

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza alkaloidů chinovníku kapalinovou chromatografií s gradientovou elucí

Anna Brzáková

Diplomová práce

2021

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Analysis of cinchona alkaloids using liquid chromatography with gradient
elution

Anna BrzÁková

Diploma thesis

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Anna Brzáková**
Osobní číslo: **C19473**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Téma práce: **Analýza alkaloidů chinovníku kapalinovou chromatografií s gradientovou elucí**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V dostupné vědecké literatuře vyhledejte a rešeršně zpracujte práce týkající se analýzy alkaloidů chinovníku pomocí kapalinové chromatografie. Popište principy kapalinové chromatografie včetně nejběžnějších fázových systémů používaných pro analýzy polárních látek (systém s obrácenými fázemi chromatografie hydrofilních interakcí).
2. Proměřte retenční charakteristiky alkaloidů chinovníku na vybraných kolonách v systému s obrácenými fázemi a HILIC. Optimalizujte podmínky analýzy s gradientovou elucí s cílem dosáhnout co nejlepší separace.
3. Získaná experimentální 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

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza alkaloidů chinovníku kapalinovou chromatografií s gradientovou elucí 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

Anna Brzáková

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu panu Doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D za odborné vedení mé práce, cenné rady, věcné připomínky a ochotu, které mi pomohly při zpracování diplomové práce.

ANOTACE

Diplomová práce je věnována analýze alkaloidů chinovníku. Analýza probíhala za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickým detektorem. Analýza byla prováděna v systému s gradientovou elucí. Cílem práce bylo najít vhodnou kolonu pro separaci alkaloidů chinovníku a optimalizovat podmínky chromatografické separace.

KLÍČOVÁ SLOVA

Alkaloidy, alkaloidy chinovníku, chinin, chinidin, cinchonin, cinchonidin, kapalinová chromatografie, spektrofotometrická detekce

ANOTATION

The diploma thesis is devoted to the analysis of the cinchona alkaloids. Analysis was performed using high performance liquid chromatography with spectrophotometric detector. Analysis was performed by a gradient elution. The aim of the diploma thesis was to find a suitable column for the separation of cinchona alkaloids and to optimize the conditions of chromatographic separation.

KEYWORDS

Alkaloids, cinchona alkaloids, quinine, quinidine, cinchonine, cinchonidine liquid chromatography, spectrophotometric detection

OBSAH

ÚVOD.....	12
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	13
1.1 Alkaloidy chinovníku.....	13
1.1.1 Historie.....	13
1.1.2 Chinovník.....	13
1.1.3 Chemické složení alkaloidů chinovníku.....	14
1.1.4 Syntéza chininu.....	16
1.1.5 Využití.....	16
1.1.6 Využití v potravinářství.....	17
1.1.7 Toxicita.....	17
1.2 Kapalinová chromatografie.....	18
1.2.1 Chromatografické systémy s normálními fázemi (NP-HPLC).....	19
1.2.2 Chromatografické systémy s obrácenými fázemi (RP-HPLC).....	19
1.3.3 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC).....	20
1.3.4 Instrumentace v kapalinové chromatografii.....	21
1.4 Aplikace HPLC v analýze.....	25
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
2.1 Použité přístroje a zařízení.....	29
2.2 Použité chemikálie.....	29
2.3 Použité standardy.....	30
2.4 Použité vzorky.....	30
2.5 Příprava roztoků standardů.....	31
2.6 Příprava roztoků vzorků.....	32
2.7 Podmínky analýzy pomocí HPLC.....	32
3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	33

3.1	Určení vlnové délky pomocí UV/VIS spektrometru.....	33
3.2	Analýza pomocí HPLC	33
3.2.1	Profil gradientů	34
3.2.2	Zpoždění gradientu	35
3.2.3	Separace alkaloidů chinovníku s gradientovou elucí.....	36
3.2.4	Kvalitativní stanovení chininu v reálných vzorcích	39
3.2.5	Kvantitativní stanovení chininu v reálných vzorcích	43
4	ZÁVĚR.....	45
	Bibliografie	46
	Přílohy.....	51

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN – acetonitril

ADI – přípustný denní příjem

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

APPI – fotoionizace za atmosférického tlaku

C18 – oktadecylsilyl

ESI – ionizace elektrosprejem

HILIC – hydrofilní interakční chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

NP-HPLC – chromatografie s normálními fázemi

ODS – oktadecylsilyl

RP-HPLC – chromatografie s obrácenými fázemi

SPE – extrakce tuhou fází

TSP – termosprejová hmotnostní spektrometrie

SEZNAM GRAFŮ, OBRÁZKŮ A TABULEK

Graf 1: Určení času zpoždění gradientu pomocí dvousložkové mobilní fáze voda/voda + 0,1 % (v/v) aceton	36
Graf 2: Chromatogram vzorku č. 1	40
Graf 3: Chromatogram vzorku č. 2	41
Graf 4: Chromatogram vzorku č. 3	41
Graf 5: Chromatogram vzorku č. 4	42
Graf 6: Chromatogram vzorku č. 5	42
Graf 7: Chromatogram vzorku č. 6	43
Graf 8: kalibrační závislost chininu	44
Obrázek 1: Alkaloidy chinovníku vyskytující se v čeledi Rubiaceae	15
Obrázek 2: Schéma instrumentace HPLC	22
Obrázek 3: Schéma funkce šesticestného dávkovacího ventilu.....	23
Tabulka 1: Profil a strmost jednotlivých gradientů pro kolony použité v systému s reverzními fázemi.....	34
Tabulka 2: Profil a strmost jednotlivých gradientů pro kolonu použitou v systému HILIC	35
Tabulka 3: Porovnání změny elučního pořadí v systému s reverzními fázemi a v HILIC chromatografii.....	39
Tabulka 4: Kalibrační parametry	43
Tabulka 5: Koncentrace chininu ve vzorcích toniků	44

ÚVOD

Tématem práce jsou alkaloidy chinovníku a metoda jejich stanovení kapalinovou chromatografií s gradientovou elucí. Alkaloidy jsou organické dusíkaté látky se složitou strukturou. Jedná se o přírodní sloučeniny, které mohou mít jak pozitivní, tak negativní účinek na zdraví lidského organismu. Alkaloidy chinovníku se řadí k heterocyklickým pravým alkaloidům, které se získávají ze stromů rodu *Cinchona* a *Remijia*. Nejznámější alkaloidem chinovníku je chinin, který se díky své hořké chuti využívá v potravinářském průmyslu jako prostředek k hořčení tonizujících nealkoholických i alkoholických nápojů. Další významnou oblastí, ve které se chinin využívá, je medicína, kde našel uplatnění jako lék na malárii. V lékařství se se využívají i další alkaloidy chinovníku, chinidin a cinchonidin.

Tato diplomová práce se zabývá analýzou alkaloidů chinovníku. K analýze byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Nejprve byla hledána vhodná kolona pro separaci, a následně probíhala optimalizace podmínek separace za využití standardů alkaloidů chinovníku. Pro separace byla využita gradientová eluce a jako mobilní fáze byly využity voda a acetonitril.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Alkaloidy chinovníku

Alkaloidy jsou organické alkalické dusíkaté látky, které mají složitou a vysoce různorodou strukturu. Jsou klasifikovány na základě jejich chemické struktury a taxonomie druhů, ze kterých byly izolovány [1; 2]. Alkaloidy mohou být rostlinné, živočišné, mořské nebo se mohou vyskytovat v houbách. Jejich účinek může mít jak pozitivní, tak i negativní dopad na zdraví lidského organismu [3; 4]. Alkaloidy jsou tedy přírodní sloučeniny, které se dělí na dvě hlavní skupiny, heterocyklické a neheterocyklické [1]. Heterocyklické alkaloidy jsou rozsáhlejší skupinou alkaloidů a dále se dělí podle obsažených heterocyklických sloučenin. Dalším běžným dělením, které se používá, je dělení na alkaloidy pravé, protoalkaloidy a pseudoalkaloidy. Alkaloidy chinovníku řadíme mezi heterocyklické pravé alkaloidy, které obsahují chinolinové jádro [5].

1.1.1 Historie

První zmínka o alkaloidech chinovníku pochází od augustiniánského mnicha Antonia de la Calanchy, který v Limě v Peru (v té době španělské kolonii) napsal: „V zemi Loja je strom „horeček“, s kůrou skořicové barvy, ze kterého Lojané odlévají prášky, které se pijí ve váze dvou malých mincí, a tím léčí horečky.“ Ze zmínky není jasné, zda měl Antonia de la Calancha na mysli použití kůry domorodci nebo napadajícími Španěly [6]. V polovině 17. století se v Evropě začal strom označovat jako „quina-quina“. Tento název byl založen na označení „quina-quina“, což byl údajně název stromu a kůry v rodném peruánském jazyce. Následně se ukázalo, že název „quina-quina“ domorodí obyvatelé Peru původně používali pro jiný strom. Evropané tento název zaměnili a začali ho používat pro strom, který léčil malárii [6]. V roce 1742 švédský botanik Carl Linné pojmenoval rod stromu *Cinchona*. Tento název byl odvozen od jména hraběnky z Chinchónu, manželky španělského místokrále v Peru v 30. letech 16. století. Podle legendy byla hraběnka v Peru infikována malárií a byla vyléčena kůrou stromu. Poté ji údajně uvedla do Evropy, čímž zahájila její používání. Příběh legendy však není podložen fakty [6]. V roce 1820 dva francouzští vědci, Joseph Bienaimé Caventou a Pierre Joseph Pelletier, izolovali z kůry chinovníku antimalarickou látku, kterou pojmenovali chinin [6].

1.1.2 Chinovník

Rod *Cinchona* (česky chinovník) je strom původem z Jižní Ameriky, který se řadí do čeledi *Rubiaceae*. Jedná se o stálezelené keře a stromy, které mohou růst až do výšky 20 m.

Taxonomové zařadili do rodu *Cinchona* různé počty druhů (30, 40 až 65), pravděpodobně kvůli existenci mezidruhových forem v přirozené populaci. Po důkladné studii čeledi *Rubiaceae* bylo rozpoznáno pouze 23 planých druhů [7].

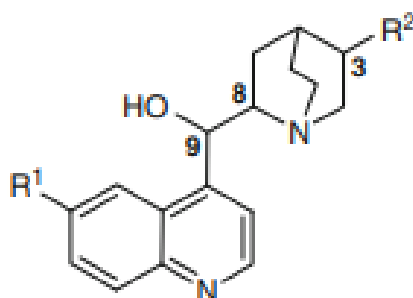
Tyto stromy nesou protilehlé eliptické až vejčité kopinaté listy s celým okrajem. Květy jsou malé s laločnatým kalichem spojeným na základně a mají růžovou, krémovou až hnědou barvu. Květy vydávají nádhernou vůni. Plodem chinovníku je podlouhlá tobolka, která obsahuje 40 až 50 okřídlených semen [7]. Kůra různých druhů chinovníku obsahuje čtyři hlavní alkaloidy, kterými jsou chinin, chinidin, cinchonin a cinchonidin [2]. Chinovník pochází z východních svahů oblasti And, kde roste od Kolumbie až po Bolívii (Peru, Ekvádor, Venezuela). Nejdůležitějšími producenty stromů rodu *Cinchona* jsou Indonésie společně s Afrikou. Jihoamerické země, odkud stromy pocházejí, se staly méně důležitými producenty [8].

Pro komerční účely se pěstují tři hlavní druhy chinovníků, konkrétně jde o *Cinchona succirubra*, *Cinchona officinalis* „*ledgeriana*“ a *Cinchona calisaya*. Společně s těmito odrůdami se pěstují i hybridy pro zajištění nejvyššího obsahu alkaloidů v kůře. Například kůra *Cinchona succirubra* obsahuje 5 – 7 % alkaloidů, *Cinchona calisaya* dává kůru s obsahem 4 – 7 % alkaloidů, zatímco kůra *C. officinalis* „*ledgeriana*“ může obsahovat 5 – 14 % alkaloidů. Vybrané hybridy chinovníku mohou za příznivých podmínek kultivace přinést až 17 % alkaloidů v kůře. Analýza různých typů kůry chinovníku ukazuje, že nejhojnějším alkaloidem je chinin, který obvykle zahrnuje 50 – 90 % součtu všech obsažených alkaloidů. Komerčním produktem je kůra z kmene a kořenů chinovníku. Sklizení kůry se obvykle provádí po 6 – 10 letech. Kůra na stromech částečně regeneruje, proto lze kůru z jednoho stromu sklízet i vícekrát. Záleží na druhu a kultivační technice [8]. Alkaloidy chinovníku se dají získat i ze stromů rodu *Remijia*, který patří stejně jako rod *Cinchona* do čeledi *Rubiaceae*. Tyto stromy a keře jsou rozšířeny v Jižní Americe od Kolumbie až po Bolívii. Kůra stromů *Remijia* obsahuje menší množství alkaloidů chinovníku, proto se využívá méně [8; 9].

1.1.3 Chemické složení alkaloidů chinovníku

Alkaloidy chinovníku obsahují asi třicet různých, v některých případech stereoizomerních, rostlinných bází, které byly z větší části izolovány z kůry subtropických stromů druhu *Cinchona* a *Remijia*. Na rozdíl od mnoha jiných přírodních produktů jsou tyto alkaloidy k dispozici v několika diastereomerních formách, které jsou separovány v průmyslovém měřítku. Nejdůležitější z této skupiny alkaloidů je chinin [10; 11]. Strukturu chininu a dalších

významných alkaloidů chinovníku, které lze izolovat z kůry chinovníku, je znázorněna na obrázku 1.



Číslo	Název	R ¹	R ²	Absolutní konfigurace v		
				C-8	C-9	C-3
1	Chinin	OMe	Vinyl	S	R	R
a	Dihydrochinin	OMe	Ethyl	S	R	R
b	Epichinin	OMe	Vinyl	S	S	R
c	Epidihydrochinin	OMe	Ethyl	S	S	R
d	Epivinyl chinin	OMe	Vinyl	S	R	S
e	Epivinyl epichinin	OMe	Vinyl	S	S	S
f	Cuprein	OH	Vinyl	S	R	R
g	Dihydrocuprein	OH	Ethyl	S	R	R
2	Chinidin	OMe	Vinyl	R	S	R
a	Dihydrochinidin	OMe	Ethyl	R	S	R
b	Epichinidin	OMe	Vinyl	R	R	R
c	Epidihydrochinidin	OMe	Ethyl	R	R	R
d	Epivinyl chinidin	OMe	Vinyl	R	S	S
e	Epivinyl epichinidin	OMe	Vinyl	R	R	S
f	Cupreidin	OH	Vinyl	R	S	R
g	Dihydrocupreidin	OH	Ethyl	R	S	R
3	Cinchonidin	H	Vinyl	S	R	R
a	Dihydrocinchonidin	H	Ethyl	S	R	R
b	Epicinchonidin	H	Vinyl	S	S	R
a	Epidihydrocinchonidin	H	Ethyl	S	S	R
4	Cinchonin	H	Vinyl	R	S	R
a	Dihydrocinchonin	H	Ethyl	R	S	R
b	Epicinchonin	H	Vinyl	R	R	R
c	Epidihydrocinchonin	H	Ethyl	R	R	R

Obrázek 1: Alkaloidy chinovníku vyskytující se v čeledi Rubiaceae

Převzato a upraveno z: [8]

Struktura alkaloidů chinovníku je tvořena centrální hydroxylovou skupinou a chinolinovým a chinuklidinovým kruhem. Struktura má celkem 4 chirální jádra a jednotlivé alkaloidy se liší konfigurací ve dvou rozhodujících stereogenních centrech (C8 a C9) [10; 2].

