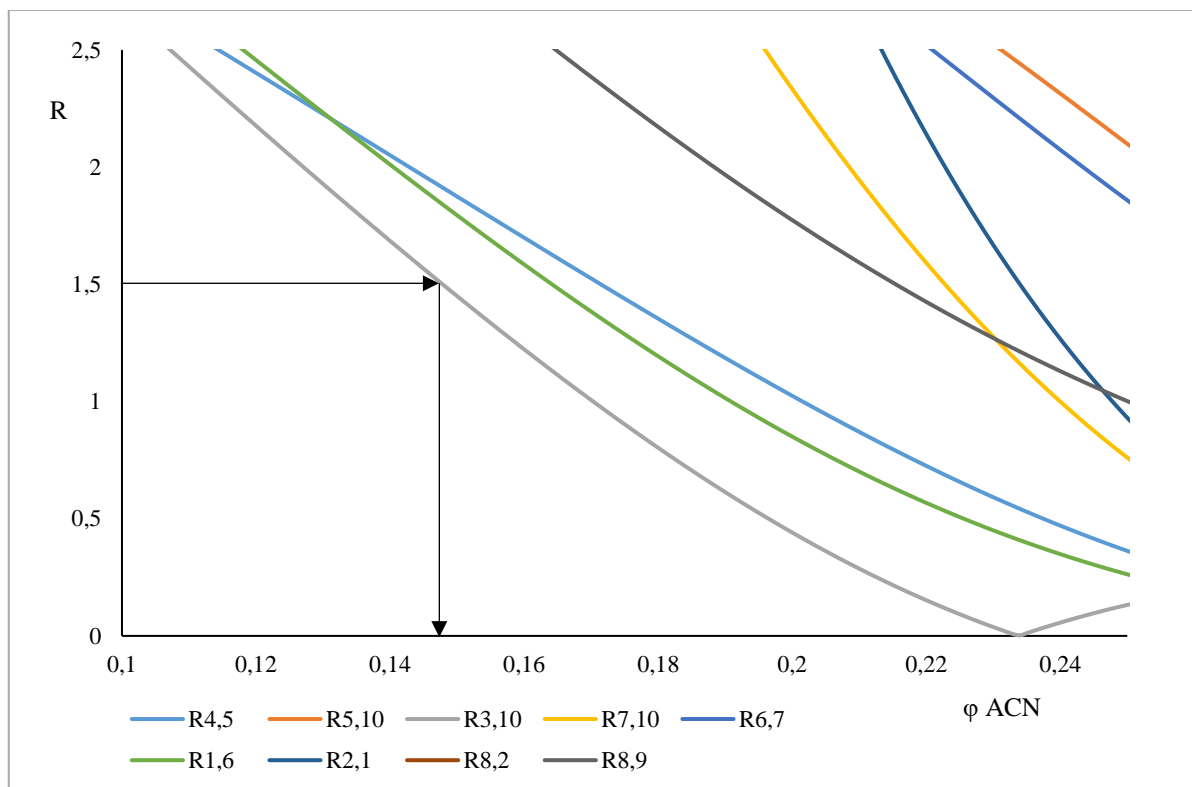
3.1.1 Luna Omega Polar C18

Separace látek na první koloně proběhly beze změny pořadí eluce látek, což je patrné z retenčních modelů (*Příloha 1*). Pro tuto kolonu byly proměřeny koncentrace acetonitrilu 10, 15, 20 a 25 %. Hodnoty retenčních faktorů vypočtené z průměrných retenčních časů ze tří analýz pro jednotlivé látky jsou uvedeny v *Tabulce 2*. Účinnost této kolony, vypočtená z mrtvého času 2,115 minut, se rovnala 4567 teoretických pater a z okénkového diagramu (*Obrázek 22*) byla odečtena optimální koncentrace ACN pro danou separaci, která činila 14,7 %.

Tabulka 2: Hodnoty retenčních faktorů pro kolonu Luna Omega Polar C18

Látka	Koncentrace ACN			
	10 %	15 %	20 %	25 %
1 Cinchonin	6,132	2,338	1,001	0,425
2 Kofein	2,893	1,228	0,635	0,368
3 Chinidin	12,044	4,385	1,627	0,721
4 Hydrochinin	20,839	6,670	2,332	0,987
5 Hydrochinidin	17,675	5,952	2,151	0,940
6 Cinchonidin	7,126	2,861	1,074	0,445
7 Hydrocinchonin	9,279	3,664	1,408	0,617
8 Teofylin	1,358	0,585	0,282	0,141
9 Teobromin	0,881	0,376	0,171	0,072
10 Chinin	14,272	4,769	1,693	0,711

Obrázek 22: Okénkový diagram pro kolonu Luna Omega Polar C18



3.1.2 Luna Omega PS C18

Tato kolona umožňuje separaci látek i při 0 % organického rozpouštědla, proto se pracovalo s mobilními fázemi o koncentracích acetonitrilu 2, 5, 10 a 13 %. Z retenčních modelů (*Příloha 2*) vyplývá, že při separaci látek na druhé koloně již byly pozorovány změny pořadí eluce separovaných látek. Hodnoty retenčních faktorů vypočtené z retenčních časů jednotlivých látek jsou uvedeny v *Tabulce 3*. Účinnost této kolony, vypočtená z mrtvého času 1,993 minut, se rovnala 5229 teoretických pater a z okénkového diagramu (*Obrázek 23*) byla odečtena optimální koncentrace ACN pro danou separaci, která činila 5,7 %.

Tabulka 3: Hodnoty retenčních faktorů pro kolonu Luna Omega PS C18

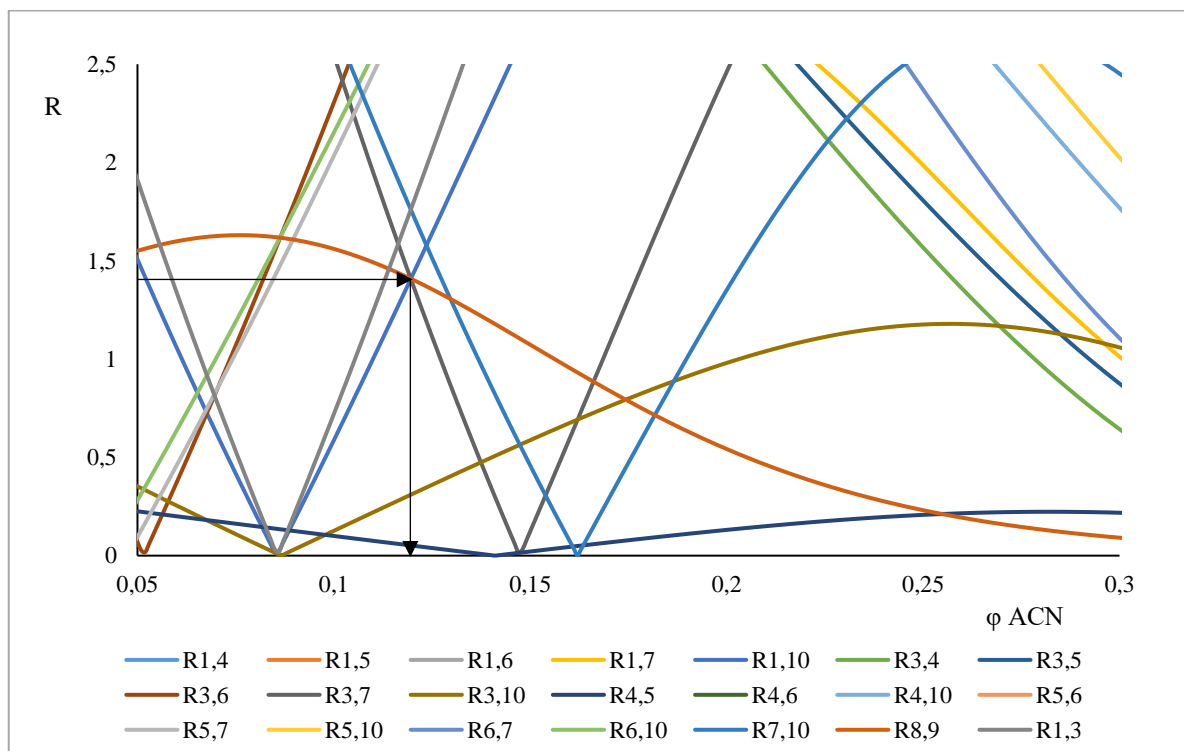
	Látka	Koncentrace ACN			
		3 %	5 %	10 %	13 %
1	Cinchonin	13,162	2,777	0,460	0,055
2	Kofein	41,442	9,973	3,270	1,678
3	Chinidin	29,940	5,651	1,075	0,241
4	Hydrochinin	71,000	11,769	2,270	0,675
5	Hydrochinidin	53,601	9,086	1,788	0,512
6	Cinchonidin	16,856	3,264	0,607	0,131
7	Hydrocinchonin	22,975	4,455	0,907	0,194
8	Teofylin	16,388	4,400	1,492	0,764
9	Teobromin	9,041	2,419	0,809	0,397
10	Chinin	41,774	7,185	1,385	0,329

pro danou separaci, která činila 12,1 %, ale ani na této úrovni nedocházelo k separaci všech dvojic látek.

Tabulka 4: Hodnoty retenčních faktorů pro kolonu Kinetex Biphenyl

Látka		Koncentrace ACN					
		5 %	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %
1	Cinchonin		43,369	10,009	3,395	1,353	
2	Kofein		4,247	1,463	0,680	0,350	
3	Chinidin			18,691	5,906	2,154	1,281
4	Hydrochinin			25,622	7,862	2,764	1,375
5	Hydrochinidin			25,648	7,976	2,846	1,426
6	Cinchonidin		37,698	8,873	3,176	1,265	
7	Hydrocinchonin		58,599	13,357	4,669	1,826	
8	Teofylin	5,962	1,276	0,482	0,234		
9	Teobromin	5,110	0,982	0,349	0,164		
10	Chinin			17,108	5,380	1,961	1,003