Chinin je v základním stavu bezbarvá krystalická látka bez zápachu, která je málo rozpustná ve vodě. Ve své bezvodé formě taje při 177 °C. Chinidin je stereoizomer chininu. Liší se stereochemií v chirálních centrech 8 a 9, které v tomto případě mají konfiguraci (R) – 8 a (S) – 9. Cinchonin je důležitý minoritní alkaloid. Od chininu se liší pouze nepřítomností methoxyskupiny. Cinchonidin má stejný sterický vztah k cinchoninu jako chinidin k chininu. To znamená, že je to stereoizomer cinchoninu [10].

1.1.4 Syntéza chininu

Rozsáhlé pěstování chinovníku pro jeho využití k léčbě malárie podnítilo v minulosti intenzivní výzkum, jak v oblasti objasnění chemické struktury, tak i v oblasti celkové syntézy. Do výzkumu se zapojilo mnoho slavných chemiků jako jsou například Pauster, Rabe, Woodward a Prelog. První, kdo navrhl správnou základní chemickou strukturu chininu, byl P. Rabe. Kompletní stereochemickou strukturu chininu poté popsal V. Prelog. V roce 1944 R. B. Woodward a W. E. Doering provedli první úspěšnou formální syntézu chininu. Dalšímu, kdo provedl úspěšnou syntézu chininu byli například J. Gutzwiller a M. R. Usković. Ačkoli byl syntetický chinin příliš drahý a nedovedl tak konkurovat chininu izolovanému z kůry chinovníku, výsledkem výzkumu byl nakonec vývoj aktivních, synteticky snadno dostupných antimalarik. Bohužel kmeny plasmodia časem získaly rezistenci vůči většině syntetických antimalarik, proto je používání chininu k léčbě malárie stále aktuální [8; 12].

1.1.5 Využití

V medicíně se chinin používá jako antimalarikum, což znamená jako lék pro léčbu malárie. I přesto, že byl chinin z části nahrazen syntetickými léky (např. chlorochinem), je stále významným lékem proti malárii u kmenů, které jsou rezistentní na léky [2]. Zároveň bylo prokázáno, že přidavek cinchoninu do směsi chininu a chinidinu zvyšuje účinnost léčby malárie způsobené kmenem *Plasmodium falciparum* [13]. Chinin může být katalyticky přeměněn na chinidin, a proto je využíván jako hlavní zdroj produkce chinidinu [14]. U chinidinu se zjistilo, že má vliv na srdeční činnost, proto se ve formě sulfátu používá při léčbě srdečních arytmií [14; 2]. Cinchonidin, který má slabší účinek než chinin, se používá jako antispasmodikum při černém kašli [13].

Vedle využití v lékařství našly alkaloidy chinovníku uplatnění i v dalších oblastech. Například se alkaloidy chinovníku a jejich deriváty používají jako rozlišovací činidla, katalyzátory, ligandy a také jako selektory v enantioselektivní analýze [8].

Alkaloidy chinovníku se používají i v kosmetice díky svým stahujícím účinkům, účinkům proti lupům a účinkům, které stimulují růst vlasů. Soli chininu se přidávají do šamponů, vlasových olejů a vod [1]. Můžou se používat i jako přídavek do krémů na opalování, repelentů proti molům a insekticidům [13].

1.1.6 Využití v potravinářství

V potravinářství se z alkaloidů chinovníku využívá zejména chinin, který je brán jako standard hořkosti a prostředek k hořčení tonizujících nealkoholických i alkoholických nápojů. Typickým příkladem nápoje, který obsahuje chinin je tonik [15].

Prahová hodnota pro vjem hořké chuti chininu je zhruba 10 mg/l. Jeho přídavek do potravin je regulován vyhláškou 447/2004 Sb. o požadavcích na množství a druhy látek určených k aromatizaci potravin, podmínky jejich použití, požadavky na jejich zdravotní nezávadnost a podmínky použití chininu a kofeinu. Tato vyhláška udává, že chinin smí být použit k výrobě potravin přímo nebo jako součást aromatu. Dále udává že chinin smí být použit ve formě chininsulfátu nebo ve formě chinin hydrochloridu [16].

Přípustné množství pro nealkoholické nápoje a alkoholické nápoje (s výjimkou piva, vína a lihovin) je 75 mg/l. Pro lihoviny je povolené množství 300 mg/l. Veškeré nápoje a potraviny musí být označeny termínem „obsahuje chinin“. Nápoje obsahující chinin nejsou vhodné pro těhotné ženy, jelikož mohou vyvolat i potrat [16; 15].

1.1.7 Toxicita

Intoxikace chininem a chinidinem se označuje jako cinchonismus. Jeden gram chininu navozuje tzv. „chininovou opilost“ a konzumace nad 5 g chininu způsobuje akutní otravu. Smrtelná dávka může být už 10 g. Přípustný denní příjem (ADI) chininu pro dospělé osoby je 40 mg/kg [15; 17].

Mezi příznaky patří narušení sluchu, zvonění v uších, závratě, narušené nebo rozmazané vidění, narušené vnímání barev, gastrointestinální poruchy, vazodilatace (rozšíření cév), pocení, bolesti hlavy, horečka, zmatenost. Tyto příznaky se objevují při středně zvýšené koncentraci chininu v plazmě. S vyšší dávkou chininu se objevují stále vážnější poruchy zraku a srdeční a neurologické příznaky. Při velkém předávkování se může objevit silné zvracení, bolesti

břicha a průjem. K otravě může dojít jak jednorázovým předávkováním, tak nahromaděním chininu během léčby malárie. U pacientů trpících malárií způsobenou zimničkou *Plasmodium falciparum* jsou známými komplikacemi anémie a akutní intravaskulární hemolýza se selháním ledvin [17].

Předávkování chinidinem stejně jako předávkování chininem způsobuje nevolnost, zvracení, bolesti břicha a průjem. Při předávkování chinidinem jsou běžné hypokalcemie a metabolická acidóza [17].

1.2 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační technika, která je založená na principu dělení látek mezi dvě fáze, pohyblivou a nepohyblivou [18]. Pohyblivá fáze se označuje jako mobilní a v případě kapalinové chromatografie jde o kapalinu. Nepohyblivá fáze, označovaná jako stacionární, může být ve formě tuhé látky, kapaliny nanesené na tuhých částicích nebo ve formě filmu kapaliny na vnitřní stěně kapiláry [19].

K dělení látek je možné využít různé separační mechanismy jako je adsorpce, iontová výměna a rozdělování mezi dvě nemísitelné kapaliny [20]. Doba, kterou separovaná látka stráví na povrchu stacionární fáze, je závislá na velikosti interakce dané látky a stacionární fáze. Tím je určeno pořadí, v jakém jednotlivé složky vychází z kolony. Obecně platí, že čím větší je interakce, tím později složka opouští kolonu a tím má větší retenční čas [18].

Klasické kolonové uspořádání nedosahuje potřebné účinnosti separace, ale stalo se základem pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), při které se k pohybu mobilní fáze používá čerpadlo zařazené před kolonou, které zajišťuje konstantní průtok mobilní fáze [18; 21].

Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii se k separaci látek běžně využívá tzv. izokratická eluce, při níž se kolona promývá mobilní fází s konstantním složením po celou dobu analýzy [20]. Pokud je analyzována směs látek, které se podstatně liší v elučních časech nebo se některé složky směsi nedají eluovat vůbec a zůstávají v koloně, je výhodné použít k separaci tzv. gradientovou eluci [18; 20]. Její princip spočívá v použití mobilních fází, jejichž složení je možné v průběhu analýzy měnit, čím dochází ke změně eluční síly nebo selektivity mobilní fáze přímo během separace [22]. Změna složení mobilní fáze může mít lineární i nelineární charakter a řídí se předem zvoleným časovým harmonogramem [18]. Pokud se k tvorbě

gradientu používají dvě složky, jedná se o tzv. binární gradient mobilní fáze. V případě použití tří složek, které se v čase mění, používáme označení ternární gradient [23].

O kvalitě separace rozhoduje účinnost kolony, a především použitý chromatografický systém. Podle relativní polaritý stacionární a mobilní fáze se rozlišuje chromatografie s normálními fázemi a chromatografie s obrácenými fázemi. V systémech s normálními fázemi je stacionární fáze polárnější než mobilní fáze. V systémech s obrácenými fázemi je naopak polárnější mobilní fáze než fáze stacionární [24].

1.2.1 Chromatografické systémy s normálními fázemi (NP-HPLC)

Pro separaci látek v systémech s normálními fázemi se využívají polární stacionární fáze a mobilní fáze, které mají nižší polaritu než fáze stacionární. V tomto systému dochází k soutěži mezi molekulami vzorku a mobilní fází o aktivní absorpční centra na povrchu stacionární fáze [20; 25]. Retence je určována specifickými mezimolekulárními interakcemi látky s povrchem stacionární fáze a nespecifickými interakcemi látky s mobilní fází. S rostoucí polaritou analyzovaných složek se zvyšuje retence látek na koloně. Naopak s rostoucí koncentrací polárního rozpouštědla v mobilní fázi retence látek klesá [25].

Polarita látky je ovlivňována tvorbou intramolekulární vodíkové vazby, což se projevuje v selektivitě dělení. Dochází k uplatnění i sterických efektů, a proto jsou mezi různými izomery látek velké rozdíly v retenci. Funkční skupiny, které stericky stíní polární skupinu molekuly, jsou příčinou snížení retence látky. Selektivita dělení pro sousední homology klesá s rostoucím počtem uhlíků v alifatické řadě [25].

Jak už bylo zmíněno pro separaci v systému s normálními fázemi se využívají polární stacionární fáze. Mezi nejčastější používané stacionární fáze patří silikagel, který lze připravit s různě nastavenými fyzikálními vlastnostmi. V případě adsorpční kapalinové chromatografie má velký specifický povrch ($> 200 \text{ m}^2/\text{g}$), velký objem pórů ($> 0,7 \text{ ml/g}$) a střední průměr pórů (8 – 15 nm). S rostoucím objemem pórů klesá specifický povrch adsorbentu a tím i retence analyzovaných látek. Povrch silikagelu je mírně kyselý, a proto zadržuje silněji látky bazické než látky kyselé a neutrální [20]. Dalšími používanými stacionárními fázemi jsou polární chemicky vázané skupiny na silikagelovém nosiči. Můžou to být například aminoskupiny, hydroxyskupiny a kyanoskupiny [25].

1.2.2 Chromatografické systémy s obrácenými fázemi (RP-HPLC)

Pro separaci látek v systému s obrácenými fázemi se využívá polární mobilní fáze. Většinou jde o směs vody s polárními organickými rozpouštědly (alkoholy, acetonitril, dioxan,

tetrahydrofuran). Eluční síla mobilní fáze roste s klesající polaritou organického rozpouštědla, tedy v obráceném pořadí než při chromatografii s normálními fázemi [20].

Stacionární fáze má v tomto systému nepolární charakter. Na těchto stacionárních fázích neexistují aktivní adsorpční centra, která by byla schopná polárních interakcí. Povrch stacionární fáze je schopen interagovat pouze velmi slabými silami, které jsou mnohem slabší než polární interakce mezi mobilní fází a analyzovanou látkou [25].

Selektivita nepolárních stacionárních fází k málo polárním organickým látkám je určována vlastnostmi mobilní fáze. Vzájemné polární interakce mezi molekulami vody jsou tak silné, že k jejich překonání je potřeba značné energie. Slabé disperzní interakce mezi molekulami vody a molekulami málo polární organické látky tuto energii nemohou poskytnout. Proto jsou tyto látky ve vodě a vodných roztocích málo rozpustné a jsou z mobilní fáze vytlačovány do stacionární fáze. Čím nižší je polarita těchto látek, tím více jsou zadržovány na stacionární fází [20].

Jako stacionární fáze se většinou používá silikagel ve formě nosiče, na kterém je navázaný dlouhý uhlíkatý řetězec. Nejpoužívanější stacionární fází je C₁₈ [25].

RP-HPLC je nepochybně nejpoužívanější systém chromatografie díky výhodám, jako je separační kapacita látek různých polarit, použití mobilních fází s nižšími náklady a nízkou toxicitou a také rychlá rovnováha po změně eluce v gradientu. Využívá se zejména pro látky se střední a nízkou polaritou. Systém s obrácenými fázemi je vhodný i pro separaci polárních a bazických látek. V tomto případě je však nutné použít například stacionární fáze se zabudovanými polárními skupinami, které zachovávají charakter reverzní fáze, ale mají odlišnou selektivitu, v kombinaci s vysoce vodnými mobilními fázemi [26].

1.3.3 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC)

Hydrofilní interakční chromatografie je alternativní režim RP-HPLC, který se používá pro separaci polárních sloučenin. Úspěšně se používá pro separaci sacharidů, peptidů, proteinů [27], léků, toxinů, rostlinných extraktů a dalších sloučenin pro potravinářský a farmaceutický průmysl [28]. Zkratku HILIC poprvé navrhl Alpert v roce 1990 k popisu systému kapalinové chromatografie, kdy se využívá polární stacionární fáze stejně jako v NP-HPLC, ale použitá mobilní fáze je podobná jako v systému RP-HPLC [29]. Tato separační technika byla používána od roku 1975 v HPLC pro analýzu cukrů a oligosacharidů. Tyto separace však měly omezenou použitelnost, protože kvůli detekci pomocí indexu lomu mohly být prováděny pouze za izokratických podmínek [30].

K HILIC separaci lze použít různé typy polárních kolon. Typické stacionární fáze se skládají z klasického oxidu křemičitého nebo silikagelu [29], které mohou být modifikované mnoha polárními funkčními skupinami, jako jsou skupiny amidové, nitrilové, diolové, karbamátové či polyhydroxylové [31]. Speciálně pro HILIC separace byly vyvinuty stacionární fáze na bázi polyimidu kyseliny jantarové. Dále byly vyvinuty polymerní kolony s chemicky vázanými amidickými či zwitteriontovými sulfobetainovými či fosforylcholinovými skupinami. Perspektivním povrchem pro HILIC separace je také silikagel typu C s hydrosilovaným povrchem [31]. Přestože počet komerčně dostupných kolon, které jsou určeny speciálně pro HILIC separace, roste, stále neexistuje žádná univerzální stacionární fáze jako C18 v RP-HPLC. Různé typy separačních materiálů pro HILIC mají různé retenční charakteristiky a separační selektivity [29].

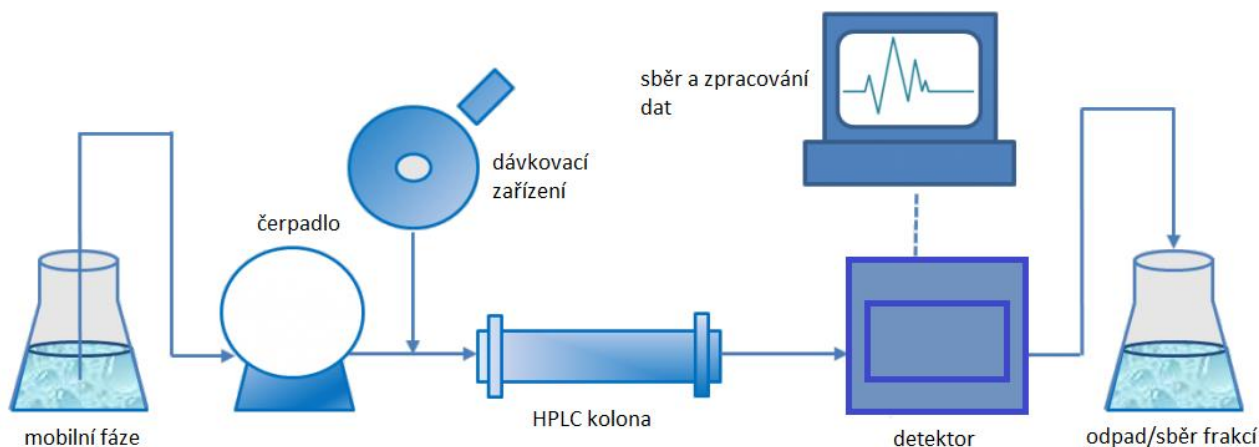
Typické mobilní fáze, které se používají pro HILIC separace, jsou polární organická rozpouštědla mísitelná s vodou. Nejčastěji se využívá acetonitril [26], ale lze použít i tetrahydrofuran, dioxan nebo alkoholy [29]. Pro tradiční metody v HILIC se používá směs rozpouštědel, která obsahuje vysokou koncentraci organického rozpouštědla, což může být množství převyšující 80 % organického rozpouštědla [26]. Do mobilních fází se přidávají iontové přísady, jako je octan amonný a mravenčan amonný, které se používají k řízení pH a iontové síly mobilní fáze. V systému HILIC mohou ovlivňovat polaritu analytu, což vede k rozdílným změnám v retenci.

Separace HILIC se mohou provádět buď v izokratickém režimu s konstantním vysokým procentem organického rozpouštědla, nebo s gradienty, které začínají vysokým procentem organického rozpouštědla a končí vysokým podílem rozpouštědla vodného [29].

HILIC separace lze snadno kombinovat s několika detekčními technikami jako je absorpce ultrafialového světla, fluorescence, index lomu, rozptyl odpařovacího světla a hmotnostní spektrometrie. Detekce hmotnostním spektrometrem je ideální pro analýzu polárních sloučenin, které jsou rozpustné ve vodě, protože vysoký obsah organického rozpouštědla v mobilní fázi vede k jeho rychlému odpařování během ionizace elektrosprejem. Oproti RP-HPLC je zde desetinásobně zvýšená citlivost, protože organické rozpouštědlo je mnohem těkavější [29].

1.3.4 Instrumentace v kapalinové chromatografii

Kapalinový chromatograf se skládá z následujících částí: zařízení pro uchování a manipulaci s mobilní fází, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a přístroje pro záznam a vyhodnocení dat [25]. Schéma kapalinového chromatografu je znázorněno na obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma instrumentace HPLC

Převzato a upraveno z: https://ibsen.com/wp-content/uploads/HPLC-illustration_T-1024x366.png staženo 12.2.2021

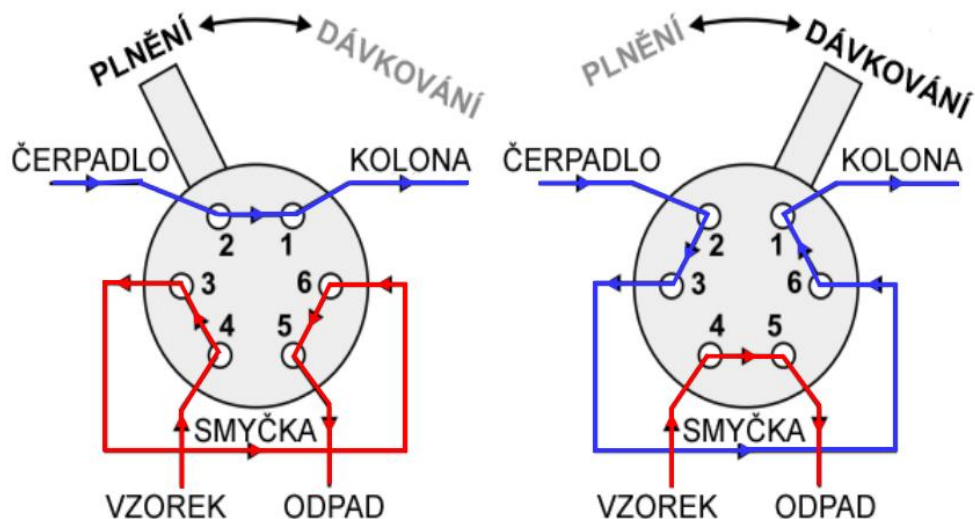
1.3.4.1 Čerpadla

Funkcí čerpadla je zajištění konstantního průtoku mobilní fáze s přesností lepší než 1 %. Materiál čerpadla (keramika, nerezová ocel, plast) musí být takový, aby nedocházelo ke znečištění mobilní fáze ani k poškození čerpadla [21].

Mezi nejznámější typy čerpadel se řadí pneumatická čerpadla, membránová čerpadla, čerpadla injekčního typu a pístová čerpadla. První dva zmíněné typy se téměř nepoužívají kvůli jejich konstrukční náročnosti. U čerpadel injekčního typu je nevýhodou omezený objem mobilní fáze, který vyžaduje časté plnění, a také čas potřebný k dosažení stabilního průtoku mobilní fáze [25]. U pístového čerpadla je nevýhodou kolísání průtoku mobilní fáze s časem vlivem střídání sací a výtlačné fáze. Kvůli tomu dochází k rušivým tlakovým rázům. Tato nevýhoda se dá eliminovat použitím dvou a více pístových čerpadel a v sérii zapojených čerpadel [21].

1.3.4.2 Dávkový zařizeni

Nástřik vzorku do kolony se provádí buď nástřikem pomocí injekční stříkačky nebo pomocí dávkovacího kohoutu. Dávkování injekční stříkačkou má značné nevýhody z hlediska udržení tlaku, těsnosti a vnášení stop materiálu injekční stříkačky [21]. V dnešní době převažují dávkovací systémy, které využívají šesticestný kohout s dávkovací smyčkou. Principem je, že se vzorkem naplní dávkovací smyčka a následně se kohout přepne do druhé polohy, kdy eluent protéká smyčkou a vzorek je unášen do kolony [19]. Funkce šesticestného ventilu je znázorněna na obrázku 3.



Obrázek 3: Schéma funkce šesticestného dávkovacího ventilu

Převzato z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/instrumentalni-met-anal/kapalinova-chromatografie.pdf>
 staženo 12.2.2021

1.3.4.3 Kolony

Separace vzorku probíhá na koloně, která je plněná sorbentem [25]. Materiál kolony musí být chemicky inertní, musí odolávat vysokým tlakům a vnitřní povrch pláště kolony musí být dostatečně hladký. Nejčastěji používaný materiál pro výrobu kolon je nerezová ocel, plasty nebo sklo [22]. Hojně jsou využívány i předkolony, které slouží jako ochrana hlavní kolony [21].

Pro různé aplikace lze využít kolony různé délky, průměru a s různými sorbenty. Pro rutinní analýzy se využívají kolony s délkou 10 až 25 cm, vnitřním průměrem 2,1 až 5 mm a plněné částicemi o velikosti 1 až 10 μm [25; 21].

1.3.4.4 Detektory

Výběr detektoru je pro analýzu nesmírně důležitý. Mezi požadované vlastnosti, které by měl detektor mít, patří vysoká citlivost, široký lineární rozsah, selektivita a nezávislost na změny průtoku a složení mobilní fáze [20].

Detektory můžeme dělit například na destruktivní a nedestruktivní. V případě destruktivních detektorů dochází k rozložení analyzované látky, zatímco u nedestruktivních detektorů můžeme po analýze jímat jednotlivé frakce [20]. Dalším typem dělení může být rozdělení na koncentrační a hmotnostní detektory. Koncentrační detektory reagují na změnu hmotnostní

koncentrace složky nezávisle na rychlosti přívodu složky do detektoru. Naproti tomu hmotnostní detektory reagují na změnu hmotnostního toku složky do detektoru [25].

Nejčastěji používané detektory pracují na principu absorpce záření v UV a viditelné oblasti, na principu fluorescence nebo na měření indexu lomu. V posledních letech jsou velmi využívané systémy HPLC spojené s hmotnostním spektrometrem [32].

1.3.4.4.1 Spektrofotometrický detektor

Jeden z nejpoužívanějších detektorů je dnes spektrofotometrický UV/VIS detektor. Je založen na principu absorpce záření v UV a viditelné oblasti, tedy v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm. Vykazuje vysokou citlivost pro většinu analyzovaných látek za předpokladu, že jsou schopny absorbovat záření v dané oblasti vlnových délek [25; 24].

Spektrofotometrický detektor je založen na stejném principu jako UV spektrofotometr a skládá se ze tří hlavních částí. První částí je zdroj záření. Jako zdroj záření se používá například deuteriová výbojka, která emituje záření v širokém rozsahu vlnových délek. Další částí detektoru je měrná cela o objemu 5 až 10 μl a optické délce 10 mm, kterou protéká eluent. Poslední částí je fotonásobič, který měří změny intenzity záření [18].

Kvantitativní stanovení je založeno na Lambert-Beerově zákoně (rovnice (1)), který vyjadřuje vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a vlastní velikostí absorpce, která je vyjádřena jako absorbance (A). Každá látka má svou absorpční konstantu (ϵ) [25].

$$A = l \cdot \sum_{i=1}^n \epsilon_i \cdot c_i \quad (1)$$

1.3.4.4.2 Hmotnostní spektrometr

Spojení hmotnostního spektrometru a HPLC je dnes už rutinní záležitost. V minulosti se toto spojení potýkalo s řadou problémů, z nichž největší byly vysoký průtok mobilní fáze v HPLC a obrovské rozdíly tlaků mezi separací iontů a hmotnostní detekcí. Separace iontů probíhá za atmosférického tlaku, zatímco hmotnostní detekce vyžaduje vysoké vakuum [32].

Detekce hmotnostním spektrometrem poskytuje spektrální údaje, které se používají k určení molekulové hmotnosti, identifikaci látek a k jejich kvantifikaci, což je vnímáno jako největší výhoda této detekce. Analýza probíhá ve třech hlavních krocích. Nejprve dochází k ionizaci vzorku, následuje rozdělení iontů podle poměru m/z (hmotnost/náboj) a nakonec probíhá detekce iontů v detektoru [25].

V prvním kroku hmotnostní detekce dochází k převedení neutrální molekuly na ionty. Nejčastěji používanějšími ionizačními technikami jsou ionizace elektrosprejem (ESI) chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) [32]. Po ionizaci jsou ionty převedeny do hmotnostního analyzátoru, ve kterém dojde k rozdělení iontů podle poměru m/z a následně dojde k jejich urychlení a fokusaci. Jako hmotnostní analyzátoři se využívají kvadrupól, analyzátor doby letu nebo iontová past. Pro zvýšení selektivity je možné zařadit několik analyzátorů za sebou, což se označuje jako tandemová hmotnostní spektrometrie [25].

1.4 Aplikace HPLC v analýze

V této kapitole diplomové práce bude prezentován přehled prací, které se zabývaly analýzou alkaloidů chinovníku. Nejčastěji se pro separaci alkaloidů chinovníku používá RP-HPLC [33; 34; 35; 36; 37; 38; 39], ačkoliv byly zkoušeny i jiné separační mechanismy HPLC. Byly použity různé detekční systémy, jako je UV detekce [39; 35], fluorescenční detekce [39; 37] nebo hmotnostní spektrometrie [36]. Některé práce se zabývají analýzou alkaloidů chinovníku jako skupiny, jiné se zabývají farmaceutickou analýzou chininu a chinidinu a separací metabolitů těchto sloučenin produkovaných v tělních tekutinách [40]. Z dostupné literatury není zřejmé, že by se někdo zabýval analýzou alkaloidů chinovníku pomocí HILIC chromatografie.

Holmfred a kol. optimalizovali metodu HPLC pro separaci čtyř hlavních alkaloidů v kůře chinovníku (chinin, chinidin, cinchonin, cinchonidin). Metoda umožňuje separaci těchto alkaloidů za 26 minut s limitem kvantifikace 5 $\mu\text{g/g}$ ze vzorku 50 mg kůry chinovníku. Při analýze byla použita UV detekce při 250 nm a 330 nm. Zároveň byla zkoušena i fluorescenční detekce s použitím 330 nm pro excitaci a 420 nm pro emisi. Pro analýzu byla použita kolona Kinetex XB – C18. Mobilní fáze byla složena ze dvou složek, (A) 0,2 M pufr mravenčanu amonného s 01 % kyselinou mravenčí a vodou (10:90, v/v) a (B) 100 % methanol. Průtok mobilní fáze byl 0,2 ml/min a k analýze byla použita gradientová eluce. Gradient byl 18 % B od 0 do 10 minut, poté lineárně rostl z 18 % B na 35 % B od 10 do 25 minut, následoval návrat na 18 % B po 26 minutách. Celková doba analýzy byla 40 minut. Teplota kolony byla 50 °C. Aby nedocházelo k rozšíření píku, bylo kontrolováno pH mobilní fáze a jako optimální bylo stanoveno pH 3. Jedinou nevýhodou je použití methanolu místo acetonitrilu, jelikož jeho vyšší viskozita ve směsi má za následek vyšší protitlak během gradientové eluce [39].

Gatti a kol. vyvinuli jednoduchou a specifickou metodu stanovení čtyř hlavních alkaloidů chinovníku, jejich derivátů a pyridoxin-hydrochloridu (vitamin B6) pomocí HPLC

s fluorescenční detekcí s použitím 330 nm pro excitaci a 420 nm pro emisi. Chromatografická separace byla provedena na koloně Phenomenex Prodigy ODS za izokratických podmínek. Extrakce alkaloidů z kůry chinovníku byla prováděna ultrazvukem. Jako mobilní fáze byla použita směs triethylamin fosfátového pufru (pH 3, 0,05 M) a acetonitrilu (88:12, v/v) při průtoku 0,4 ml/min. Popsané chromatografické podmínky umožňují dobrý tvar píku a efektivní rozlišení testovaných sloučenin [37].

Abdulrahman a kol. popsali separaci a identifikaci různých alkaloidů chinovníku s použitím HPLC propojené s termosprejovou hmotnostní spektrometrií (TSP). Lyofilizované buňky (3 g) chinovníku byly rozemlety, homogenizovány ve 36 ml 0,2 M H₂SO₄-CHCl₃ (1:1) a následně vloženy do ultrazvuku. Následně byl vzorek zfiltrován a promyt 9 ml 0,2 M H₂SO₄. CHCl₃ se nechala dekantovat a vodná fáze byla zalkalizována 10 M NH₄OH na pH 9,5 – 10 a následně se nechala projít kolonou Extrelut. Lipofilní složky byly eluovány CHCl₃, který byl poté odpařen do sucha. Zbytek byl rozpuštěn v 1 ml CH₃OH, nechal se projít kolonou C18 Sep-Pak a následně byl promyt dalšími 2 ml CH₃OH. Chromatografická separace byla provedena za izokratických podmínek na koloně C18 Waters μBondapak. Jako mobilní fáze byla použita směs vody, methanolu a kyseliny octové (71:25:4) s přídatkem 0,01 M octanu amonného při průtoku 0,1 ml/min. Detekce byla prováděna pomocí fluorimetru (excitace při 250 nm, emise při 418 nm) a také pomocí kvadrupólového hmotnostního spektrometru. Podmínky iontového zdroje TSP byly optimalizovány přibližnými teplotami: zdroj, 200 °C; tryska, 190 °C; komora, 230 °C. Alkaloidy chinovníku byly monitorovány při m/z 295 a 325 a vnitřní standard byl monitorován při m/z 330. Tato metoda poskytuje rychlý, citlivý a selektivní test komerčně důležitých alkaloidů chinovníku [36].