Obrázek 24: Okénkový diagram pro kolonu Kinetex Biphenyl



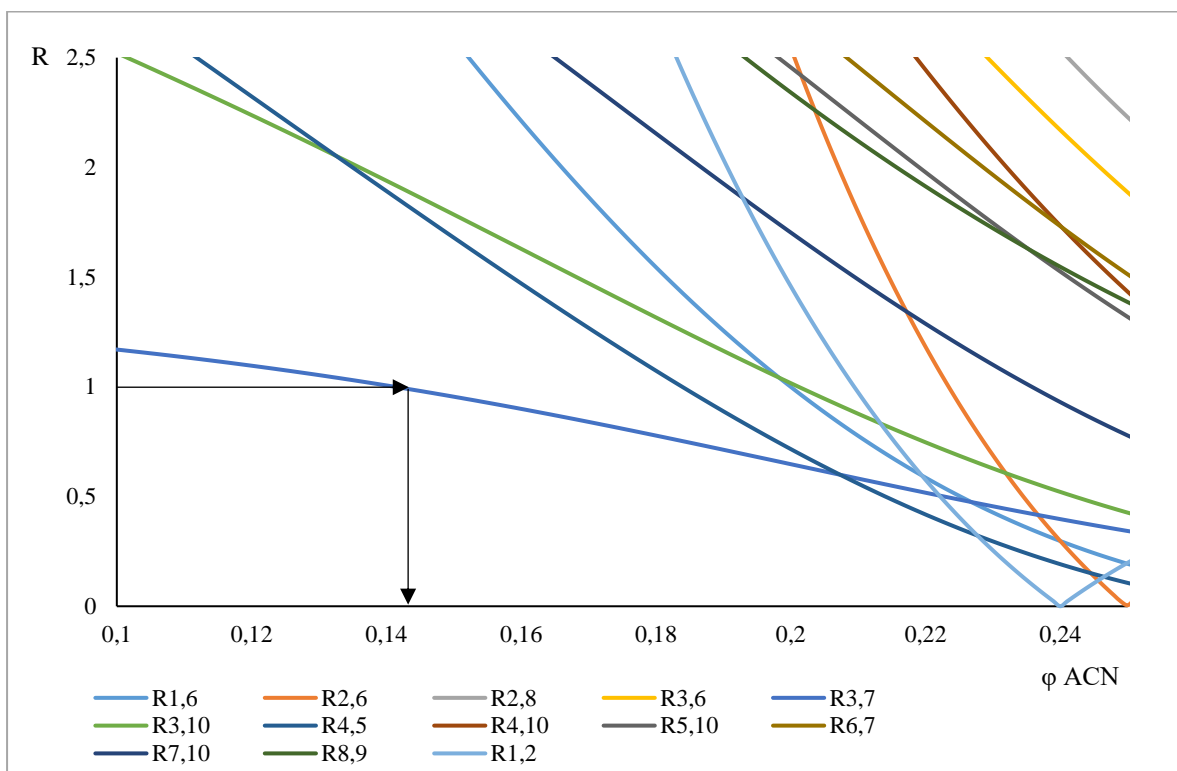
3.1.4 ACE C18-PFP

Na čtvrté koloně se měřily koncentrace acetonitrilu 10, 15, 20 a 25 %. V grafu retenčních modelů (*Příloha 4*) lze pozorovat změnu pořadí eluce pouze při nejvyšší koncentraci ACN, kde mají retenční časy všech látek podobné a velmi nízké hodnoty. Hodnoty retenčních faktorů vypočtené z průměrných retenčních časů jednotlivých látek jsou uvedeny v *Tabulce 5*. Účinnost této kolony, vypočtená z mrtvého času 1,873 minut, se rovnala 4576 teoretických pater a z okénkového diagramu (*Obrázek 25*) byla odečtena optimální koncentrace ACN, pro danou separaci, která činila 14,4 %. V této separaci byla zvolena koncentrace s rozlišením 1, jelikož dvojice látek chinidin-hydrocinchonin (3-7) nad rozlišení 1,5 na této koloně rozdělit nelze.

Tabulka 5: Hodnoty retenčních faktorů pro kolonu ACE C18-PFP

Látka		Koncentrace ACN			
		10 %	15 %	20 %	25 %
1	Cinchonin	5,833	1,876	0,646	0,336
2	Kofein	2,894	1,135	0,572	0,341
3	Chinidin	11,012	3,094	1,041	0,534
4	Hydrochinin	19,634	4,824	1,527	0,736
5	Hydrochinidin	16,745	4,297	1,433	0,724
6	Cinchonidin	8,142	2,127	0,745	0,359
7	Hydrocinchonin	0,911	2,746	0,985	0,503
8	Teofylin	1,345	0,537	0,270	0,177
9	Teobromin	0,725	0,297	0,152	0,069
10	Chinin	12,558	3,574	1,187	0,563

Obrázek 25: Okénkový diagram pro kolonu ACE C18 PFP



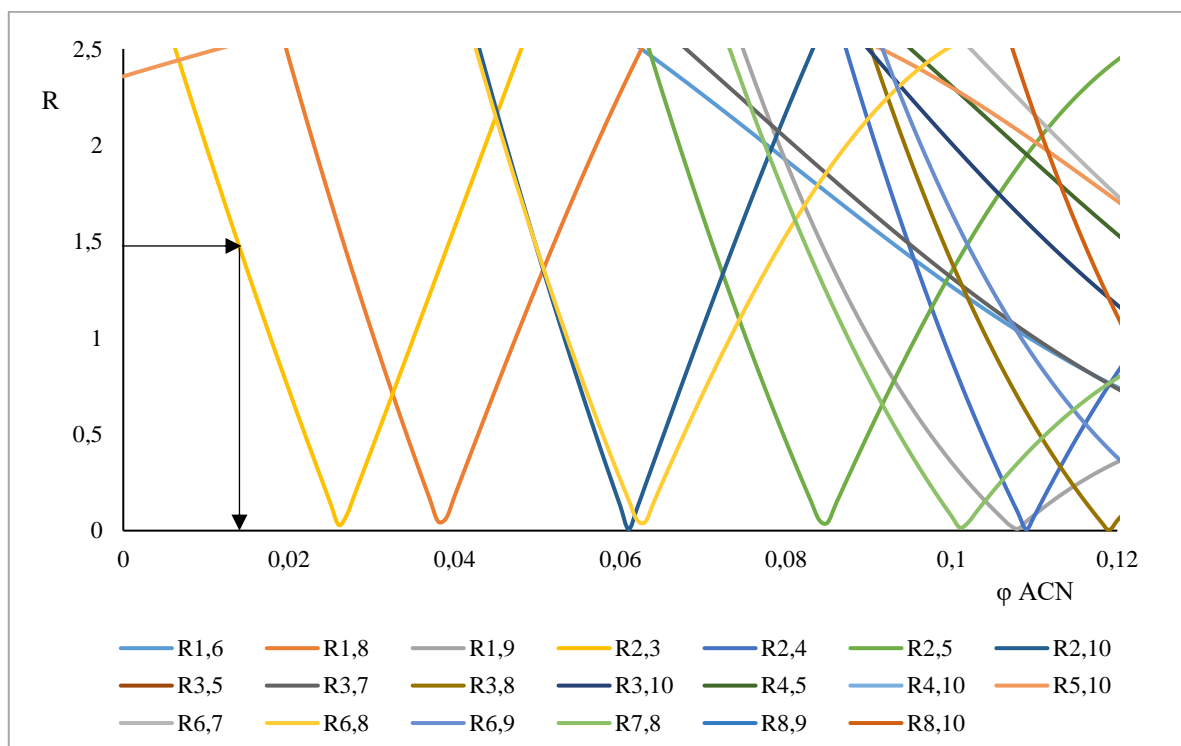
3.1.5 Kinetex Polar C18

Pátá kolona stejně jako druhá kolona umožňovala separace látek při 0 % ACN. Pro separace na této koloně byly použity mobilní fáze o koncentraci acetonitrilu 3, 6, 9 a 12 %. Na této koloně byly u některých látek také pozorovány změny v pořadí eluce, což je patrné z retenčního modelu (Příloha 5). Hodnoty retenčních faktorů vypočtené z průměrných retenčních časů jednotlivých látek jsou uvedeny v Tabulce 6. Účinnost této kolony, vypočtená z mrtvého času 1,613 minut, se rovnala 3601 teoretických pater a z okénkového diagramu (Obrázek 26) byla odečtena optimální koncentrace ACN pro danou separaci, která činila 1,4 %.

Tabulka 6: Hodnoty retenčních faktorů pro kolonu Kinetex Polar C18

Látka	Koncentrace ACN			
	3 %	6 %	9 %	12 %
1 Cinchonin	6,713	2,093	0,853	0,255
2 Kofein	15,804	5,367	2,630	1,249
3 Chinidin	14,856	4,194	1,665	0,567
4 Hydrochinin	32,496	8,418	3,273	1,099
5 Hydrochinidin	24,830	6,576	2,621	0,900
6 Cinchonidin	8,543	2,552	1,060	0,318
7 Hydrocinchonin	11,478	3,400	1,440	0,483
8 Teofylin	6,675	2,410	1,236	0,588
9 Teobromin	3,646	1,304	0,664	0,309
10 Chinin	20,472	5,427	2,195	0,679

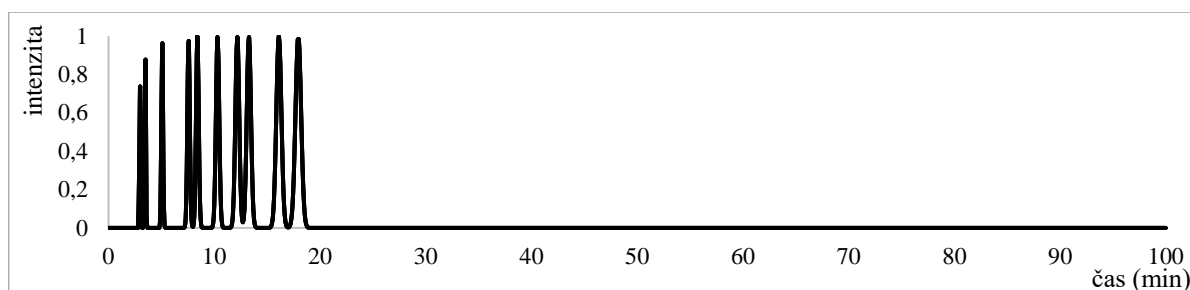
Obrázek 26: Okénkový diagram pro kolonu Kinetex Polar C18



3.1.6 Srovnání průběhu separací na jednotlivých kolonách

Pro separaci na koloně Luna Omega Polar C18 byla vyhodnocena jako optimální koncentrace mobilní fáze pro separaci 14,7 % ACN. Při této koncentraci jsou vybrané alkaloidy rozděleny alespoň na základní linii za poměrně krátký čas v porovnání s ostatními kolonami (do 20 minut; měřítko časové osy je nastaveno do 100 min pro porovnání s ostatními použitými kolonami). Jako nejvíce problematické se zde jeví dvojice látek cinchonin-cinchonidin (1-6) a chinidin-chinin (3-10). Teoretickou separaci vycházející z výsledků optimalizace pro tuto kolonu znázorňuje *Obrázek 27*.

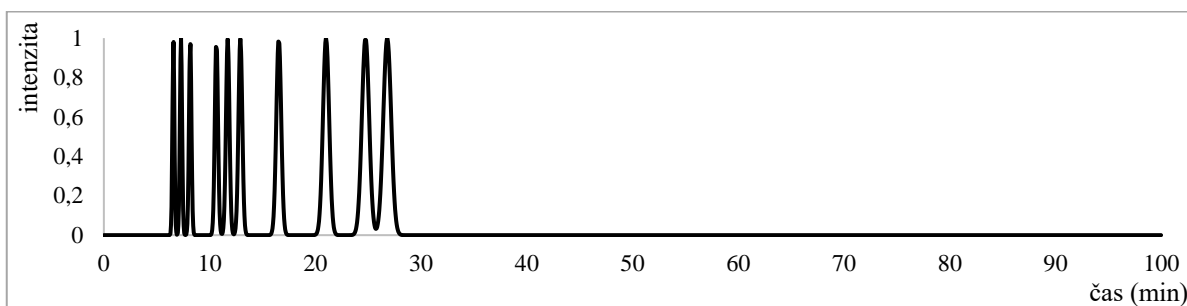
Obrázek 27: Teoretický model chromatogramu za optimálních podmínek na koloně Luna Omega Polar C18



Pořadí eluce: teobromin (9), teofylin (8), kofein (2), cinchonin (1), cinchonidin (6), hydrocinchonin (7), chinidin (3), chinin (10), hydrochinidin (5), hydrochinin (4)

U kolony Luna Omega PS C18 se ukázala jako nejvhodnější separace při koncentraci ACN 5,7 %, kdy se látky dělí také poměrně rychle. Z okénkového diagramu této kolony je patrné, že při izokratické eluci se sice všechny látky dělí, ale pouze ve velmi úzkém rozsahu koncentrací ACN. Při koncentraci 5,7 % ACN se látky dělí do 30 minut, ale všechny dvojice nejsou rozseparovány až na základní linii. Kritickou dvojicí je v těchto podmínkách dvojice hydrochinin-hydrochinidin (4-5), ale na základní linii nedosahuje ani dvojice chinidin-hydrocinchonin (3-7). Teoretickou separaci vycházející z výsledků optimalizace pro tuto kolonu znázorňuje *Obrázek 28*.