Keene a kol. prováděli separaci třinácti alkaloidů chinovníku ve vzorcích listů stromu rodu *Cinchona* metodou HPLC s UV detekcí při 280 nm. Nejprve byly listy (10 g) rozemlety na prášek a následně byly macerovány v methanolu (50 ml x 2). Methanолоvé extrakty byly spojeny, odpařeny do sucha a poté extrahovány (25 ml x 3) 2 % H₂SO₄. Vodné kyselé podíly byly spojeny, zalkalizovány roztokem NH₄OH, a poté extrahovány (3x) do stejného objemu chloroformu. Chloroformové podíly byly spojeny, promyty vodou, sušeny nad bezvodým síranem sodným a odpařeny do sucha. Alkaloidové extrakty byly zváženy a následně znovu rozpuštěny v chloroformu, čímž byla získána konečná koncentrace 5 mg/ml pro analýzu pomocí HPLC. Chromatografická separace byla prováděna za izokratických podmínek na koloně, která byla plněna 5 μm LICHrosorb Si 60. Mobilní fázi tvořila směs chloroformu, methanolu a hydroxidu amonného (500:70:1) při průtoku 1,5 ml/min. Touto metodou bylo

dosaženo dobrého rozlišení pro všechny referenční alkaloidy kromě cinchoninu a cinchonidinu, které se v tomto systému překrývaly. Tato analýza ukázala, že navzdory přítomnosti chininu a chinidinu v listech chinovníku, je obsah těchto alkaloidů velmi nízký ve srovnání s jejich obsahem v kůře. Proto listy nelze považovat za komerční zdroj těchto alkaloidů [41].

Horie a kol. vyvinuli metodu pro stanovení extraktu alkaloidů chinovníku v nápojích pomocí HPLC s UV detekcí při 230 nm a fluorescenční detekcí při 405 nm pro cinchonin a cinchonidin a 450 nm pro chinidin a chinin (excitace při 235 nm). Pro každý typ vzorku byla zvolena jiná příprava. Sycené nápoje byly odplyněny pomocí ultrazvukové lázně a vloženy do kartuše SPE. Poté, co byla patrona promyta 10 ml vody a následně 5 ml 15 % methanolu, byly alkaloidy chinovníku eluovány 10 ml methanolu. Eluát byl filtrován přes 0,45 μm membránový filtr. Ovocné nápoje byly naváženy do centrifugační zkumavky a centrifugovány při 4000 ot/min po dobu 5 minut. Část supernatantu byla vložena do patrony SPE. Další postup byl stejný jako v případě sycených nápojů. Nápoje s obsahem alkoholu vyšším než 10 % byly upraveny na pH 10 pomocí 28 % NH_4OH a vloženy do kartuše SPE. Další postup byl stejný jako v případě předchozích vzorků. Chromatografická separace byla prováděna na L-koloně ODS s LiChrospher® 100 RP-18e. Jako mobilní fáze byla použita směs methanolu a 20 mmol/l dihydrogenfosforečnanu draselného (30:70, v/v). Teplota kolony byla 40 °C. Všechny alkaloidy chinovníku byly jasně odděleny během 24 minut. Detekční limit této metody byl 2 $\mu\text{g/ml}$ [35].

Hermans-Lokkerbol a kol. provedli separaci některých indolových a chinolinových alkaloidů chinovníku pomocí HPLC s UV detekcí při 275 nm. Chromatografická separace byla provedena na koloně LiChrosorb RP-8 Select B. Mobilní fáze se skládala z 0,1 M pufru fosforečnanu draselného a acetonitrilu (85:15, v/v), ke kterému se následně přidá 5 nM hexylamin, 85 % kyselina fosforečná, čímž se získá pH 3, a 2 % (v/v) tetrahydrofuranu. Touto metodou bylo dosaženo přijatelné separace pro většinu sloučenin, s výjimkou cinchoninonu a chinidinonu. Pro tyto sloučeniny bylo nezbytné vytvořit samostatnou mobilní fázi, která byla tvořena 1 M pufrem octanu sodného, acetonitrilem a tetrahydrofuranem (80:20:5) [34].

Hobson-Frohock a Edwards provedli separaci alkaloidů chinovníku s použitím vázané kyanopropylové kolony v systému s reverzní fází jak ve standardní směsi, tak v extraktu rostlinné tkáně. Tento extrakt byl připraven homogenizací zmrazeného listu chinovníku ve fosfátovém pufru o pH 7,5 obsahujícím 0,1 % (hmot./obj.) detergentu Tween 20. Pro detekci

byl použit detektor s proměnnou vlnovou délkou při 231 nm. Mobilní fáze se skládala z kyseliny ortofosforečné (0,0068 M, pufované na pH 7 0,1 M hydroxidem sodným), acetonitrilu, methanolu a tetrahydrofuranu. Průtok mobilní fáze byl 1,5 ml/min. Kolona použitá pro separaci byla plněna 5 μ m Spherisorb CN, vázaným kyanopropylovým sférickým oxidem křemičitým. Touto metodou bylo dosaženo téměř úplného rozlišení čtyř základních alkaloidů chinovníku [33].

Smith zkoumal aplikace HPLC pro separaci jednotlivých alkaloidů v prodáváných vzorcích chinidinových solí a jejich dávkových forem. Přesně změřená část injekce, tablety nebo kapsle byla přenesena do vhodné odměrné baňky a zředěna methanolem, aby byla získána konečná koncentrace cca 1 mg chinidin sulfátu nebo 1,6 mg chinidin glukonátu na 1 ml roztoku. Detekce probíhala pomocí UV detektoru při 254 nm. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitrilu, 2-methoxyethanolu a 0,5 M dihydrofosforečnanu sodného (15:15:70). Nejprve byly zkoušeny kolony v systému s normálními fázemi, např. Partisil-10, μ Porasil, Zorbax-Sil. Nejlepší separace bylo dosaženo na koloně Zorbax-Sil. Výše popsaný systém rozpouštědel poskytl adekvátní rozlišení chinidinu, chininu, dihydrochinidinu, cinchoninu a dihydrocinchoninu. Následně byly zkoušeny kolony v systému s reverzními fázemi, z nichž nejlepší pro separaci alkaloidů chinovníku byla kolona μ Bondapak Phenyl [42].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité přístroje a zařízení

- Analytické digitální váhy (Sartorius, Ústí nad Labem)
- Mikropipety (Thermo, Scientific, Finsko)
- Ultrazvuková lázeň (Fisherbrand, USA)
- Centrifuga (Jet Biofil, Čína)
- UV/VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2600 (Kyoto, Japonsko)
 - Kyvety 6030-UV (Hellma, Německo)

K vlastní analýze byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies, USA), u kterého byly využity následující součásti:

- Autosampler G7129B, 1290 Vialsampler (Agilent Technologies, USA)
- Binární čerpadlo G7120A, 1290 High Speed Pump (Agilent Technologies, USA)
- Spektrofotometrický detektor G7114B, 1290 VWD (Agilent Technologies, USA)

Pro separace byly využity následující kolony:

1. InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 (délka: 150 mm, vnitřní průměr: 3 mm, zrnitost: 2,7 μm , Agilent, USA)
2. Kinetex Polar C18 (délka: 100 mm, vnitřní průměr: 3 mm, zrnitost: 2,6 μm , Phenomenex, USA)
3. Kinetex EVO C18 (délka: 150 mm, vnitřní průměr: 3 mm, zrnitost: 2,6 μm , Phenomenex, USA)
4. Luna HILIC (délka: 150 mm, vnitřní průměr: 3 mm, zrnitost 3 μm , Phenomenex, USA)
5. Luna Omega SUGAR (délka: 150 mm, vnitřní průměr: 3 mm, zrnitost: 3 μm , Phenomenex USA)

2.2 Použité chemikálie

- Acenaften (99 %, Sigma Aldrich, USA)
- Acetonitril (HPLC gradient grade, Merck, Německo)
- Deionizovaná voda připravená zařízením Milli-Q® (Merck, Německo)
- Ethanol (96 %, Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina octová ($\geq 99,7$ %, Sigma Aldrich, USA)
- Methanol (HPLC gradient grade, Merck, Německo)

- Octan amonný (≥ 98 %, Sigma Aldrich, USA)
- Thiomočovina (≥ 99 %, Sigma Aldrich, USA)

2.3 Použité standardy

- Chinin (chinin sulfát, ze zásob na Katedře analytické chemie)
- Chinidin (p. a., Sigma Aldrich, USA)
- Cinchonin (p. a., Lachema, Československo)
- Kofein (p. a., SUKL, Česko)
- Hydrochinin (96 %, Sigma Aldrich, USA)
- Hydrochinidin (95 %, Sigma Aldrich, USA)
- Hydrocinchonin (≥ 95 %, Sigma Aldrich, USA)
- Cinchonidin (96 %, Sigma, Aldrich, USA)

2.4 Použité vzorky

Vzorek 1: River Indian Tonic Water

Značka: River

Výrobce: MASPEX Czech s.r.o.

Zakoupeno: dne 24. 6. 2021, Billa, Pardubice

Vzorek 2: River Ginger Ale

Značka: River

Výrobce: MASPEX Czech, s.r.o.

Zakoupeno: dne 24. 6. 2021, Billa, Pardubice

Vzorek 3: Kinley Tonic Water

Značka: Kinley

Výrobce: Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o.

Zakoupeno: dne 24. 6. 2021, Globus, Pardubice

Vzorek 4: Kinley Biter Rose

Značka: Kinley

Výrobce: Coca-Cola HBC Česko a Slovensko, s.r.o.

Zakoupeno: dne 24. 6. 2021, Globus, Pardubice

Vzorek 5: Schweppes Indian Tonic

Značka: Schweppes

Výrobce: Schweppes International Limited

Zakoupeno: dne 24. 6. 2021, Globus, Pardubice

Vzorek 6: Schweppes Bitter Lemon

Značka: Schweppes

Výrobce: Schweppes International Limited

Zakoupeno: dne 24. 6. 2021, Globus, Pardubice

2.5 Příprava roztoků standardů

Standardní roztoky byly připraveny navážením 2 mg každého standardu do skleněné vialky. Následně byly přidány 2 ml methanolu, aby koncentrace standardních roztoků odpovídala 1 g/l. Výjimku tvořil chinin, který se v čistém methanolu špatně rozpouštěl, proto byl připraven rozpuštěním 2 mg látky ve 4 ml směsi methanolu a deionizované vody 50:50 (v/v). Tyto roztoky byly vloženy do ultrazvukové lázně na 20 minut, aby došlo k úplnému rozpuštění látek. K analýze pomocí HPLC s reverzní fází bylo ze standardních roztoků odpipetováno 10 µl do skleněné vialky a objem byl doplněn methanolem na 1 ml. Zároveň byla vytvořena i směs všech standardů. Do skleněné vialky bylo odpipetováno 10 µl každého standardu a objem byl doplněn pomocí methanolu na 1 ml.

K analýze pomocí HPLC v systému HILIC byly vytvořeny standardní roztoky o stejné koncentraci jako pro reverzní fáze, pouze s rozdílem, že byly rozpuštěny v acetonitrilu. Výjimku tvořily chinin, cinchonin a hydrocinchonin, které se v čistém acetonitrilu špatně rozpouštěly. Tyto tři standardy byly připraveny rozpuštěním 2 mg látky ve 4 ml směsi acetonitrilu a deionizované vody 50:50 (v/v). Všechny připravené roztoky byly vloženy do ultrazvukové lázně na 20 minut. K analýze bylo ze standardních roztoků odpipetováno 10 µl do skleněné vialky a objem byl doplněn acetonitrilem na 1 ml. Zároveň byla vytvořena i směs všech standardů stejným způsobem jako pro analýzu pomocí HPLC s reverzní fází.

2.6 Příprava roztoků vzorků

Neředěné vzorky byly vloženy do ultrazvukové lázně na 30 minut. Poté byly převedeny do Eppendorf zkumavek a odstředovány po dobu 15 minut. K analýze pomocí HPLC bylo pipetováno nejprve 500 μ l každého vzorku do skleněných vialek. Následně byly připraveny i vzorky 10x ředěné, kdy bylo pipetováno 50 μ l vzorku a bylo přidáno 450 μ l deionizované vody.

2.7 Podmínky analýzy pomocí HPLC

Analýza standardů a vzorků byla prováděna na kapalinovém chromatografu v systému s obrácenými fázemi a následně i v systému HILIC. V obou systémech byla využita gradientová eluce s různými profily gradientů, kde mobilní fázi tvořila směs vody (A) a acetonitrilu (B). Použité profily gradientů jsou uvedeny v tabulce 1 a 2 v části výsledky a diskuze (kapitola 3). Kolony, které byly k analýze použity, jsou uvedeny v kapitole 2.1.

V systému s obrácenými fázemi bylo pro zlepšení separace k vodné mobilní fázi přidáno 0,1 % kyseliny octové. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, kromě kolony č. 2 (Kinetex Polar C18) kde byl použit průtok 0,330 ml/min. Doba analýzy byla 25 minut.

V systému HILIC byl pro zlepšení separace k oběma mobilním fázím přidán octan amonný. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min a doba analýzy byla 20 minut.

V obou systémech byl dávkovaný objem 5 μ l. Analýzy byly prováděny při teplotě kolony 30 °C. Detekce standardů i vzorků probíhala při vlnové délce 230 nm.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Určení vlnové délky pomocí UV/VIS spektrometru

Pro zjištění vlnové délky vhodné k detekci v HPLC analýze alkaloidů chinovníku bylo využito UV/VIS spektrometru. Standardní roztoky alkaloidů chinovníku a kofeinu byly připraveny dle postupu, který je popsán v kapitole 2.5. Vzorky v kyvetě byly proměřeny proti srovnávací kyvetě, která obsahovala methanol. UV/VIS spektra standardů jsou uvedeny v příloze (grafy P1 až P8).

Spektra byla proměřena v rozmezí vlnových délek 200-400 nm. Absorpční spektra alkaloidů chinovníku jsou velmi podobná, jelikož mají i velmi podobnou strukturu. Absorpční maxima všech analyzovaných standardů se pohybovala kolem 230 nm, proto byla tato vlnová délka vybrána pro detekci při analýze pomocí HPLC. Pro kofein (graf P4) sice tato vlnová délka neodpovídá absorpčnímu maximu, ale byla také použita, protože analýzy byly prováděny pomocí detektoru schopného registrovat pouze jednu vlnovou délku.

3.2 Analýza pomocí HPLC

Standardy a vzorky byly analyzovány jak v systému s reverzními fázemi, tak i v HILIC chromatografii v módu s gradientovou elucí. Nejprve byly změřeny retenční charakteristiky standardů na čtyřech vybraných kolonách při různých gradientech (tabulky P1 až P22). Tři z použitých kolon byly pro systém s reverzní fází a čtvrtá kolona pro HILIC chromatografii. Z naměřených retenčních časů byl následně vypočítán retenční faktor v gradientu pro jednotlivé látky dle rovnice (2). Přestože je rovnice (2) formálně shodná s výpočtem retenčního faktoru při izokratické analýze, získané hodnoty pro gradientovou eluci není možné přímo srovnávat s izokratickými, neboť v gradientu retenční faktor látky klesá.

Vzorec pro výpočet retenčního faktoru:

$$k' = \frac{t_R}{t_M} - 1 \quad (2)$$

k' – retenční faktor v gradientu

t_R – retenční čas standardu (min)

t_M – mrtvý objem kolony (min)

3.2.1 Profil gradientů

Pro popis gradientů byla vypočtena strmost pro každý gradient dle rovnice (3). Vypočtené hodnoty strmosti gradientů jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. Na strmost gradientu má vliv doba gradientu a počáteční a koncová koncentrace silnějšího rozpouštědla. V případě systému s obrácenými fázemi byl silnějším rozpouštědlem acetonitril. V případě HILIC separací byla silnějším rozpouštědlem voda. U obou použitých systémů a u všech použitých kolon byl nejstrmější gradient č. 1 a nejpozvolnější gradient č. 3. Obecně platí, že čím je gradient strmější, tím kratší jsou eluční časy všech analytů.

Vzorec pro výpočet strmosti gradientu:

$$B = \frac{\varphi_k - \varphi_p}{t_g} \quad (3)$$

B – strmost gradientu (min^{-1})

φ_k – koncová koncentrace silnějšího rozpouštědla

φ_p – počáteční koncentrace silnějšího rozpouštědla

t_g – doba gradientu (min)

Tabulka 1: Profil a strmost jednotlivých gradientů pro kolony použité v systému s reverzními fázemi

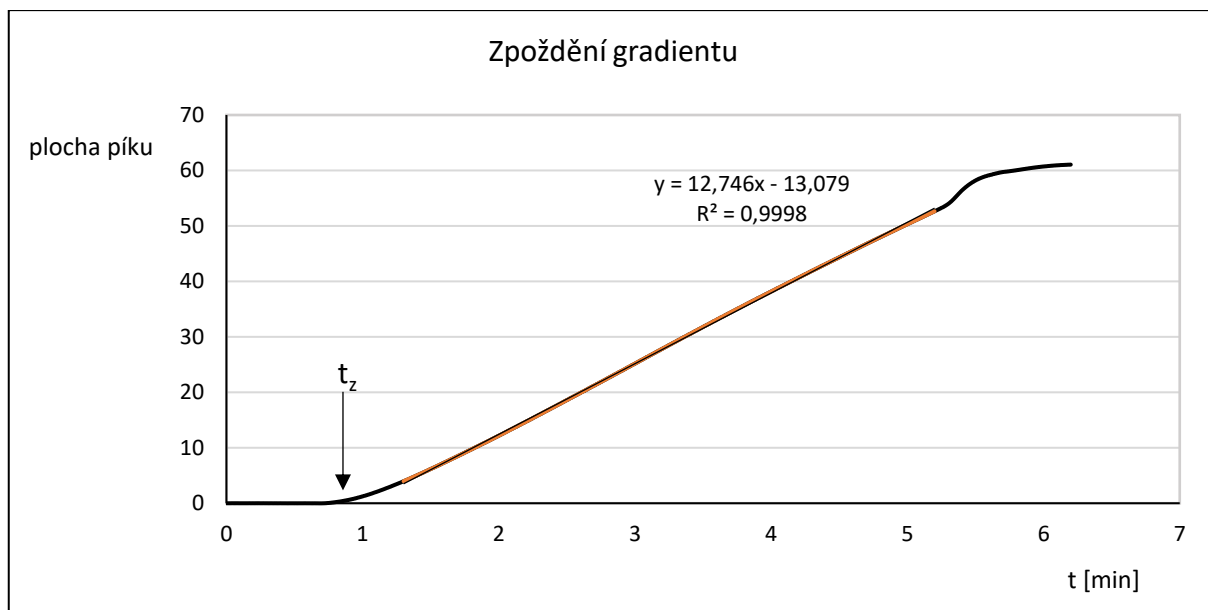
Gradient č. 1		Typ kolony	$t_g = 23$ min
t [min]	C_{ACN} [%]		Strmost gradientu [min^{-1}]
0	5	InfinityLab poroshell 120 SB-C18 kinetex Polar C18 kinetex EVO C18	0,0413
23	100		
24	5		
Gradient č. 2		Typ kolony	$t_g = 23$ min
t [min]	C_{ACN} [%]		Strmost gradientu [min^{-1}]
0	5	InfinityLab poroshell 120 SB-C18 kinetex Polar C18 kinetex EVO C18	0,0283
23	70		
24	5		
Gradient č. 3		Typ kolony	$t_g = 23$ min
t [min]	C_{ACN} [%]		Strmost gradientu [min^{-1}]
0	5	InfinityLab poroshell 120 SB-C18 kinetex Polar C18 kinetex EVO C18	0,0196
23	50		
24	5		

Tabulka 2: Profil a strmost jednotlivých gradientů pro kolonu použitou v systému HILIC

Gradient č. 1		Typ kolony	$t_g = 18 \text{ min}$
t [min]	C_{H_2O} [%]		Strmost gradientu [min^{-1}]
0	5	Luna HILIC	0,0278
18	55		
19	5		
Gradient č. 2		Typ kolony	$t_g = 18 \text{ min}$
t [min]	C_{H_2O} [%]		Strmost gradientu [min^{-1}]
0	5	Luna HILIC	0,0167
18	35		
19	5		
Gradient č. 3		Typ kolony	$t_g = 18 \text{ min}$
t [min]	C_{H_2O} [%]		Strmost gradientu [min^{-1}]
0	5	Luna HILIC	0,0083
18	20		
19	5		

3.2.2 Zpoždění gradientu

Při práci s gradientovou elucí je důležitým parametrem souvisejícím s danou instrumentací tzv. zpoždění gradientu. To vyjadřuje čas, za který mobilní fáze proteče mezi bodem mísení složek mobilní fáze a hlavou kolony. Protože byl v rámci diplomové práce používán systém s binárním čerpadlem, kde dochází k mísení složek mobilní fáze ve vysokotlaké části, je zpoždění gradientu ovlivněno pouze objemem spojovacích kapilár mezi výstupem čerpadla, autosamplerem a kapilárou pro připojení kolony. Zpoždění gradientu bylo experimentálně určeno pomocí lineární změny složení mobilní fáze o dvou složkách, a to voda/voda + 0,1 % (v/v) aceton. K měření byla místo kolony použita ocelová spojka s nulovým vnitřním objemem a průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,3 ml/min. Zpoždění gradientu bylo určeno jako zlom na křivce absorbance v závislosti na čase a odpovídá přibližně 0,97 minuty, což je patrné z grafu 1. Při daném průtoku mobilní fáze tedy odpovídá objemu 0,291 ml.



Graf 1: Určení času zpoždění gradientu pomocí dvousložkové mobilní fáze voda/voda + 0,1 % (v/v) aceton

3.2.3 Separace alkaloidů chinovníku s gradientovou elucí

Pro separaci alkaloidů chinovníku byly použity dva systémy, systém s reverzními fázemi a HILIC chromatografie. Z dostupné literatury je zjevné, že systém s reverzními fázemi se používá běžně [33; 34; 35; 36; 37; 38; 39], proto byla provedena i analýza HILIC chromatografií, aby bylo možné dané výsledky porovnat v rámci různých systémů. V chromatografii s reverzními fázemi byly zkoušeny tři vybrané kolony (kapitola 2.1), na kterých byly zkoušeny tři různé profily gradientů (tabulka 1). Pro HILIC chromatografii byly testovány dvě kolony (kapitola 2.1), a dále byly zkoušeny tři různé gradienty (tabulka 2). V následujících kapitolách jsou shrnuty a diskutovány jednotlivé vlivy testovaných podmínek na separaci alkaloidů.

3.2.3.1 Porovnání kolon v systému s reverzními fázemi

V systému s reverzními fázemi byly zkoušeny tři různé profily gradientů (tabulka 1). Chromatogramy alkaloidů na všech použitých kolonách při daných gradientech jsou uvedeny v příloze (grafy P9 až P17). Experimentálně změřené retenční časy standardů a vypočtené retenční faktory jsou také uvedeny v příloze (tabulky P1 až P18).

U všech třech kolon se jedná o kolony plněné povrchově porézními částicemi s oktadecylsilikagelovou fází. Kolona Kinetex EVO C18 má navíc hybridní organo-silikagelové částice, které ve své struktuře mají část siloxanových vazeb nahrazenou

ethylenovými můstky, proto je tato stacionární fáze stabilní v čistě vodných mobilních fázích, ale také v širším rozsahu pH než běžné oktadecylsilikagelové stacionární fáze.

U kolon Kinetex Polar C18 a Kinetex EVO C18 docházelo k výraznému chvostování píků, což může být způsobeno bazicitou analyzovaných látek, kdy v přítomnosti dusíku v molekule dochází k interakci se zbytkovými silanoly na částicích náplně kolon. V případě kolony InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 se jedná o jiného výrobce, proto je možné, že dodatečná úprava částic po navázání C18 řetězců (tzv. endcapping), která se u různých výrobců liší, může způsobit nižší aktivitu zbytkových silanolů, a tedy menší chvostování bazických látek. Fáze SB-C18 je navíc tvořena vázaným diisobutyl-n-oktadecyl silanem [43], který stericky brání přístupu k volným silanolovým skupinám na povrchu silikagelové částice. Dalším problémem u kolony Kinetex Polar C18 bylo, že při zvolených gradientech bylo možné rozdělit jen omezené množství látek analyzované směsi (grafy P12 až P14). Proto tato kolona nebyla pro další separace vhodná.

Pokud budeme porovnávat kolony z hlediska retence látek, a tedy délky trvání analýzy, lze pozorovat, že nejrychlejší separace proběhla na koloně Kinetex EVO C18, a to u všech zvolených gradientů. Pro srovnání, analýza s nejpomalejším, nejméně strmým gradientem č. 3 u této kolony trvala 8 minut. U kolony InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 trvala analýza se stejným gradientem 11 minut a u kolony Kinetex Polar C18 to bylo 12 minut.

3.2.3.2 Vliv profilu gradientu v systému s reverzními fázemi na separaci

Z pohledu profilu gradientu lze u všech kolon pozorovat, že s rostoucí strmostí gradientu a s rostoucí koncentrací organického rozpouštědla se eluční časy látek snižovaly, a analýzy tudíž probíhaly v kratším čase. Retenční časy analytů tedy byly vždy nejkratší při gradientu č. 1 a nejdelší při gradientu č. 3 (pro srovnání tabulky P2, P4, P6). Podle teorie gradientové eluce by mělo při strmějším gradientu docházet k vyšší kompresi píků [44], a v důsledku toho by píky měly být užší. Bohužel toto chování nelze jednoznačně porovnat, jelikož u kolony InfinityLab Poroshell 120 SB C18 docházelo při gradientech č. 1 a 2 k výrazné koeluci píků (grafy P9, P10). U kolon od firmy Kinetex docházelo při všech gradientech k výraznému chvostování píků, proto ani na těchto kolonách nelze toto chování porovnat (grafy P11 až P17). U separací na koloně Kinetex EVO C18 došlo oproti ostatním dvěma kolonám ke změně elučního pořadí, kdy se kofein posunul směrem k vyšším elučním časům (tabulky P14, P16, P18). U prvních dvou použitých kolon nedošlo k žádné změně elučního pořadí, které je v případě obou kolon stejné u všech zkoušených gradientů (tabulky P2, P4, P6, P8, P10, P12).

Jako nejvhodnější gradient pro kvalitativní i kvantitativní analýzu vzorků byl vybrán nejpozdější gradient č. 3. Důvodem byl dostatečný čas na rozseparování všech látek směsi, ale i přesto byl celkový čas analýzy poměrně krátký (8 minut).

3.2.3.3 Srovnání separace v systému s reverzními fázemi a v HILIC

Pokud budeme porovnávat separace v systému s reverzními fázemi a v HILIC chromatografii, lze pozorovat, že došlo k výrazné změně elučního pořadí (tabulka 3). I v rámci jednotlivých gradientů v HILIC chromatografii došlo ke změně elučního pořadí, v tomto případě však změny nebyly tak výrazné a jednalo se vždy o změnu elučního pořadí dvou analytů, například chininu a chinidinu nebo hydrochinidinu a cinchoninu (tabulky P19 až P24).

V HILIC chromatografii došlo k výraznému zkrácení elučních časů i celkové doby analýzy (5 minut) oproti chromatografii s reverzními fázemi. V systému s reverzními fázemi se dal pozorovat trend, který ukazoval, že s pozvolnějším gradientem se prodlužovaly časy všech analytů. V HILIC chromatografii se tento trend neprojevil a eluční časy jsou u všech vybraných gradientů téměř totožné. Například u cinchoninu byl retenční čas při gradientu č. 1 (3,451 minut), gradientu č. 2 (3,510 minut) a gradientu č. 3 (3,418 minut) (tabulky P19 až P24). Protože analýza probíhala ve velmi krátkém čase a ani při pozvolnějším gradientu nedošlo k prodloužení elučních časů, docházelo k velké koeluci píků a nebylo možné rozdělit všechny analyty (grafy P18 až P20). Dalším problémem v HILIC chromatografii bylo, že s pozvolnějším gradientem docházelo u některých analytů k prodloužení retenčních časů, ale pouze v případě analýzy směsného standardu. Tím vznikly rozdíly mezi časy standardů analyzovanými zvlášť a mezi časy standardů analyzovaných ve směsi. Příkladem je chinin a chinidin, které v gradientu č. 2 a 3 ve směsném standardu eluovaly v jednom píku, jehož retenční čas byl výrazně vyšší než časy jednotlivých standardů (tabulky P21 až P24). Tento jev byl pravděpodobně způsobený rozdílným obsahem vody ve vzorcích. Jak bylo popsáno v kapitole 2.5 (příprava roztoků standardů), chinin byl připraven rozpuštěním 2 mg látky ve 4 ml směsi acetonitrilu a deionizované vody 50:50 (v/v), protože v čistém acetonitrilu se špatně rozpouštěl, a pravděpodobně proto došlo k danému posunu retenčních časů. Jelikož reálné vzorky toniků obsahují velké množství vody a před analýzou se téměř nijak neupravovaly, pravděpodobně by tím došlo ke zkreslení výsledků analýzy, a proto tato kolona k analýze vzorků nebyla použita.

Tabulka 3: Porovnání změny elučního pořadí v systému s reverzními fázemi a v HILIC chromatografii

Eluční pořadí	InfinityLab Poroshell 120 SB-C18	Luna HILIC
1	kofein	kofein
2	cinchonin	chinidin
3	cinchonidin	chinin
4	hydrocinchonin	hydrochinidin
5	chinidin	cinchonin
6	chinin	hydrochinin
7	hydrochinidin	cinchonidin
8	hydrochinin	hydrocinchonin

U kolony Luna HILIC byly testovány i jiné typy gradientů, než jsou uvedeny v tabulce 2. Bohužel u žádného z ostatních gradientů nebylo zaznamenáno zlepšení oproti již uvedeným analýzám (grafy P18 až P20). Překvapivě dobré separace bylo dosaženo izokratickou elucí s mobilní fází obsahující 3 % (v/v) vody v acetonitrilu a s přidavkem 40 mmol/l octanu amonného do obou složek mobilní fáze (graf P21). I v této mobilní fázi však nedošlo k rozdělení všech složek směsi. K porovnání byla dále použita kolona pro HILIC chromatografii Luna Omega SUGAR. Jedná se o směsnou amino/amidovou fázi, u které byly zkoušeny stejné profily gradientů jako v případě kolony Luna HILIC. Poměrně dobré separace bylo dosaženo při gradientu od 5 % do 15 % vody (graf P22). Bohužel však bylo opět rozděleno jen 7 analytů z 8. Jelikož koelujícím analytem byl chinin, jehož přítomnost se očekávala ve vzorcích, nebyla ani tato kolna vybrána jako vhodná pro analýzu reálných vzorků. Dalším důvodem byl, stejně jako v případě kolony Luna HILIC, efekt velkého obsahu vody ve vzorcích nápojů a kvůli tomu pravděpodobné snížení rozlišení pro jednotlivé látky v těchto vzorcích.