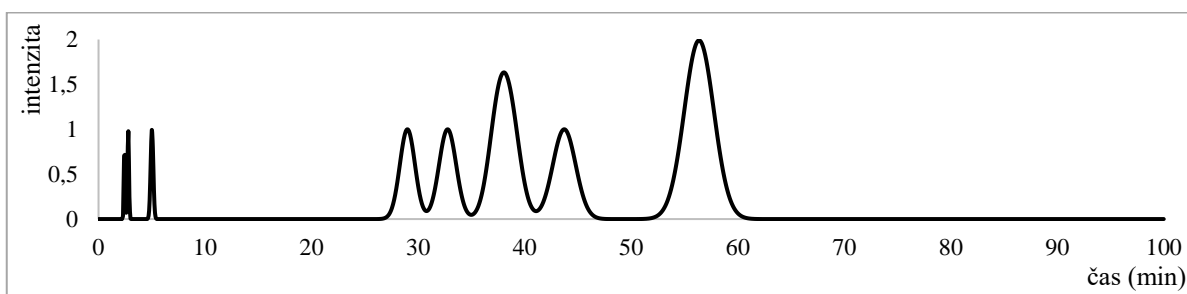
Obrázek 28: Teoretický model chromatogramu za optimálních podmínek na koloně Luna Omega PS C18



Pořadí eluce: cinchonin (1), teobromin (9), cinchonidin (6), hydrocinchonin (7), teofylin (8), chinidin (3), chinin (10), hydrochinidin (5), kofein (2), hydrochinin (4)

Nejméně vhodné vlastnosti pro separaci daných alkaloidů vykazala kolona Kinetex Biphenyl, na které byla zvolena jako optimální koncentrace 12,1 % ACN v mobilní fázi. Problémem je, že ani při této koncentraci není většina látek rozdělena na základní linii a některé dvojice, konkrétně chinidin-chinin (3-10) a hydrochinin-hydrochinidin (4-5), se neseparují vůbec. Separace na této koloně vyžadují také velmi dlouhou dobu analýzy, kdy při koncentraci 12,1 % poslední látky eluují až před 57. minutou. Na této koloně byla také zaznamenána výrazně nižší separační účinnost v porovnání s ostatními kolonami. Teoretickou separaci vycházející z výsledků optimalizace pro tuto kolonu znázorňuje *Obrázek 29*.

Obrázek 29: Teoretický model chromatogramu za optimálních podmínek na koloně Kinetex Biphenyl

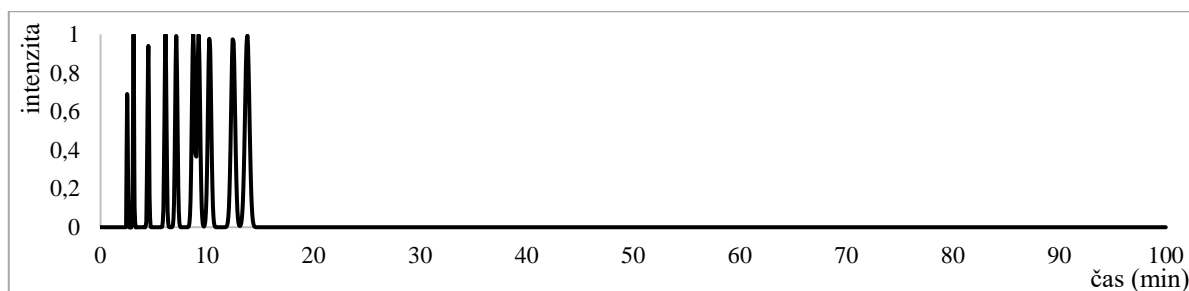


Pořadí eluce: teobromin (9), teofylin (8), kofein (2), cinchonidin (6), cinchonin (1), chinin + chinidin (10+3), hydrocinchonin (7), hydrochinidin + hydrochinin (5+4)

Na koloně ACE-C18 PFP kvůli dvojici látek chinidin-hydrocinchonin nebylo možné dosáhnout rozdělení všech alkaloidů s rozlišením alespoň 1,5. Z toho důvodu byla

vyhodnocena jako optimální koncentrace ACN 14,4 %, při které je hodnota rozlišení rovna 1. Tato kolona při optimální koncentraci ACN umožňuje nejkratší dobu analýzy ze všech použitých kolon, kdy všechny látky eluují do 15 minut. Teoretickou separaci vycházející z výsledků optimalizace pro tuto kolonu znázorňuje *Obrázek 30*.

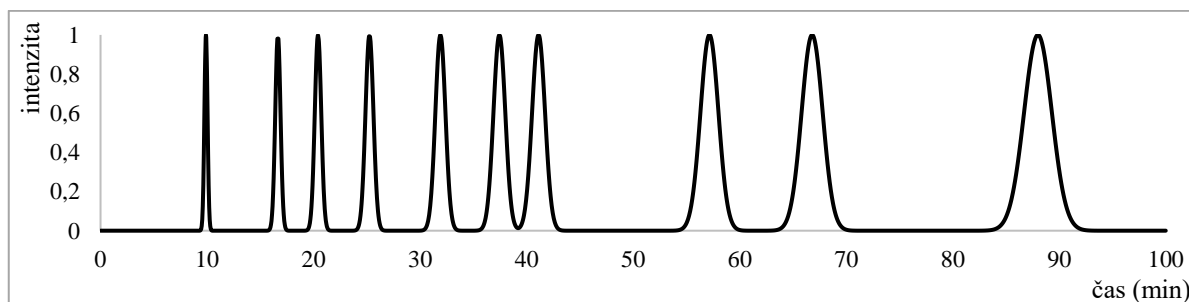
Obrázek 30: Teoretický model chromatogramu za optimálních podmínek na koloně ACE-C18 PFP



Pořadí eluce: teobromin (9), teofylin (8), kofein (2), cinchonin (1), cinchonidin (6), hydrocinchonin (7), chinidin (3), chinin (10), hydrochinidin (5), hydrochinin (4)

U kolony Kinetex Polar C18 byla určena jako optimální koncentrace 1,4 % ACN. Tato hodnota může být použita ovšem pouze v teoretické rovině, protože v praktickém užití může být na této koloně použita mobilní fáze o koncentraci minimálně 3 % ACN, a to kvůli možnosti zhroucení C18 řetězců stacionární fáze. Při teoretické koncentraci 1,4 % ACN jsou všechny látky separovány na základní linii, ale vyžadují velmi dlouhou dobu analýzy, protože poslední látka eluuje až v 88. minutě. Teoretickou separaci vycházející z výsledků optimalizace pro tuto kolonu znázorňuje *Obrázek 31*.

Obrázek 31: Teoretický model chromatogramu za optimálních podmínek na koloně Kinetex Polar C18



Pořadí eluce: teobromin (9), teofylin (8), cinchonin (1), cinchonidin (6), kofein (2), hydrocinchonin (7), chinidin (3), chinin (10), hydrochinidin (5), hydrochinin (4)

Pro teoretickou představu o daných separacích byly vypracovány optimalizace separací. Tyto optimalizace vycházely z již zmiňovaných retenčních modelů, které sice neměly ideálně lineární charakter, ale k porovnání jednotlivých kolon byly získané informace dostatečné. Na základě provedených optimalizací byly jako nejvhodnější pro danou separaci vybrány kolony Luna Omega Polar C18 a ACE C18-PFP (1. a 4. kolona), protože umožnily rozdělení všech vybraných alkaloidů ze směsi s vhodným rozlišením za rozumný čas. Nejhorší schopnosti separace tohoto typu sloučenin vykazala třetí použitá kolona (Kinetex Biphenyl), na které nebylo možné nalézt takové optimální podmínky, při kterých by byly všechny látky rozděleny alespoň na základní linii. Společné pro všech pět kolon bylo podobné eluční pořadí látek, ve kterém byly pozorovány pouze drobné změny. Mezi nejméně zadržované látky s nejkratšími retenčními časy na všech kolonách patřily teobromin (9), teofylin (8) a cinchonin (1). Naopak nejvíce zadržovanými s nejdělsími retenčními časy byly hydrochinin (4) a hydrochinidin (5).

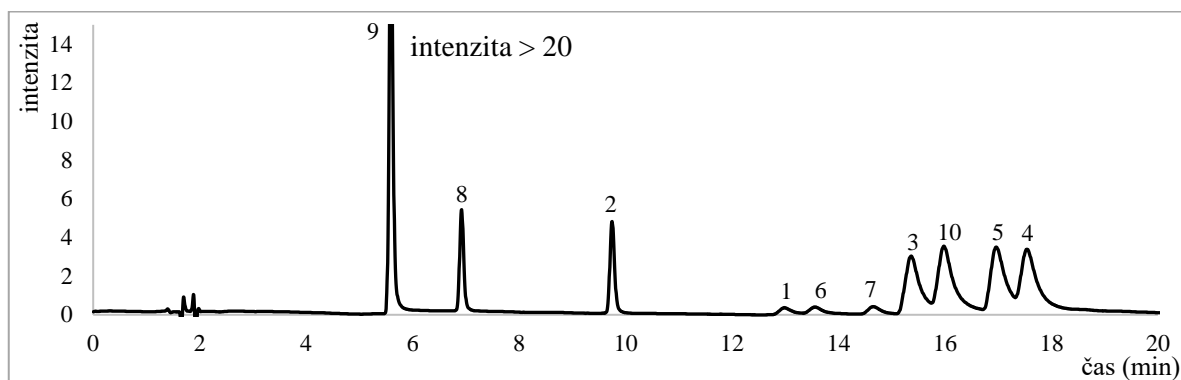
3.2 Analýza v podmínkách gradientu

Po zhodnocení separací v izokratických podmínkách následovala tvorba gradientu, ke které se přistoupilo za účelem zkrácení celkové doby analýzy, dosažení užších píků a tím i vyšších intenzit. Gradientové eluci byly podrobeny pouze dvě nejlepší kolony z předchozích izokratických separací, jmenovitě Luna Omega Polar C18 a ACE C18-PFP.

Gradientové separace byly provedeny na kapalinovém chromatografu Agilent Infinity II PRIME v systému s reverzními fázemi, jehož součástí je DAD, ze kterého byla navíc získána spektra jednotlivých látek (*Příloha 7-16*). K detekci látek byla stejně jako při izokratické eluci nastavena vlnová délka 250 nm. Důvod použití odlišeného chromatografu bylo v tomto případě nedokonalé mísení mobilních fází prvním přístrojem, které je v případě gradientové eluce kritické. Chromatograf použitý pro určení izokratických retenčních dat také vykazoval výrazně vyšší zpoždění gradientu (0,9 ml [73]) v porovnání se systémem Agilent Infinity II PRIME (0,11 ml [74]).

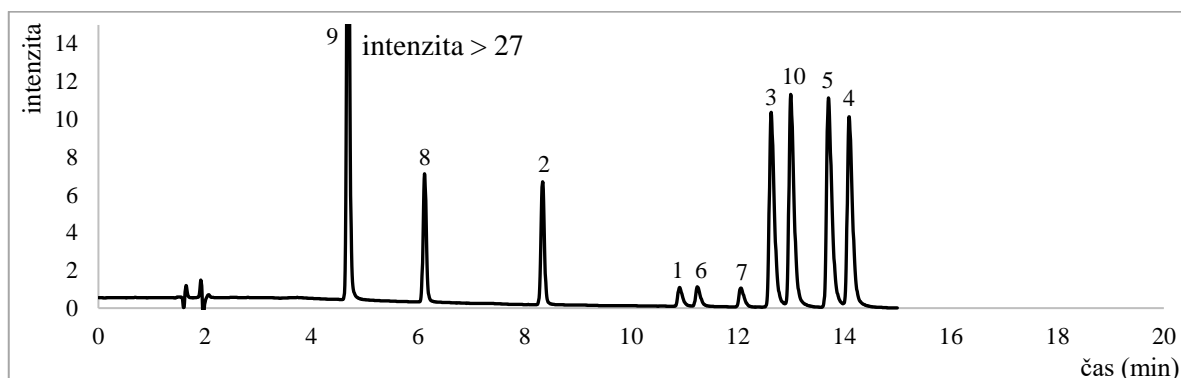
K analýzám byly použity stejné roztoky látek o koncentraci 10 mg/l jako při izokratické eluci. Směsné roztoky látek byly podrobeny různým strmostem gradientu (*Příloha 6*), přičemž strmost gradientu byla postupně snižována, dokud nebylo dosaženo uspokojivého rozlišení všech látek v přijatelné době analýzy. Získané chromatogramy jsou znázorněny na *Obrázcích 32 a 33*.