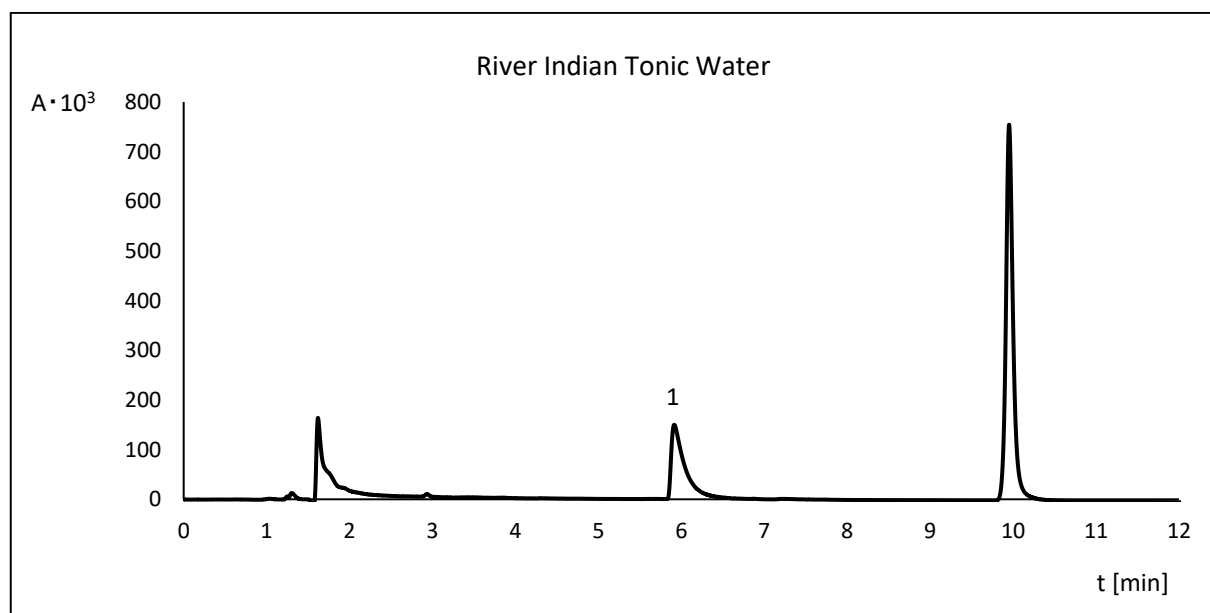
3.2.4 Kvalitativní stanovení chininu v reálných vzorcích

Kvalitativní i kvantitativní stanovení chininu ve vzorcích toniků bylo provedeno na koloně Kinetex EVO C18. Nejlepší separace sice bylo dosaženo na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, kde došlo k rozseparování všech alkaloidů za relativně krátký čas. Bohužel však

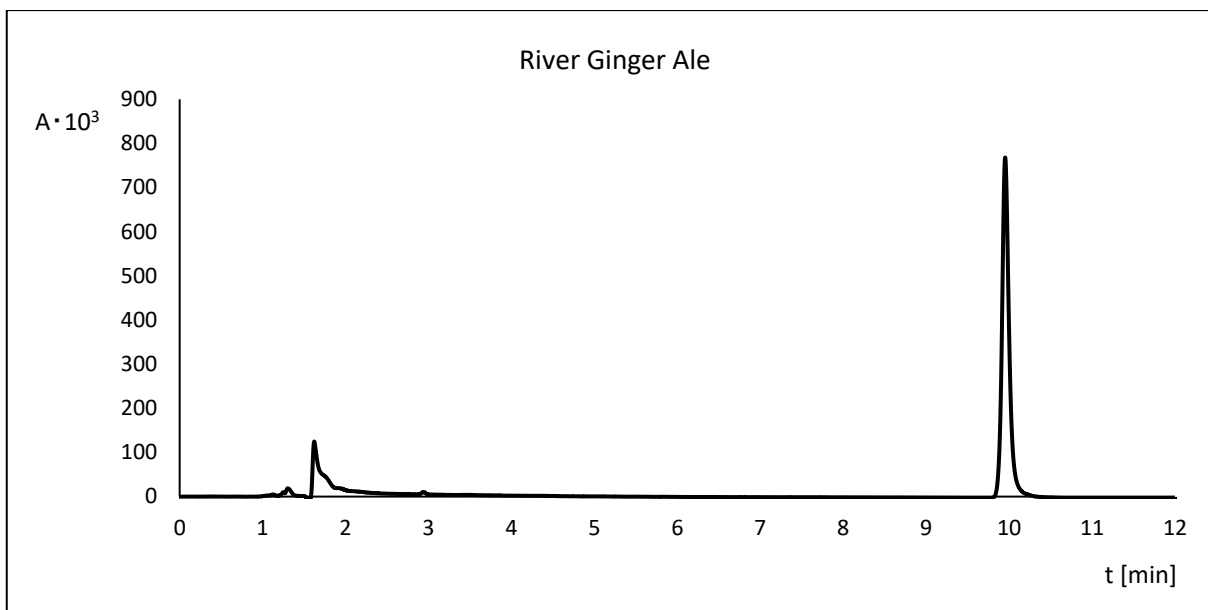
při práci s touto kolonou došlo časem ke snížení účinnosti, a proto nebylo možné na této koloně provést také druhou část experimentů, tedy analýzu reálných vzorků. V případě separací na kolonách Kinetex Polar C18 a Luna HILIC nebyl při zvolených gradientech detekován chinin. Jelikož reálné vzorky toniků obsahovaly z alkaloidů chinovníku pouze chinin, postrádalo by použití těchto kolon k analýze smysl.

Z výše uvedených důvodů byla pro analýzu vzorků použita kolona Kinetex EVO C18. Směs standardů sice nebyla plně rozseparována a docházelo ke chvostování píků, což je patrné i z chromatografů (Grafy P15 až P17), ale z výše uvedených kolon byla Kinetex EVO C18 nejlepší volbou. Optimalizovaný gradient byl od 5 % do 50 % acetonitrilu. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Do vodné mobilní fáze bylo přidáno 0,1 % kyseliny octové. Dávkovaný objem vzorků byl 5 μ l. Pro analýzu byla kolona vyhřátá na 30 °C a byla použita UV detekce při vlnové délce 230 nm, stejně jako v případě standardů. Pro kvalitativní stanovení byly použity neředěné vzorky.

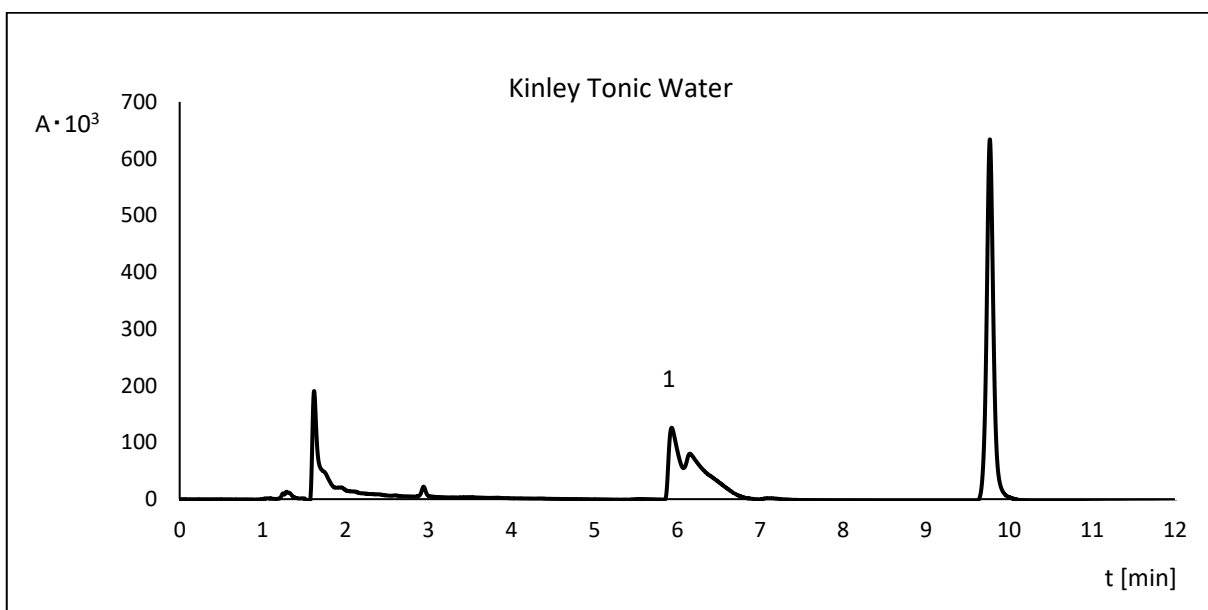
U vzorků č. 1, 3, 5 a 6 bylo kvantitativní analýzou prokázáno, že obsahují chinin, jak bylo deklarováno výrobcem na obalu daných vzorků (grafy 3, 5 7, 8). U vzorků č. 2 a 4 chinin výrobcem deklarován nebyl, proto jejich analýza spočívala v ověření, zda vzorky opravdu chinin neobsahují a zda nedochází ke klamání spotřebitele (grafy 4, 6).



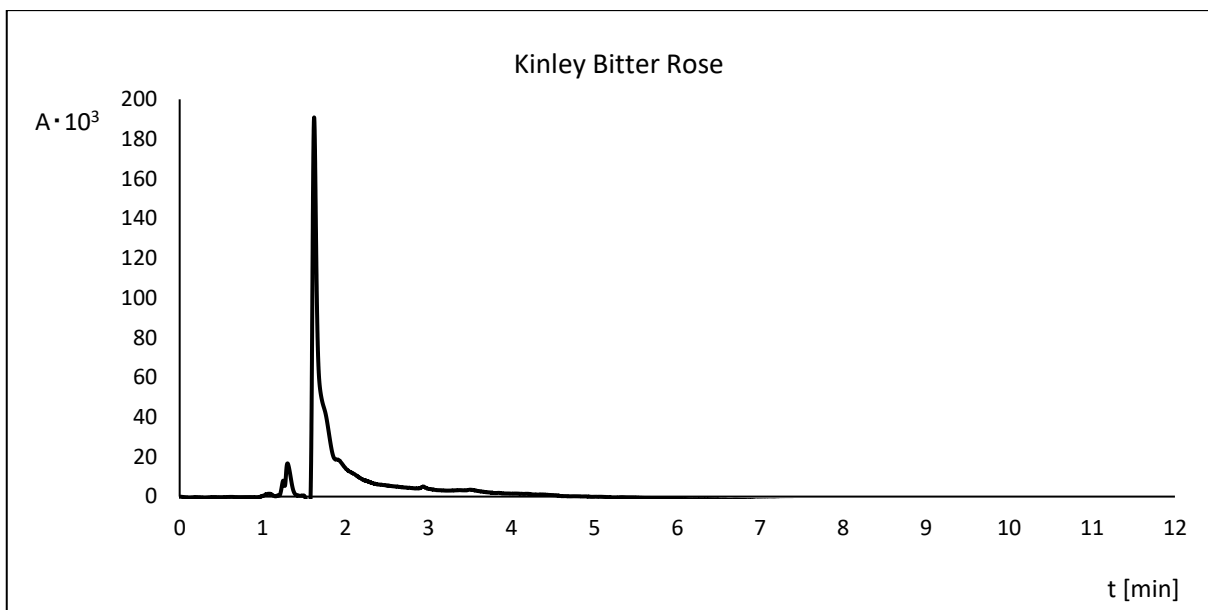
Graf 2: Chromatogram vzorku č. 1; kolona Kinetex EVO C18; Gradient č. 3; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230nm; analyty: 1, chinin ($t = 5,906$ min)



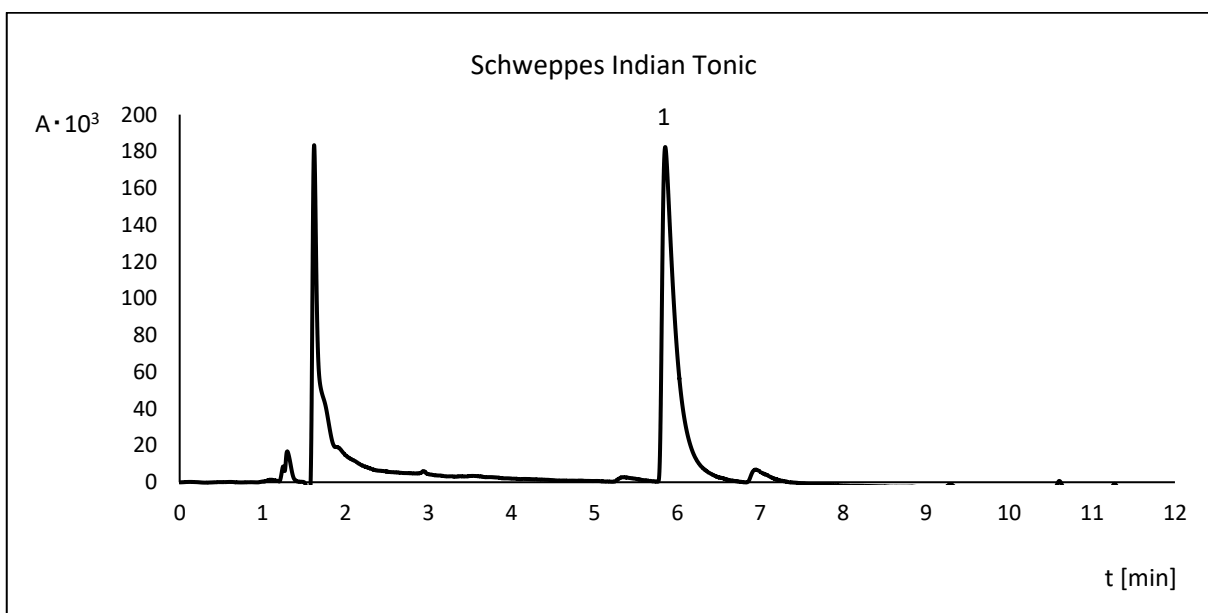
Graf 3: Chromatogram vzorku č. 2; kolona Kinetex EVO C18; Gradient č. 3; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230nm



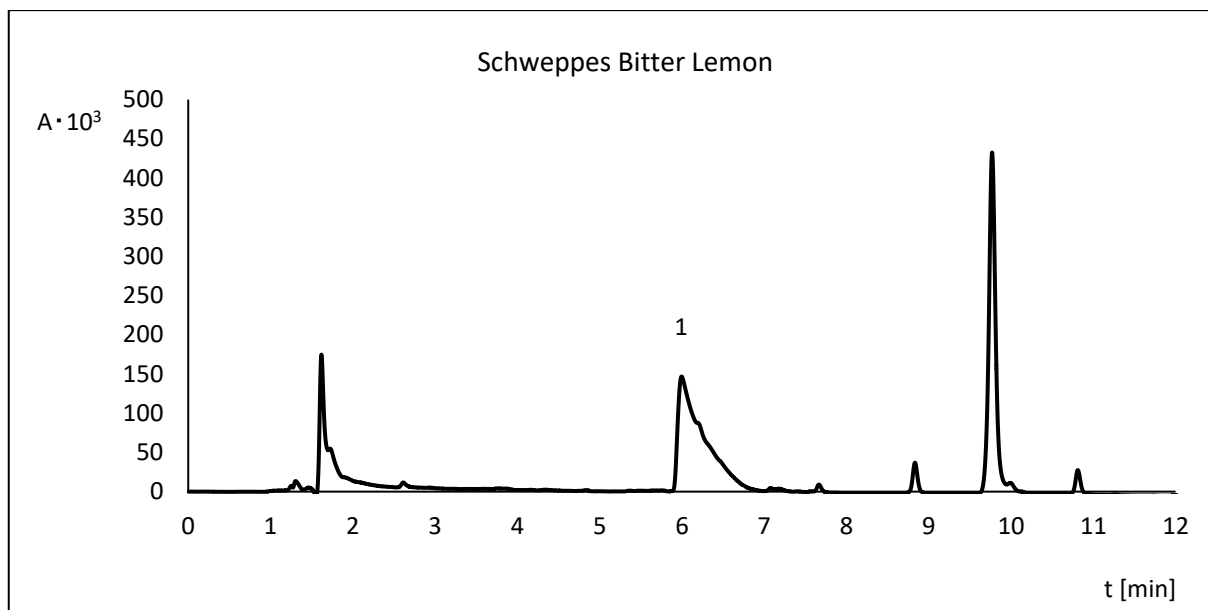
Graf 4: Chromatogram vzorku č. 3; kolona Kinetex EVO C18; Gradient č. 3; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230nm; analyty: 1, chinin ($t = 5,934$ min)



Graf 5: Chromatogram vzorku č. 4; kolona Kinetex EVO C18; Gradient č. 3; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230nm



Graf 6: Chromatogram vzorku č. 5; kolona Kinetex EVO C18; Gradient č. 3; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230nm; analyty: 1, chinin ($t = 5,853$ min)



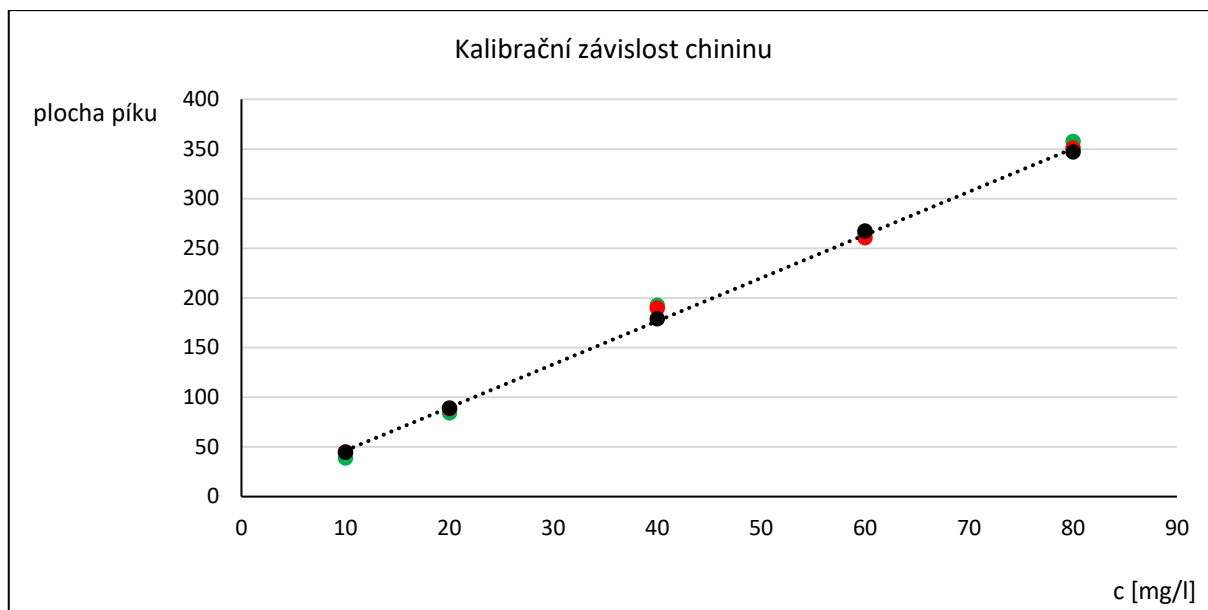
Graf 7: Chromatogram vzorku č. 6; kolona Kinetex EVO C18; Gradient č. 3; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230nm; analyty: 1, chinin (t = 6,001 min)

3.2.5 Kvantitativní stanovení chininu v reálných vzorcích

Pro kvantitativní analýzu byly použity pouze vzorky č. 1, 3, 5 a 6, protože vzorky č. 2 a 4 chinin neobsahovaly. Dané vzorky byly připraveny k měření dle postupu uvedeného v kapitole 2.6. Kvantitativní analýza probíhala za stejných podmínek jako analýza kvalitativní (kapitola 3.2.4). Byl připraven standardní roztok chininu, z něhož byla připravena kalibrační řada. Každý roztok kalibrační řady byl třikrát proměřen a z experimentálně naměřených dat (tabulka P23), byla sestrojena rovnice kalibrační závislosti (graf 8). Rovnice kalibrační závislosti a další kalibrační parametry jsou uvedeny v tabulce 4. Z kalibračních závislostí a experimentálně naměřených dat reálných vzorků (tabulka P24) byly vypočteny koncentrace chininu v jednotlivých vzorcích, které jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 4: Kalibrační parametry

Rovnice kalibrační závislosti	$y = 4,409x + 1,429$
Hodnota spolehlivosti R^2	0,997
Směrodatná odchylka směrnice	0,065
Směrodatná odchylka úseku	3,182



Graf 8: Kalibrační závislost chininu

Tabulka 5: Koncentrace chininu ve vzorcích toniků

Vzorek	Koncentrace chininu[mg/l]	směrodatná odchylka
River Indian Tonic Water	337,4	6,95
Kinley Tonic Water	228,2	4,24
Schweppes Indian Tonic	405,3	5,15
Schweppes Bitter Lemon	538,1	8,40

Nejvyšší koncentrace chininu byla naměřena v toniku Schweppes Bitter Lemon, u kterého naměřená koncentrace sedmkrát překračuje množství chininu, které je povolenou vyhláškou 447/2004 Sb. I v ostatních vzorcích bylo naměřeno vyšší než povolené množství chininu. Jelikož vyhláška nestanovuje, že výrobce musí uvést množství chininu, není možné naměřené hodnoty nijak porovnat. Výsledky jsou však pravděpodobně zkreslené kvůli chvostování píků při analýze.

4 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo najít vhodnou kolonu pro separaci alkaloidů chinovníku a optimalizovat podmínky chromatografické separace. K analýze byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Byly vyzkoušeny tři kolony určené pro separace na reverzní fázi a dvě kolony pro separaci v systému HILIC. Nejlepší separace bylo dosaženo na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, kde došlo k rozseparování všech alkaloidů za relativně krátký čas (11 minut). Bohužel nebylo možné na této koloně provést analýzu reálných vzorků, jelikož při používání této kolony došlo ke snížení její účinnosti. Proto byla pro analýzu vzorků vybrána druhá nejlepší kolona, Kinetex EVO C18. Při analýze na této koloně docházelo ke chvostování píků, proto jsou naměřené plochy píků částečně zkreslené. Dalším důvodem, proč byl obsah chininu ve všech vzorcích vyšší, než je povoleno vyhláškou, může být případná koeluce dalších látek přítomných ve vzorcích spolu s chininem, které vzhledem k použitému typu detekce nebylo možné rozlišit.

Bibliografie

- [1] SALVADOR, Amparo a Alberto CHISVERT. 8.5.4.2 *Alkaloids*. Elsevier, s. 352. ISBN 978-0-444-52260-3.
- [2] BORATYŃSKI, Przemysław J. Dimeric Cinchona alkaloids. *Molecular Diversity*. 2015, **19**(2), 385-422. ISSN 1573-501X.
- [3] FRANCIS, Frederick J. *Wile Encyclopedia of Food Science and Technology*. 2. John Wiley & Sons, 1999.
- [4] ANISZEWSKI, T. *Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications*. 2. Elsevier Science, 2015. ISBN 978-0-444-59433-4.
- [5] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-5-3.
- [6] GAL, Joseph. Louis Pasteur, Chemist: An Account of His Studies of Cinchona Alkaloids: An Account of His Studies of Cinchona Alkaloids. *Helvetica Chimica Acta*. John Wiley & Sons, Ltd, 2019, **102**(3), 1800226. ISSN 0018-019X.
- [7] PETER, K., Alice KURIAN a M. SANKAR. *Medicinal plants*. New Delhi: New India Publishing Agency, 2007. ISBN 81-89422-42-1.
- [8] KACPRZAK, Karol. Chemistry and Biology of Cinchona Alkaloids. *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. 2013, s. 605-641. ISBN 978-3-642-22143-9.
- [9] RUIZ-MESIA, Lastenia, Wilfredo RUIZ-MESÍA, Matías REINA, Rafael MARTÍNEZ-DIAZ, Concepción DE INÉS, Ana GUADAÑO a Azucena GONZÁLEZ-COLOMA. Bioactive Cinchona Alkaloids from Remijia peruviana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. American Chemical Society, 2005, **53**(6), 1921-1926. ISSN 0021-8561.
- [10] BEYER, Hans a Wolfgang WALTER. 7.12.4 *Alkaloids Based on Quinoline*. Woodhead Publishing, s. 810-811. ISBN 978-1-898563-37-2.

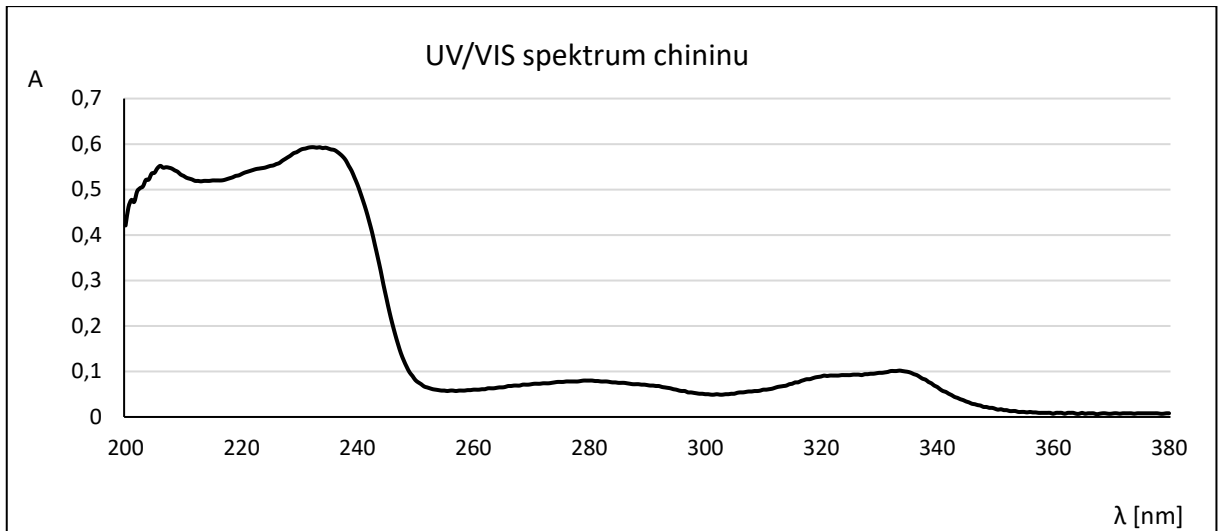
- [11] BORATYŃSKI, Przemysław, Mariola ZIELIŃSKA-BIAJET a Jacek SKARŻEWSKI. *Chapter Two - Cinchona Alkaloids—Derivatives and Applications*. 82. Academic Press, 2019, , s. 29-145. ISSN 1099-4831.
- [12] GUTZWILLER, Juerg a Milan USKOKOVIC. Total synthesis of Cinchona alkaloids. 2. Stereoselective total syntheses of quinine and quinidine. *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society, 1978, **100**(2), 576-581. ISSN 0002-7863.
- [13] RATNADEWI, DIAH a SUMMARYONO. Quinoline Alkaloids in Suspension Cultures of *Cinchona ledgeriana* Treated with Various Substances. *HAYATI Journal of Biosciences*. 2010, **17**(4), 179-182. ISSN 1978-3019.
- [14] NAIR, K.P. Prabhakaran. *4 - Cinchona (Cinchona sp.)*. London: Elsevier, 2010, s. 111-129. ISBN 978-0-12-384677-8.
- [15] *Bezpecnostpotravin.cz* [online]. Informační centrum bezpečnosti potravin [cit. 2021-07-26]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76556.aspx>
- [16] Vyhláška č. 447/2004 Sb. Vyhláška o požadavcích na množství a druhy látek určených k aromatizaci potravin, podmínky jejich použití, požadavky na jejich zdravotní nezávadnost a podmínky použití chininu a kofeinu. In: *Sbírka zákonů*. 2004.
- [17] BRANDENBERGER, H. a R.A.A. MAES. 3.14.4.3 *Cinchona Alkaloids, Quinidine and Quinine*. De Gruyter, s. 633-634. ISBN 978-3-11-010731-9.
- [18] ČŮTA, František a Milan POPL. *Instrumentální analýza*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.
- [19] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0227-8.
- [20] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Separace látek: kapalinová vysokoúčinná kolonová chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.
- [21] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [22] DOUŠA, Michal. *Hplc.cz* [online]. 1999 [cit. 2021-02-20]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>

- [23] JANDERA, Pavel a Jaroslav CHURÁČEK. *Pokroky chemie: Kapalinová chromatografie s programovaným složením mobilní fáze*. 1. Praha: Academia, 1984.
- [24] CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0010-0.
- [25] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. [online]. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. [cit. 2021-01-12]. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [26] PEDROSO, Tahisa, Ana MEDEIROS a Herida SALGADO. RP-HPLC×HILIC chromatography for quantifying ertapenem sodium with a look at green chemistry. *Talanta*. 2016, **160**, 745-753. ISSN 0039-9140.
- [27] JIANG, Zhengjin, John REILLY, Brian EVERATT a Norman SMITH. Novel zwitterionic polyphosphorylcholine monolithic column for hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2009, **1216**(12), 2439-2448. ISSN 0021-9673.
- [28] GUO, Yong a Sheetal GAIKI. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005, **1074**(1), 71-80. ISSN 0021-9673.
- [29] BUSZEWSKI, Bogusław a Sylwia NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, **402**(1), 231-247. ISSN 1618-2650.
- [30] HEMSTRÖM, Petrus a Knut IRGUM. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*. John Wiley & Sons, Ltd, 2006, **29**(12), 1784-1821. ISSN 1615-9306.
- [31] JANDERA, Pavel. HILIC chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *Chemagazín*. 2011, (2). ISSN 1210-7409.