Obrázek 32: Chromatogram v podmínkách gradientu na koloně Luna Omega Polar C18



Pořadí eluce: teobromin (9), teofylin (8), kofein (2), cinchonin (1), cinchonidin (6), hydrocinchonin (7), chinidin (3), chinin (10), hydrochinidin (5), hydrochinin (4)

Obrázek 33: Chromatogram v podmínkách gradientu na koloně ACE C18-PFP



Pořadí eluce: teobromin (9), teofylin (8), kofein (2), cinchonin (1), cinchonidin (6), hydrocinchonin (7), chinidin (3), chinin (10), hydrochinidin (5), hydrochinin (4)

Pro tyto dvě použité kolony bylo eluční pořadí látek totožné a odpovídalo teoretickým modelům získaných při optimalizaci separace za izokratických podmínek. Lepší separační vlastnosti pro gradientové analýzy měla kolona ACE C18-PFP, protože umožnila separace vybraných alkaloidů v kratším čase a zároveň na ní bylo možné rozdělit všechny látky na základní linii. V porovnání s kolonou Luna Omega Polar C18 byly získány také významně užší píky, z čehož vyplývají i vyšší intenzity jednotlivých píků, především u více zadržovaných látek. Píky silně zadržovaných látek na koloně Luna Omega Polar C18 měly také tendenci výrazněji chvostovat (Obrázek 32). Zlepšení separace na koloně Luna Omega Polar C18 by mohlo být dosaženo snížením strmosti gradientu, což by ale mělo za následek významné prodloužení analýzy a snížení citlivosti detekce.

4 ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše, která se zabývá obecně metodou HPLC, procesem optimalizace této metody a dále se podrobně zabývá alkaloidy a jejich stanovení pomocí metody HPLC. V experimentální části práce byla optimalizována metoda pro analýzu vybraných chinolinových a purinových alkaloidů za izokratických podmínek eluce. Výsledky z izokratické eluce byly dále využity k vytvoření optimální chromatografické metody pro analýzu daných látek v podmínkách gradientové eluce.

První polovina teoretické části je věnována metodě HPLC, kde je podrobně popsána instrumentace kapalinového chromatografu, fázové systémy a značná část se zabývá také procesem optimalizací chromatografických separací, hlavně při izokratické eluci. Druhá polovina teoretické části je pak zaměřena na alkaloidy, z větší části na alkaloidy chinolinové a purinové. Alkaloidy jsou zde popsány v obecné rovině a dále jsou rozděleny do skupin na základě své struktury. Jednotlivé skupiny alkaloidů jsou popsány z hlediska jejich vlastností a využití, včetně nejdůležitějších zástupců. Další část se pak zabývá shrnutím již publikovaných výsledků v oblasti HPLC analýzy chinolinových a purinových alkaloidů.

Cílem této diplomové práce byla optimalizace podmínek chromatografické separace a výběr vhodné kolony pro analýzu vybraných alkaloidů. Ze skupiny purinových konkrétně kofeinu, teobrominu a teofylinu. Z chinolinových to byl cinchonin, cinchonidin, chinin, chinidin, hydrocinchonin, hydrochinin a hydrochinidin.

Chromatografické separace byly provedeny v systému s obrácenými fázemi na pěti různých kolonách v izokratických podmínkách se spektrofotometrickou detekcí. Kolona Luna Omega PS C18 umožňovala rozdělení všech vybraných alkaloidů za poměrně krátkou dobu, ale optimální rozmezí koncentrací ACN bylo příliš úzké, což by mohlo negativně ovlivnit rozlišení jednotlivých dvojic v podmínkách gradientové eluce. Kolona Kinetex Biphenyl se ukázala jako nevhodná již při izokratických separacích, kdy některé z dvojic látek vůbec nebyla schopna rozdělit, a tudíž by postrádalo smysl pro tuto kolonu zkoušet gradientové analýzy. Na koloně Kinetex Polar C18 lze od sebe všechny látky dokonale separovat, ale pouze teoreticky, protože optimální podmínky byly nalezeny při koncentraci nižší než 3 % ACN a při této koncentraci by mohlo dojít ke zhroucení C18 řetězců stacionární fáze této kolony. Navíc kolona Kinetex polar C18 vyžaduje příliš dlouhé doby analýz. Nejlepší výsledky pro izokratické separace poskytly kolony Luna Omega Polar C18

a ACE C18-PFP, na kterých bylo dosaženo rozdělení alkaloidů téměř na základní linii za relativně krátké časy (do 30 minut) v porovnání s kolonami ostatními. Pro kolonu Luna Omega Polar C18 byla po provedení optimalizace zjištěna optimální koncentrace acetonitrilu v mobilní fázi 14,7 % a pro kolonu ACE C18-PFP 14,4 % ACN. Tyto dvě kolony byly dále využity k optimalizaci gradientové eluce, kdy významně lepšího průběhu separace bylo dosaženo na koloně ACE C18-PFP. Z výsledného chromatogramu bylo patrné rozdělení všech látek na základní linii v kratším časovém úseku a také užší píky s vyššími intenzitami.

5 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] CHURÁČEK, Jaroslav. Analytická separace látek: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy chemickotechnologické. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-030-0569-8.
- [2] CHURÁČEK, Jaroslav a P. JANDERA. Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985. Knižnice technických aktualit.
- [3] ČÁSLAVSKÝ, Josef a J. G. K. ŠEVČÍK. Organická analýza. Český Těšín: 2 Theta, 2022. ISBN 978-80-88279-17-4.
- [4] CVAČKA, Josef. Instrumentace pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii. www.cuni.cz, 2010 [cit. 2022-11-05]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc2.pdf>
- [5] NOVÁKOVÁ, Lucie a M. DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Praha: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [6] ŠTULÍK, Karel. Analytické separační metody. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [7] STEINER, Frank; C. PAUL a M. W. DONG. HPLC Autosamplers: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America*. 2019, **37**(8), 514–529.
- [8] ŽUVELA, Petar, M. SKOCZYLAS, J. JAY LIU, T. BĄCZEK, R. KALISZAN, M. W. WONG a B. BUSZEWSKI. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews*. 2019, 119(6), 3674-3729. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00246
- [9] What Is C18? A Guide on the Basics of HPLC Columns. www.develosil.us, 2019 [cit. 2023-02-09]. Dostupné z: <https://develosil.us/what-is-c18-a-guide-on-the-basics-of-hplc-columns/>
- [10] CHURÁČEK, Jaroslav a P. JANDERA. Kapalinová chromatografie: sborník přednášek k semináři. Pardubice: ČVTS – pobočka VŠCHT Pardubice, 1979.

- [11] NOVÁKOVÁ, Lucie a M. DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. Praha: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [12] DEBETS, H. J. G. Optimization Methods For HPLC. *Journal of Liquid Chromatography*. 2006, 8(15), 2725-2780. ISSN 0148-3919. Dostupné z: doi:10.1080/01483918508076603
- [13] DOLAN, John W. Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2002, 965(1-2), 195-205. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)01321-8
- [14] SNYDER, Lloyd R. a J. W. DOLAN. High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model. 1. Wiley, 2007. ISBN 978-0471706465.
- [15] ANISZEWSKI, Tadeusz. Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications. Elsevier Science, 2015. ISBN 978-0-444-59433-4.
- [16] VELÍŠEK, Jan. Chemie potravin 3. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902-3915-3.
- [17] SPILKOVÁ, Jiřina; J. MARTIN a T. SIATKA. Farmakognozie. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
- [18] BROSSI, Arnold. The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology. San Diego, California: Academic Press, 1990. ISBN 0-12-469538-8.
- [19] PREEDY, Victor R. Caffeine: Chemistry, Analysis, Function and Effects: (Food and Nutritional Components in Focus, Volume 2). Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 978-1-84973-367-0.
- [20] IZAWA, Kunisuke; Y. AMINO; M. KOHMURA; Y. UEDA a M. KURODA. 4.16 - Human–Environment Interactions – Taste. *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier, 2010, 631-671. ISBN 9780080453828.
- [21] MUKHERJEE, Pulok K. Chapter 7 - Bioactive Phytocomponents and Their Analysis. *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*. Elsevier, 2019, 237-328. ISBN 9780128133743.
- [22] GUTIÉRREZ-GRIJALVA, Erick Paul; L. X. LÓPEZ-MARTÍNEZ; L. A. CONTRERAS-ANGULO; C. A. ELIZALDE-ROMERO a J. B. HEREDIA. *Plant*

- Alkaloids: Structures and Bioactive Properties. Plant-derived Bioactives. Singapore: Springer Singapore, 2020, 85-117. ISBN 978-981-15-2360-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-15-2361-85
- [23] RAWE, Sarah Louise a C. MCDONNELL. Chapter 3 - The cinchona alkaloids and the aminoquinolines. Antimalarial Agents. Elsevier, 2020, 65-98. ISBN 9780081012109.
- [24] PÉREZ-MARTÍNEZ, I.; S. SAGRADO a M.J. MEDINA-HERNÁNDEZ. A rapid procedure for the determination of caffeine, theophylline and theobromine in urine by micellar liquid chromatography and direct sample injection. *Analytica Chimica Acta*. 1995, 304(2), 195-201. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2670(94)00619-W.
- [25] SCHOLAR, Eric. Quinine. XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier, 2007, 1-6. ISBN 9780080552323.
- [26] Quinine. www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2023 [cit. 2023-03-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Quinine>
- [27] TSAI-TURTON, M. Quinidine. Encyclopedia of Toxicology. Academic Press, 2014, 16-18. ISBN 9780123864550.
- [28] WILSON, Craig M. 296 - Antiparasitic Agents. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fourth Edition). Elsevier, 2012, 1518-1545. ISBN 9781437727029.
- [29] CATALDI, Mauro. Quinidine. XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier, 2010, 1-30. ISBN 9780080552323.
- [30] SENECA. CHAPTER 2 - Alkaloid Chemistry. Alkaloids - Secrets of Life. Elsevier, 2007, 61-139. ISBN 9780444527363.
- [31] ANAND, Nitya a S. SHARMA. Chapter 14 - Natural Products. Pharmacochimistry Library. Elsevier, 1997, 347-383. ISBN 9780444894762.
- [32] JUGÉ, S.; R. MALACEA a A. TESSIER. 3.17 Synthetically Derived Auxiliaries: Phosphorus Derivatives. Comprehensive Chirality. Elsevier, 2012, 528-559. ISBN 9780080951683.

- [33] YANAGISAWA, A. 5.4 Oxidation: α -hydroxylation of Carbonyls. *Comprehensive Chirality*. Elsevier, 2012, 118-136. ISBN 9780080951683.
- [34] MAMEDA, Takuya; M. SHIMOGAKI; Y. OKAMOTO a T. SUGIMURA. Chiral tandem modifiers: highly efficient cinchonidine-derivative modifiers at low concentrations for the enantioselective hydrogenation of (E)-2,3-diphenylpropenoic acid over Pd/C. *Catalysis Science & Technology*. 2022, 12(21), 7065-7081. ISSN 2044-4753. Dostupné z: doi:10.1039/d2cy01695h
- [35] ROBERTS, Ashley. Chapter 30 - Caffeine: An Evaluation of the Safety Database. *Nutraceuticals*. Academic Press, 2016, 417-434. ISBN 9780128021477.
- [36] VARDANYAN, R.S. a V.J. HRUBY. 23 - Drugs for Treating Respiratory System Illnesses. *Synthesis of Essential Drugs*. Elsevier, 2006, 311-321. ISBN 9780444521668.
- [37] BARNES, Peter J. Theophylline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2013, 188(8), 901-906. ISSN 1073-449X. Dostupné z: doi:10.1164/rccm.201302-0388PP
- [38] Theophylline. www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, 2023 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Theophylline>
- [39] BARNES, Peter J. Theophylline. *Asthma and COPD*. Elsevier, 2009, 627-638. ISBN 9780123740014. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374001-4.00050-X
- [40] YOUSAF, Muhammad; A. F. ZAHOOR; S. FAIZ; S. JAVED a M. IRFAN. Recent Synthetic Approaches Towards Biologically Potent Derivatives/Analogues of Theophylline. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 2018, 55(11), 2447-2479. ISSN 0022152X. Dostupné z: doi:10.1002/jhet.3311
- [41] MORAVCOVÁ, Jitka. *Biologicky aktivní přírodní látky*. Praha, 2006. Interní studijní pomůcka. VŠCHT Praha.
- [42] ZHAO, Da-Ke; Y. ZHAO; S.-Y. CHEN a E. J. KENNELLY. Solanum steroidal glycoalkaloids: structural diversity, biological activities, and biosynthesis. *Natural Product Reports*. 2021, 38(8), 1423-1444. ISSN 0265-0568. Dostupné z: doi:10.1039/D1NP00001B

- [43] PATEL, Preeti; A. PRASAD; K. SRIVASTAVA; S. S. SINGH; D. CHAKRABARTY a P. MISRA. Updates on steroidal alkaloids and glycoalkaloids in *Solanum* spp: Biosynthesis, in vitro production and pharmacological values. *Bioactive Natural Products*. Elsevier, 2021, 99-127. *Studies in Natural Products Chemistry*. ISBN 9780128194874. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819487-4.00012-4
- [44] SIROTKIN, Alexander V. a A. KOLESAROVA. Plant molecules and their influence on health and female reproduction. *Environmental Contaminants and Medicinal Plants Action on Female Reproduction*. Elsevier, 2022, 245-399. ISBN 9780128242926. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-824292-6.00004-0
- [45] GULDIKEN, Burcu; G. CATALKAYA; G. OZKAN; F. D. CEYLAN a E. CAPANOGLU. Toxicological effects of commonly used herbs and spices. *Toxicology*. Elsevier, 2021, 201-213. ISBN 9780128190920. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-819092-0.00021-2
- [46] GROSSO, Laura M. a M. B. BRACKEN. Caffeine Metabolism, Genetics, and Perinatal Outcomes: A Review of Exposure Assessment Considerations during Pregnancy. *Annals of Epidemiology*. 2005, 15(6), 460-466. ISSN 10472797. Dostupné z: doi:10.1016/j.annepidem.2004.12.011
- [47] BARCELOS, Rômulo P.; F. D. LIMA; N. R. CARVALHO; G. BRESCIANI a L. F. F. ROYES. Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. *Nutrition Research*. 2020, 80, 1-17. ISSN 02715317. Dostupné z: doi:10.1016/j.nutres.2020.05.005
- [48] MCCALLEY, David V. Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *Journal of Chromatography A*. 2002, 967(1), 1-19. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)01557-6
- [49] CHEN, Qing-chuan; S. MOU; X. HOU a Z. NI. Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline in foods and pharmaceutical preparations by using ion chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 1998, 371(2-3), 287-296. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2670(98)00301-8

- [50] GATTI, R.; M.G. GIOIA a V. CAVRINI. Determination of Cinchona alkaloids and Vitamin B6 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 2004, 512(1), 85-91. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2004.02.018
- [51] BAJTAI, Attila; I. ILISZ; R. BERKECZ; F. FÜLÖP; W. LINDNER a A. PÉTER. Polysaccharide-based chiral stationary phases as efficient tools for diastereo- and enantioseparation of natural and synthetic Cinchona alkaloid analogs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021, 193. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2020.113724
- [52] BEKOE, Samuel Oppong; E. ORMAN; S. A. ADJABUI; et al. Development and Validation of an Ion-Pair HPLC-UV Method for the Quantitation of Quinoline and Indoloquinoline Alkaloids in Herbal and Pharmaceutical Antimalarial Formulations. *Journal of Chemistry*. 2022, 2022, 1-11. ISSN 2090-9071. Dostupné z: doi:10.1155/2022/4625954
- [53] HOLMFRED, Else; C. CORNETT; C. MALDONADO; N. RØNSTED a S. H. HANSEN. An Optimised Method for Routine Separation and Quantification of Major Alkaloids in Cortex Cinchona by HPLC Coupled with UV and Fluorescence Detection. *Phytochemical Analysis*. 2017, 28(5), 374-380. ISSN 09580344. Dostupné z: doi:10.1002/pca.2684
- [54] BISPO, M. S.; M. C. C. VELOSO; H. L. C. PINHEIRO; R. F. S. DE OLIVEIRA; J. O. N. REIS a J. B. DE ANDRADE. Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 2002, 40(1), 45-48. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/40.1.45
- [55] SRDJENOVIC, B.; V. DJORDJEVIC-MILIC; N. GRUJIC; R. INJAC a Z. LEPOJEVIC. Simultaneous HPLC Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Food, Drinks, and Herbal Products. *Journal of Chromatographic Science*. 2008, 46(2), 144-149. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/46.2.144
- [56] HUCK, C.W.; W. GUGGENBICHLER a G.K. BONN. Analysis of caffeine, theobromine and theophylline in coffee by near infrared spectroscopy (NIRS)

- compared to high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2005, 538(1-2), 195-203. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2005.01.064
- [57] GOLANKIEWICZ, Bożenna a J. BORYSKI. Thin-layer and short-column chromatography of partially reduced Cinchona alkaloids. *Journal of Chromatography A*. 1982, 234(2), 521-527. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)81901-9
- [58] SUSZKO-PURZYCKA, A. a W. TRZEBNY. Thin-layer chromatography of cinchona alkaloids. *Journal of Chromatography A*. 1965, 17, 114-119. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)99840-6
- [59] BROCHMANN-HANSEN, E. a C.R. FONTAN. Gas chromatography of alkaloids with polar stationary liquids. *Journal of Chromatography A*. 1965, 19, 296-299. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)99462-2
- [60] SCHIFF, Paul L. Chromatography of Alkaloids, Part B: Gas-Liquid Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences: Part B: Gas-Liquid Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 1985, 74(10), 1139-1140. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.2600741038
- [61] ZHANG, Yu; H. YU; Y. WU; W. ZHAO; M. YANG; H. JING a A. CHEN. Combined use of [TBA][L-ASP] and hydroxypropyl- β -cyclodextrin as selectors for separation of Cinchona alkaloids by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 2014, 462, 13-18. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2014.06.008
- [62] ZHAO, Wenyan; Y. LI; Y. ZHANG; H. ZHANG; H. YU a A. CHEN. Determination of Cinchona Alkaloids by Capillary Electrophoresis with Novel Complex Formation. *Analytical Letters*. 2015, 49(8), 1176-1183. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032719.2015.1089258
- [63] TSIMACHIDIS, Dimitrios; P. ČESLA; T. HÁJEK; G. THEODORIDIS a P. JANDERA. Capillary electrophoretic chiral separation of Cinchona alkaloids using a cyclodextrin selector. *Journal of Separation Science*. 2008, 31(6-7), 1130-1136. ISSN 16159306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200700494

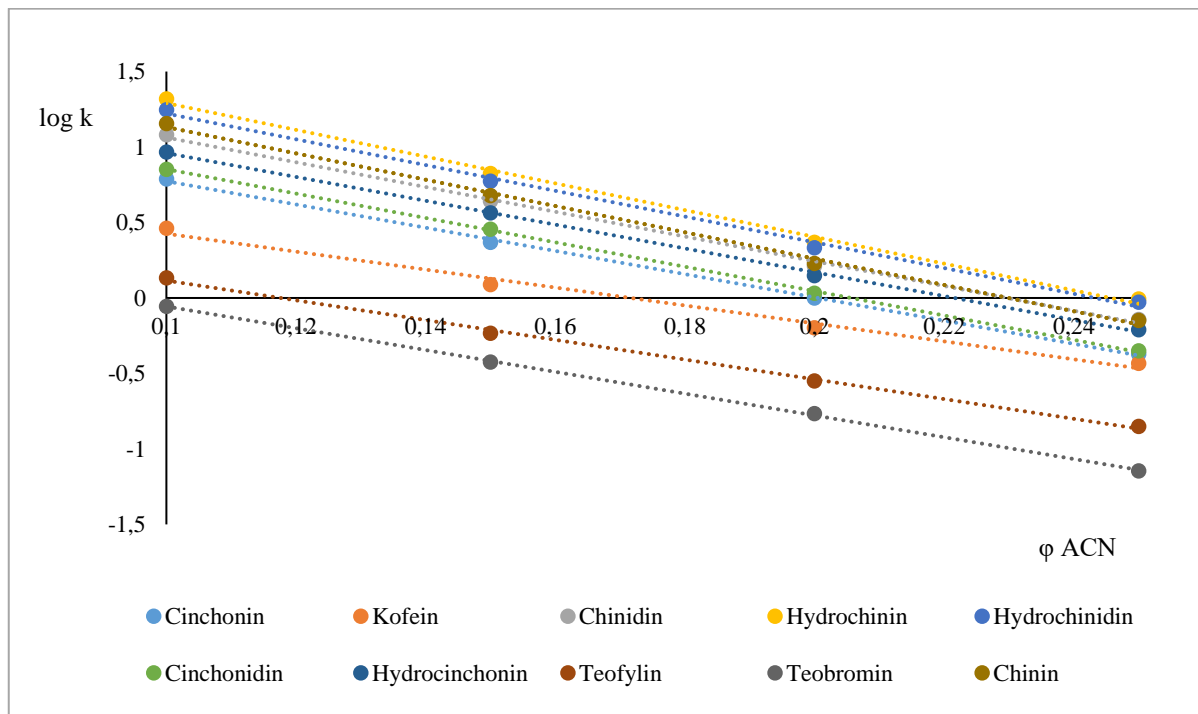
- [64] SUN, Peng; G. J. MARIANO; G. BARKER a R. A. HARTWICK. Comparison of Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography on the Separation and Determination of Caffeine and Its Analogues in Pharmaceutical Tablets. *Analytical Letters*. 1994, 27(5), 927-937. ISSN 0003-2719. Dostupné z: doi:10.1080/00032719408007362
- [65] CAMPIGLIA, A.D.; J.J. LASERNA; A. BERTHOD a J.D. WINEFORDNER. Solid-surface room-temperature phosphorimetric detection of caffeine, theophylline and theobromine in liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*. 1991, 244, 215-222. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2670(00)82501-5
- [66] HIEDA, Yoko; S. KASHIMURA; K. HARA a M. KAGEURA. Highly sensitive and rapid determination of theophylline, theobromine and caffeine in human plasma and urine by gradient capillary high-performance liquid chromatography-frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1995, 667(2), 241-246. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/0378-4347(95)00028-H
- [67] ORTEGA, Nàdia; M.-P. ROMERO; A. MACIÀ; J. REGUANT; N. ANGLÈS; J.-R. MORELLÓ a M.-J. MOTILVA. Comparative study of UPLC–MS/MS and HPLC–MS/MS to determine procyanidins and alkaloids in cocoa samples. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2010, 23(3), 298-305. ISSN 08891575. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2009.10.005
- [68] TANAKA, Tomoya; K. KIMURA; K. KAN; T. SHINDO a T. SASAMOTO. Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Chocolate Using LC-MS. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*. 2021, 62(4), 119-124. ISSN 0015-6426. Dostupné z: doi:10.3358/shokueishi.62.119
- [69] MEYER, A.; T. NGIRUWONSANGA a G. HENZE. Determination of adenine, caffeine, theophylline and theobromine by HPLC with amperometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 1996, 356(3-4), 284-287. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s0021663560284
- [70] JÚNIOR, Paulo Cardoso Gomes; V. B. DOS SANTOS; A. S. LOPES; J. P. I. DE SOUZA; J. R. S. PINA; G. C. A. CHAGAS JÚNIOR a P. S. B. MARINHO. Determination of theobromine and caffeine in fermented and unfermented

Amazonian cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans using square wave voltammetry after chromatographic separation. *Food Control*. 2020, 108. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2019.106887

- [71] GREENBERG, Mark S. a W. J. MAYER. High-performance liquid chromatographic determination of theophylline and its derivatives with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*. 1979, 169, 321-327. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9673(75)85056-4
- [72] CHEN, Qing-Chuan a J. WANG. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001, 937(1-2), 57-64. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(01)01306-1
- [73] BLAŽÍČKOVÁ, Barbora. Dvourozměrná kapalinová chromatografie oxyethylenovaných acylglycerolů s využitím fokusační modulace. Pardubice, 2022. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- [74] VANOVA, Jana, D. MALINAK, R. ANDRYS, et al. Optimization of gradient reversed phase high performance liquid chromatography analysis of acetaminophen oxidation metabolites using linear and non-linear retention model. *Journal of Chromatography A*. 2022, 1669. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2022.462956

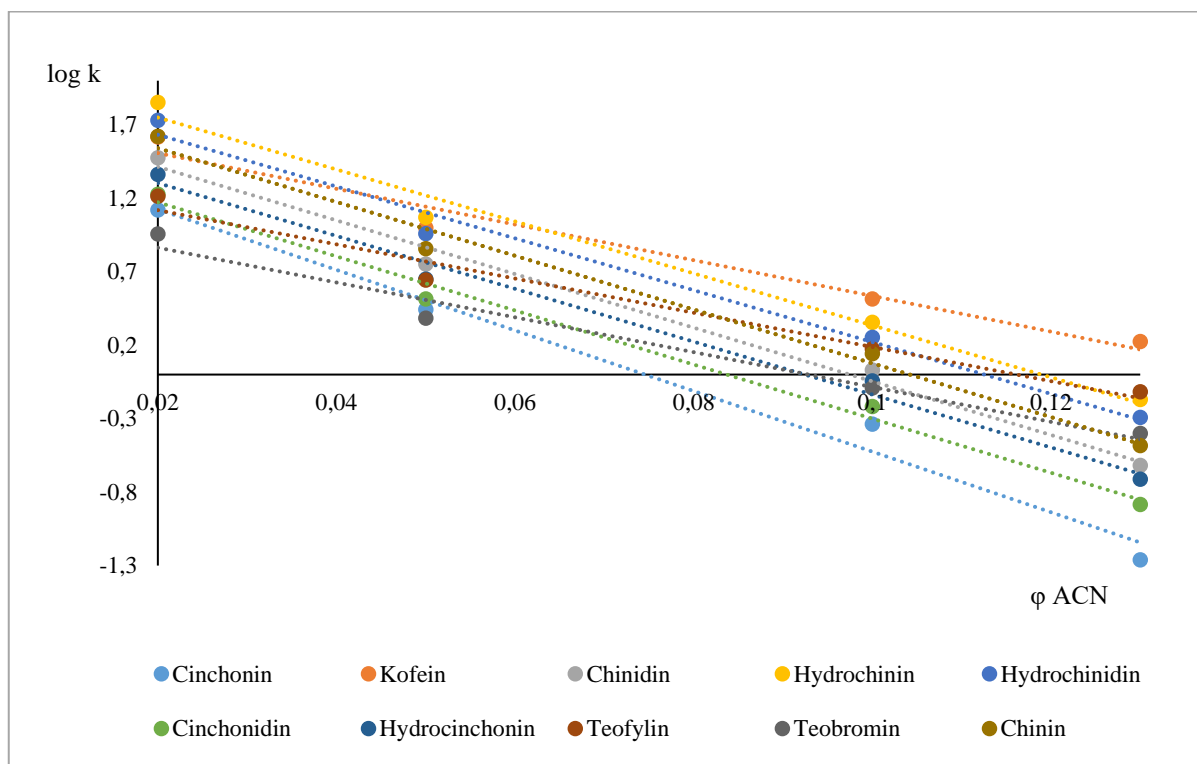
6 PŘÍLOHY

Příloha 1: Retenční modely látek pro kolonu Luna Omega Polar C18



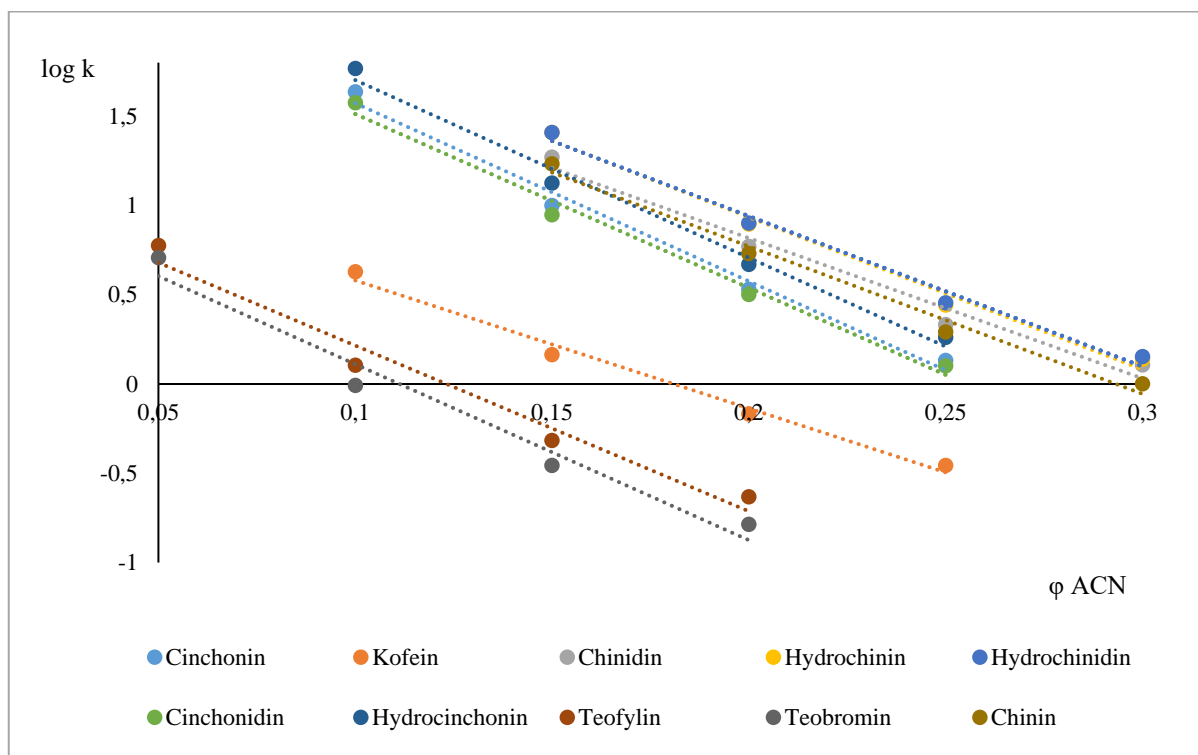
	Látka	a	m	R ²
1	Cinchonin	1,543	7,694	0,999
2	Kofein	1,020	5,943	0,990
3	Chinidin	1,883	8,197	0,998
4	Hydrochinin	2,177	8,860	0,996
5	Hydrochinidin	2,075	8,530	0,996
6	Cinchonidin	1,661	8,076	1,000
7	Hydrocinchonin	1,749	7,894	0,999
8	Teofylin	0,769	6,541	0,998
9	Teobromin	0,666	7,220	1,000
10	Chinin	2,003	8,714	0,997

Příloha 2: Retenční modely látek pro kolonu Luna Omega PS C18



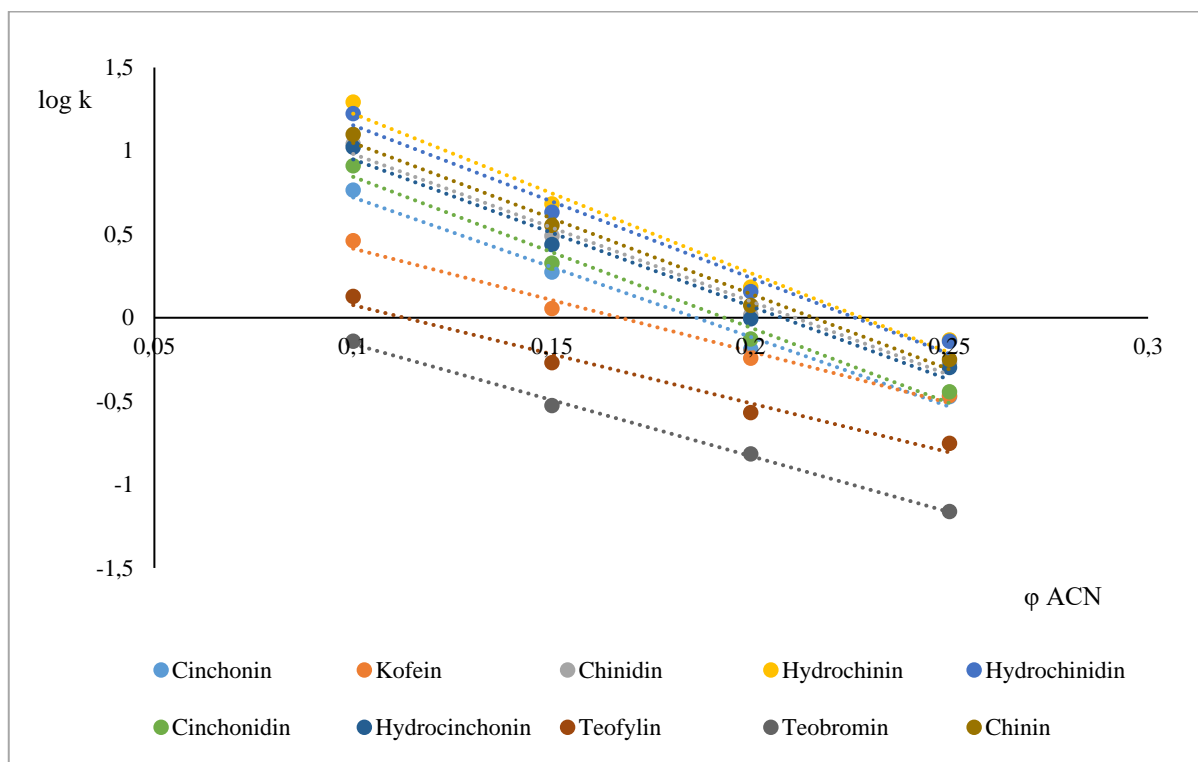
	Látka	a	m	R ²
1	Cinchonin	1,537	20,617	0,983
2	Kofein	1,750	12,151	0,968
3	Chinidin	1,780	18,253	0,990
4	Hydrochinin	2,103	17,680	0,986
5	Hydrochinidin	1,985	17,637	0,986
6	Cinchonidin	1,540	18,405	0,991
7	Hydrocinchonin	1,663	17,994	0,989
8	Teofylin	1,351	11,638	0,973
9	Teobromin	1,101	11,854	0,976
10	Chinin	1,907	18,300	0,988

Příloha 3: Retenční modely látek pro kolonu Kinetex Biphenyl



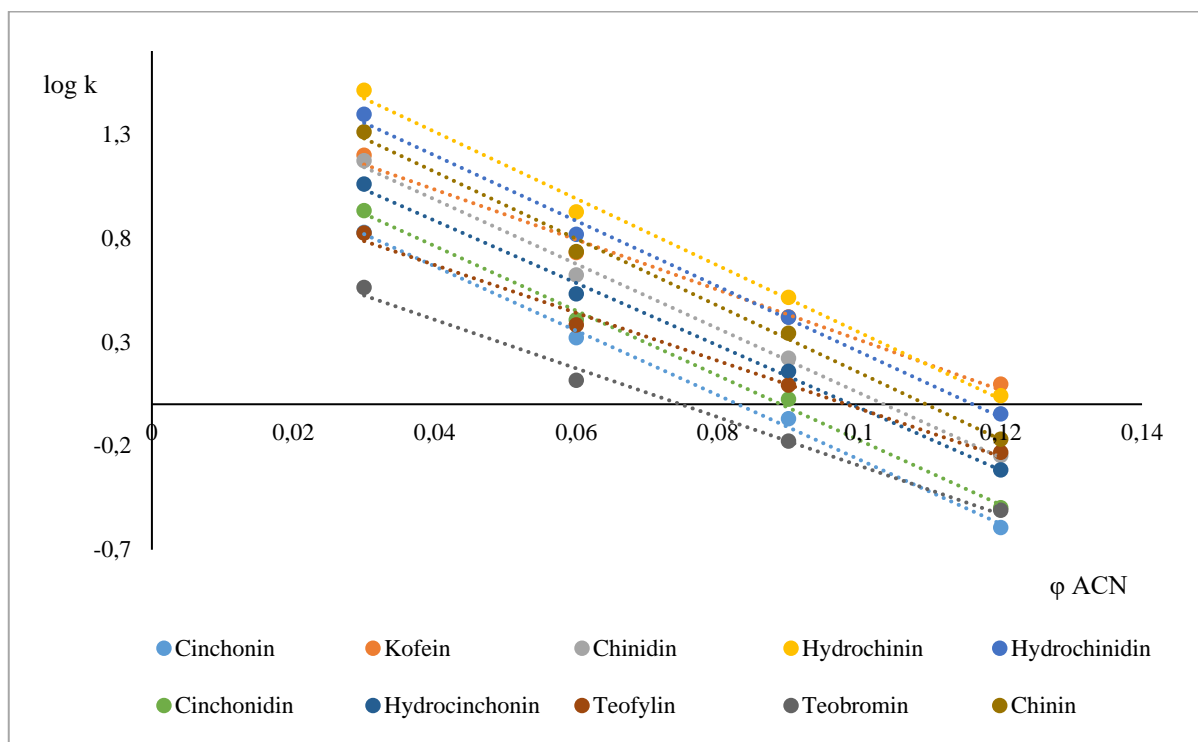
	Látka	a	m	R ²
1	Cinchonin	2,570	9,974	0,988
2	Kofein	1,297	7,169	0,988
3	Chinidin	2,389	7,860	0,975
4	Hydrochinin	2,640	8,529	0,988
5	Hydrochinidin	2,625	8,424	0,988
6	Cinchonidin	2,486	9,738	0,998
7	Hydrocinchonin	2,698	9,951	0,998
8	Teofylin	1,144	9,284	0,971
9	Teobromin	1,097	9,860	0,969
10	Chinin	2,425	8,268	0,987

Příloha 4: Retenční modely látek pro kolonu ACE C18-PFP



	Látka	a	m	R ²
1	Cinchonin	1,557	8,360	0,986
2	Kofein	1,031	6,168	0,983
3	Chinidin	1,865	8,833	0,982
4	Hydrochinin	2,179	9,555	0,982
5	Hydrochinidin	2,067	9,138	0,981
6	Cinchonidin	1,749	9,041	0,979
7	Hydrocinchonin	1,830	8,808	0,983
8	Teofylin	0,664	5,885	0,974
9	Teobromin	0,513	6,712	0,997
10	Chinin	1,953	9,049	0,988

Příloha 5: Retenční modely látek pro kolonu Kinetex Polar C18

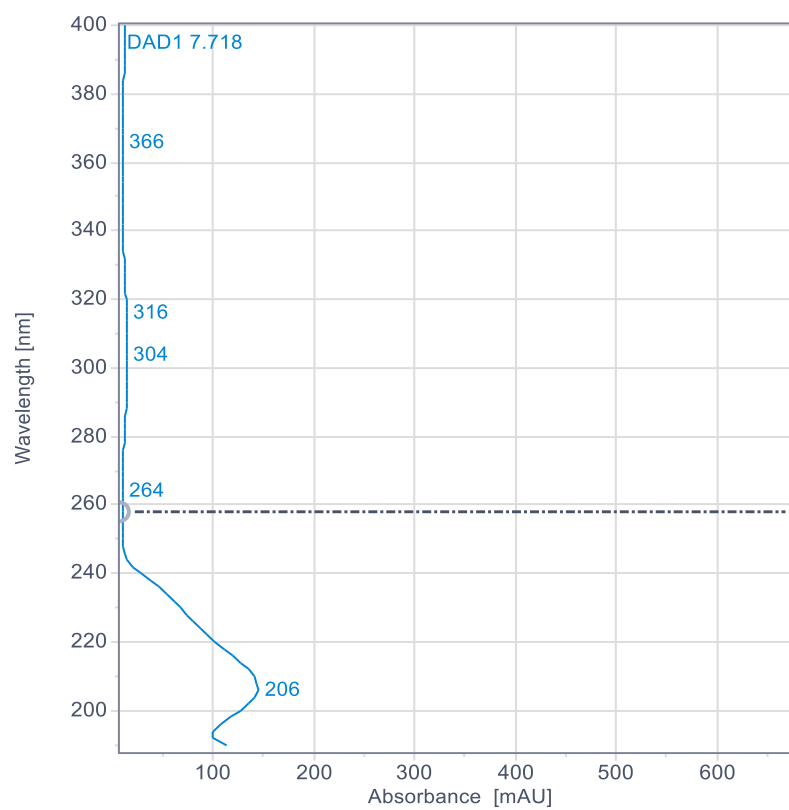


	Látka	a	m	R ²
1	Cinchonin	1,284	15,496	0,997
2	Kofein	1,515	12,056	0,990
3	Chinidin	1,606	15,517	0,996
4	Hydrochinin	1,954	16,076	0,995
5	Hydrochinidin	1,827	15,739	0,995
6	Cinchonidin	1,384	15,563	0,996
7	Hydrocinchonin	1,484	15,005	0,996
8	Teofylin	1,131	11,519	0,991
9	Teobromin	0,875	11,699	0,992
10	Chinin	1,763	16,103	0,995

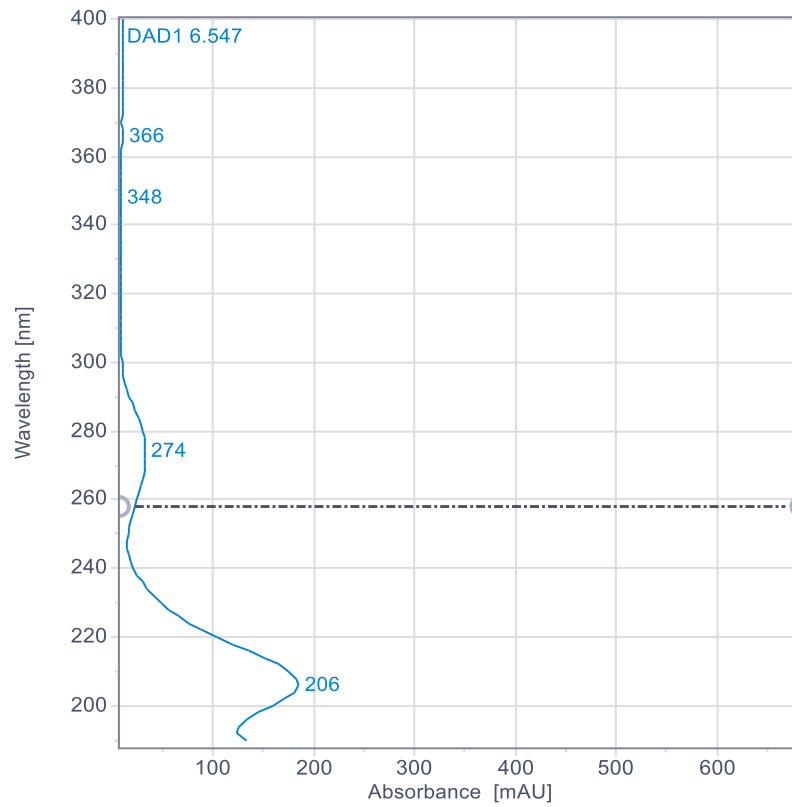
Příloha 6: Zkoušené strmosti gradientů na vybraných kolonách

Kolona	Gradient 1		Gradient 2		Gradient 3	
	Koncentrace acetonitrilu	Doba analýzy	Koncentrace acetonitrilu	Doba analýzy	Koncentrace acetonitrilu	Doba analýzy
Luna Omega Polar C18	5-10 %	30 min	5-15 %	30 min	5-20 %	30 min
ACE C18-PFP	5-10 %	30 min	5-15 %	15 min	5-25 %	15 min

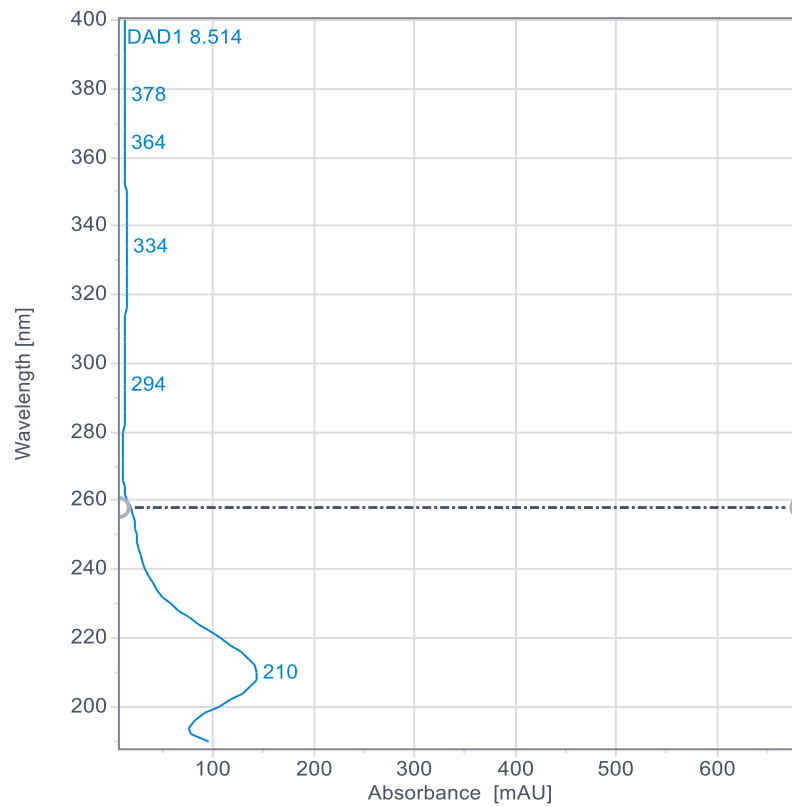
Příloha 7: UV spektrum cinchoninu



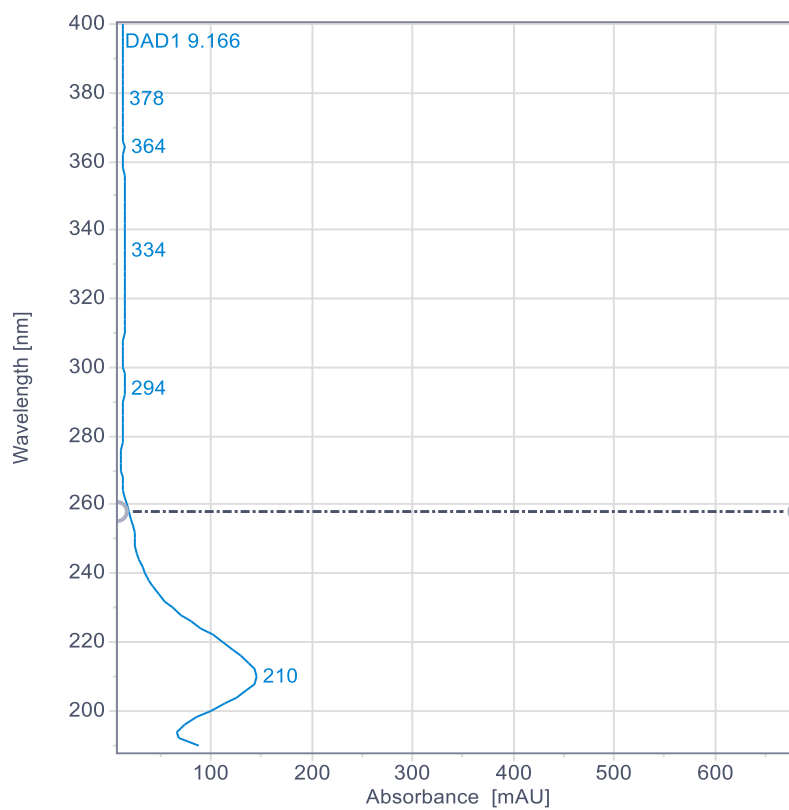
Příloha 8: UV spektrum kofeinu



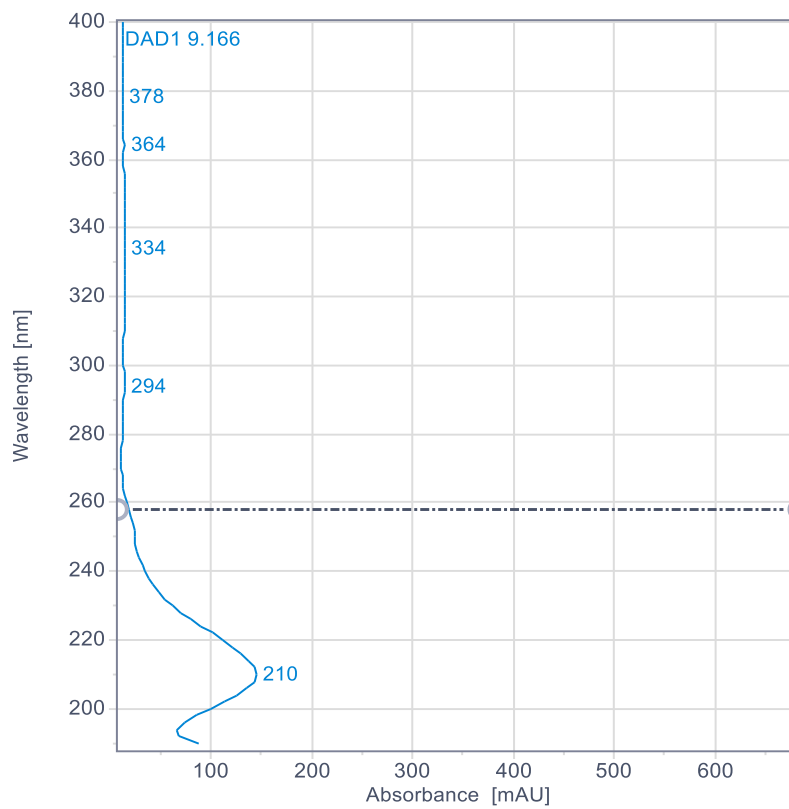
Příloha 9: UV spektrum chinidinu



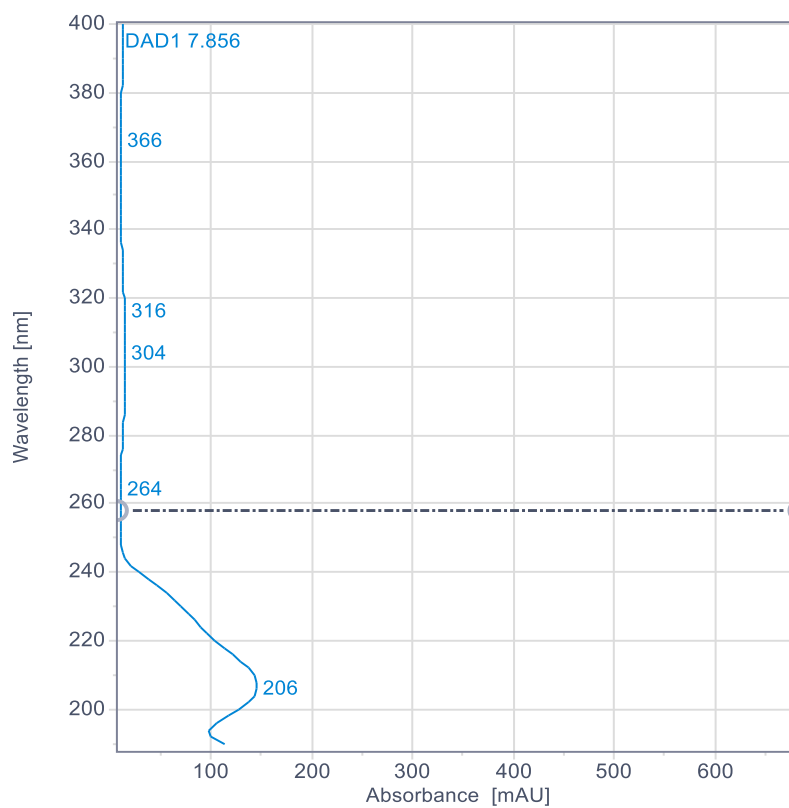
Příloha 10: UV spektrum hydrochininu



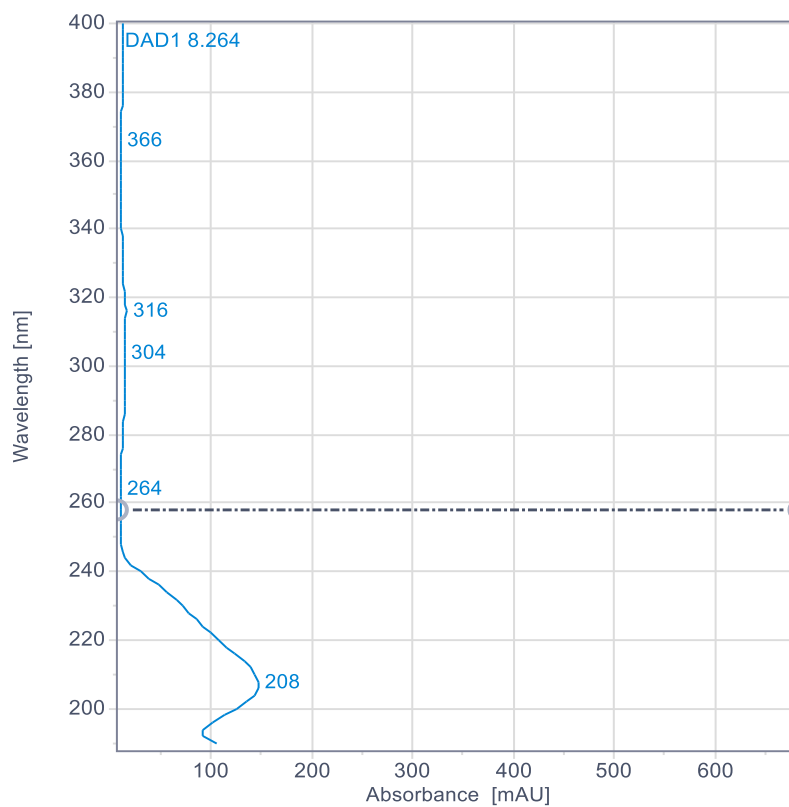
Příloha 11: UV spektrum hydrochinidinu



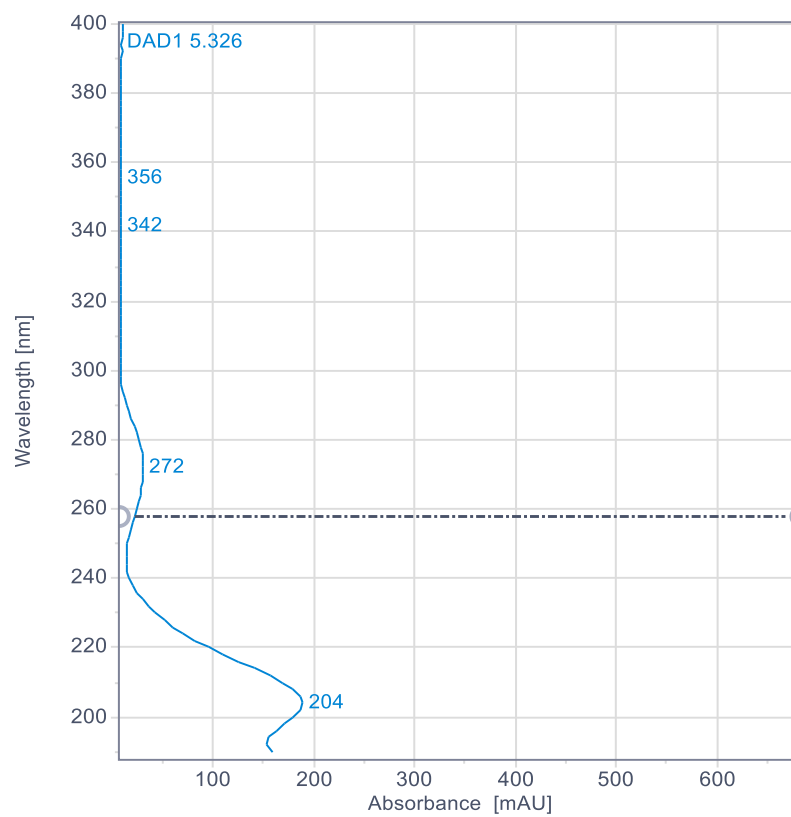
Příloha 12: UV spektrum cinchonidinu



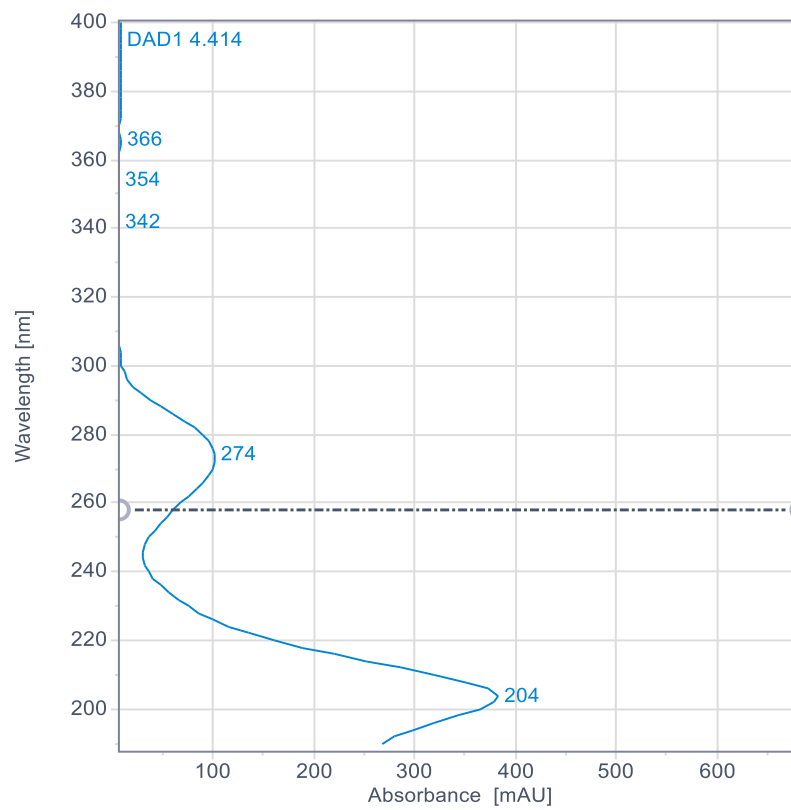
Příloha 13: UV spektrum hydrocinchoninu



Příloha 14: UV spektrum teofylinu



Příloha 15: UV spektrum teobrominu



Příloha 16: UV spektrum chininu