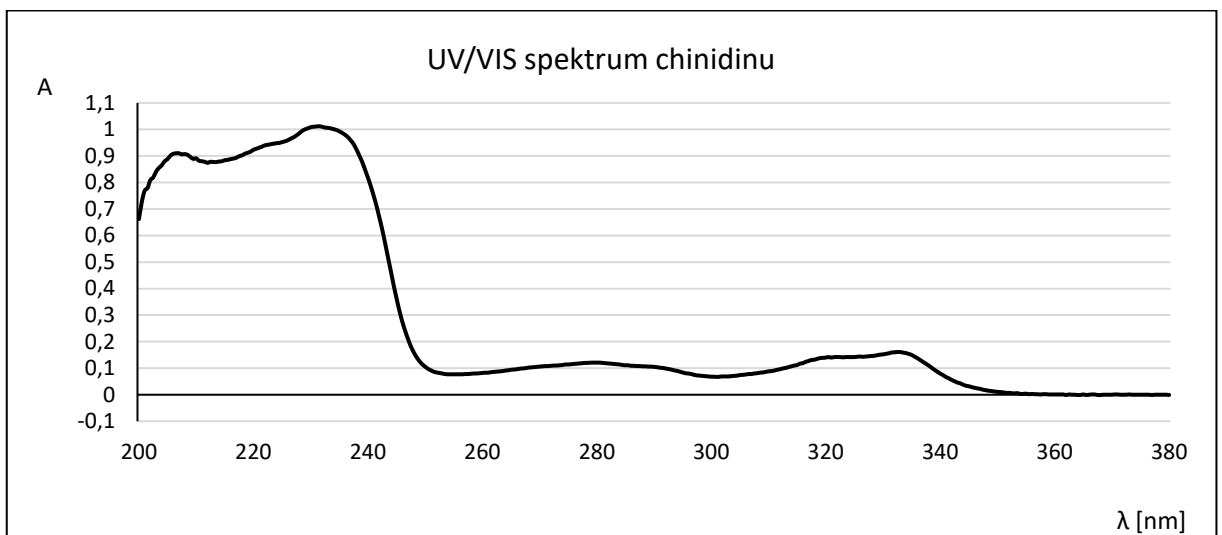
- [32] ANDERSON, Jared, Alain BERTHOD, Verónica ESTÉVEZ a Apryll STALCUP. *Analytical separation science*. Weinheim: Wiley-VCH, 2015. [online]. ISBN 978-3-52733374-5.
- [33] HOBSON-FROHOCK, A. a W.T.E. EDWARDS. Separation of cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1982, **249**(2), 369-372. ISSN 0021-9673.
- [34] HERMANS-LOKKERBOL, A., T. VAN DER LEER a R. VERPOORTE. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of some indole and quinoline alkaloids from cinchona. *Journal of Chromatography A*. 1989, **479**, 39-51. ISSN 0021-9673.
- [35] HORIE, Masao, Mitsuo OISHI, Fusako ISHIKAWA, Tetsuya SHINDO, Akiko YASUI, Shuzo OGINO a Koichi ITO. Liquid Chromatographic Analysis of Cinchona Alkaloids in Beverages. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2006, **89**(4), 1042-1047. ISSN 1060-3271.
- [36] ABDULRAHMAN, S., M.E. HARRISON, K.J. WELHAM, M.A. BALDWIN, J.D. PHILLIPSON a M.F. ROBERTS. High-performance liquid chromatographic—mass spectrometric assay of high-value compounds for pharmaceutical use from plant cell tissue culture: Cinchona alkaloids: Cinchona alkaloids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1991, **562**(1), 713-721. ISSN 0378-4347.
- [37] 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 0003-2670.
- [38] MCCALLEY, David Victor. Analysis of the cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography: Use as probes of activity towards basic compounds shown by reversed-phase columns: Use as probes of activity towards basic compounds shown by reversed-phase columns. *Journal of Chromatography A*. 1986, **357**, 221-226. ISSN 0021-9673.
- [39] HOLMFRED, Else, Claus CORNETT, Carla MALDONADO, Nina RøNSTED a Steen 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*. John Wiley & Sons, Ltd, 2017, **28**(5), 374-380. ISSN 0958-0344.
- [40] 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 0021-9673.
- [41] KEENE, Alison, Linda ANDERSON a J.David PHILLIPSON. Investigation of Cinchona leaf alkaloids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1983, **260**, 123-128. ISSN 0021-9673.
- [42] SMITH, Edward. Analysis of cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography: Application to the analysis of quinidine gluconate and quinidine sulfate and their dosage forms: Application to the analysis of quinidine gluconate and quinidine sulfate and their dosage forms. *Journal of Chromatography A*. 1984, **299**, 233-244. ISSN 0021-9673.
- [43] *Agilent.com* [online]. [cit. 2021-08-19]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/datasheets/public/820302-002.pdf>
- [44] VAŇKOVÁ, Nikola, Jelle DE VOS, Eva TYTECA, Gert DESMET, Tony EDGE, Lenka ČESLOVÁ, Petr ČESLA a Sebastiaan EELTINK. Effect of gradient steepness on the kinetic performance limits and peak compression for reversed-phase gradient separations of small molecules. *Journal of Chromatography A*. 2015, **1409**, 152-158. ISSN 0021-9673.

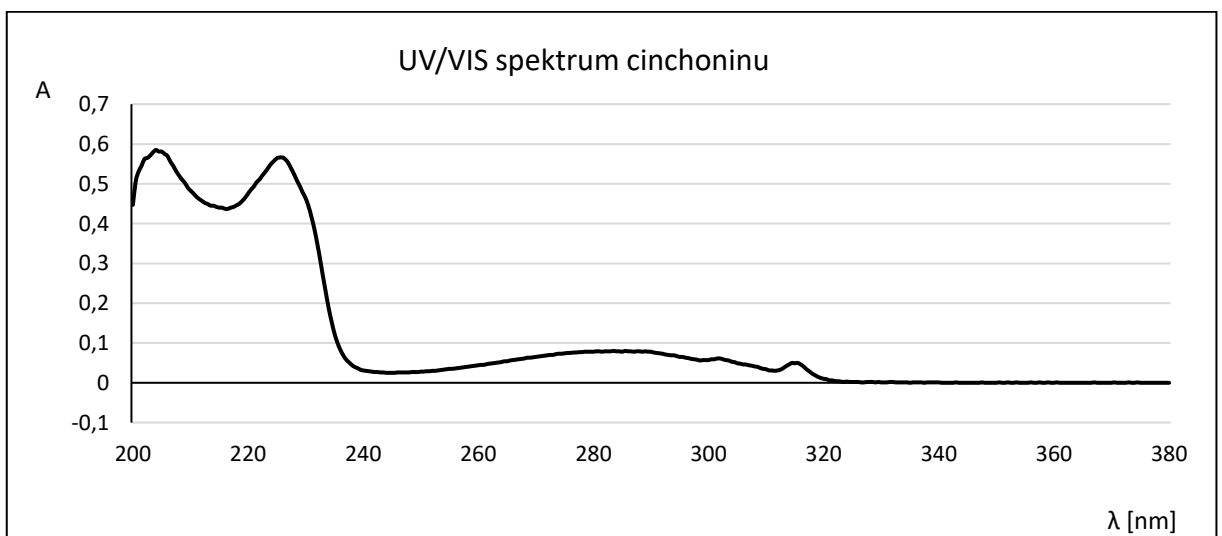
Přílohy



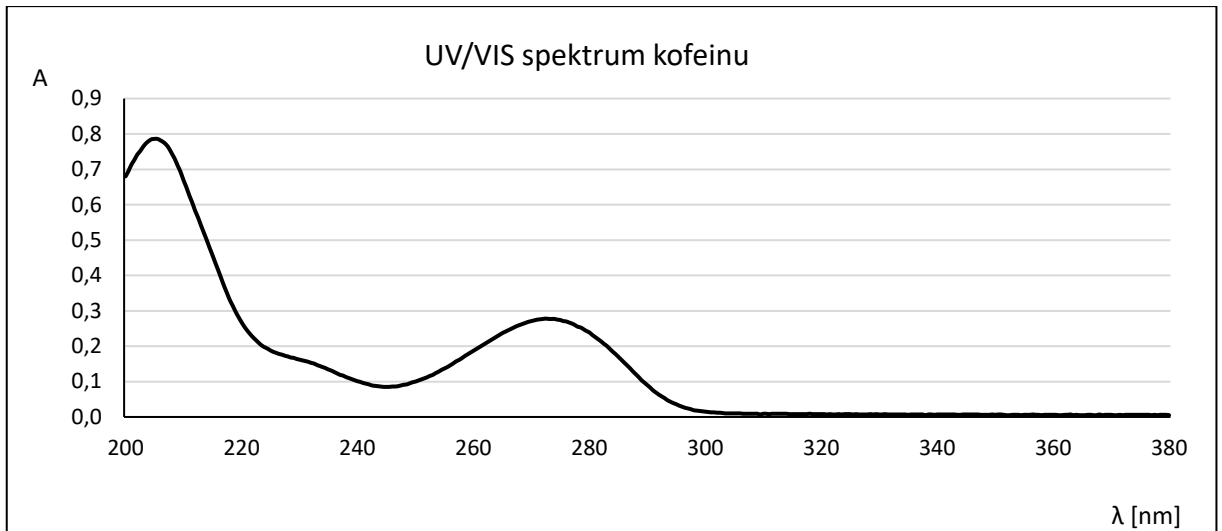
Graf P1: UV/VIS spektrum chininu



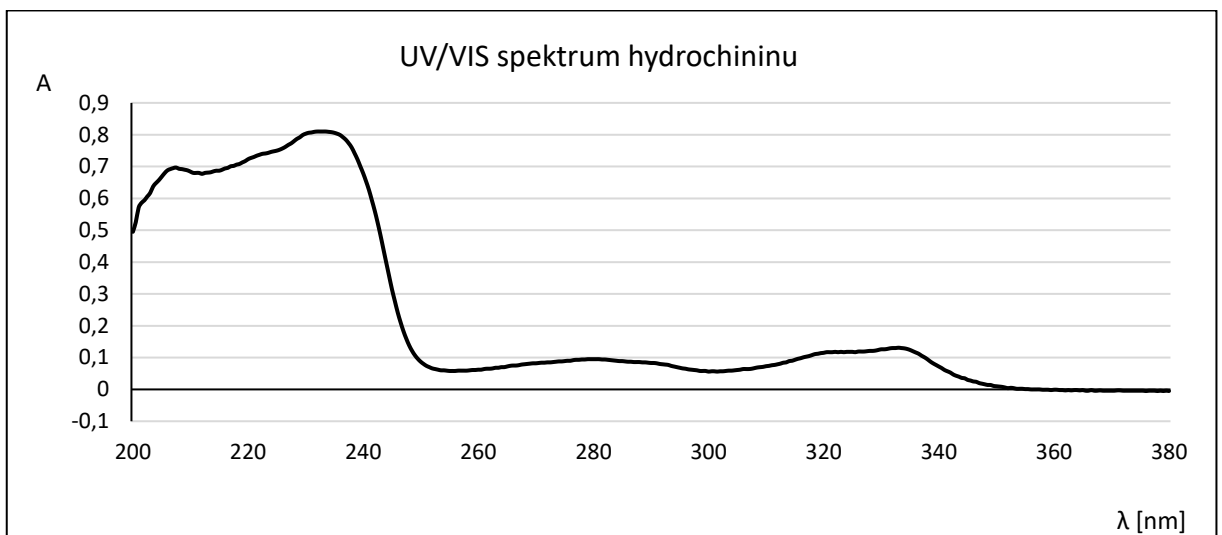
Graf P2: UV/VIS spektrum chinidinu



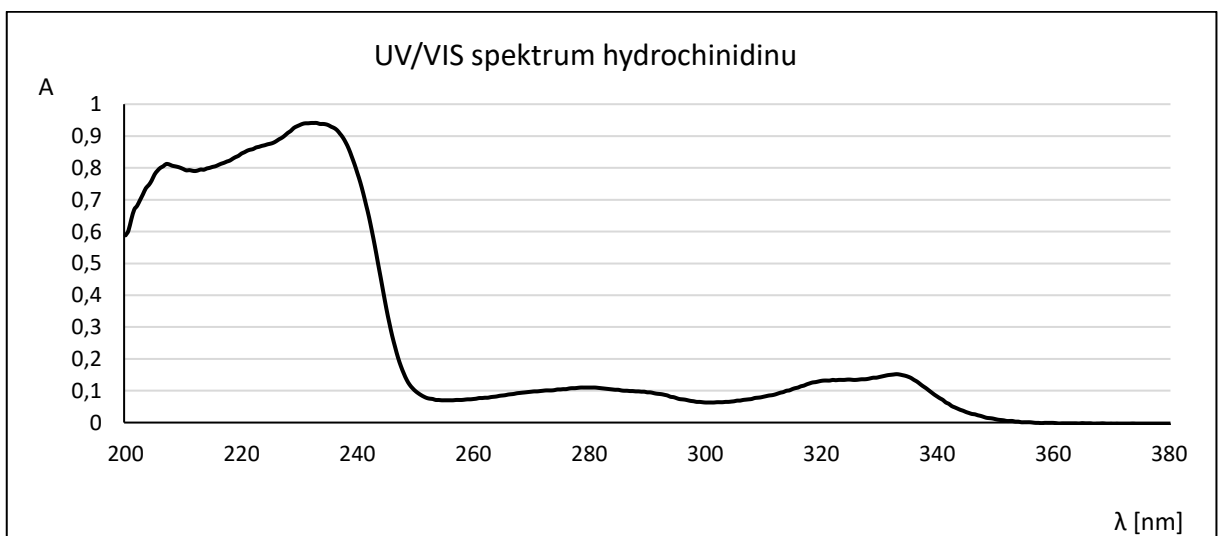
Graf P3: UV/VIS spektrum cinchoninu



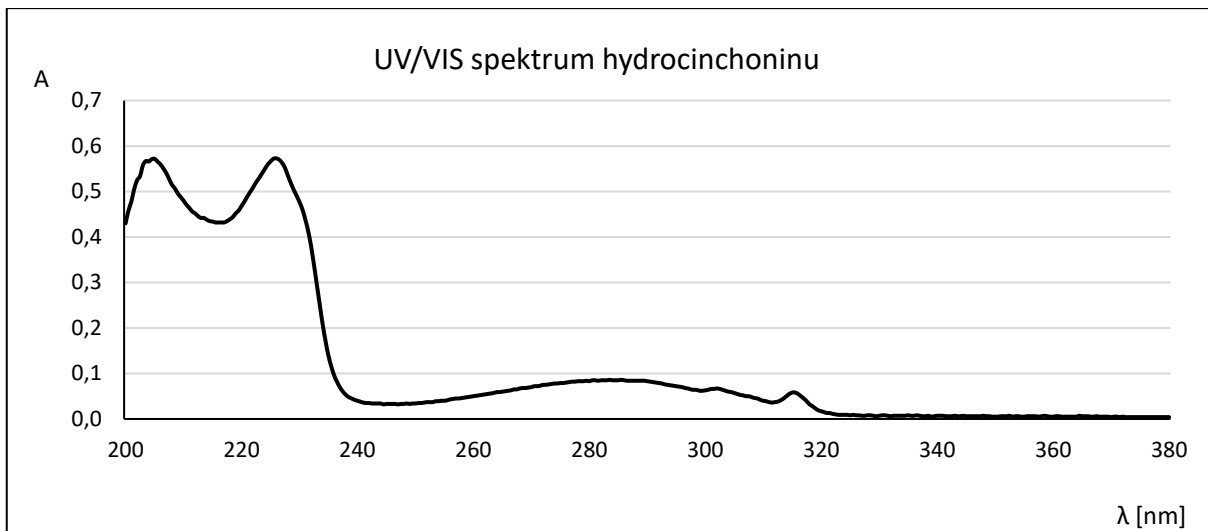
Graf P4: UV/VIS spektrum kofeinu



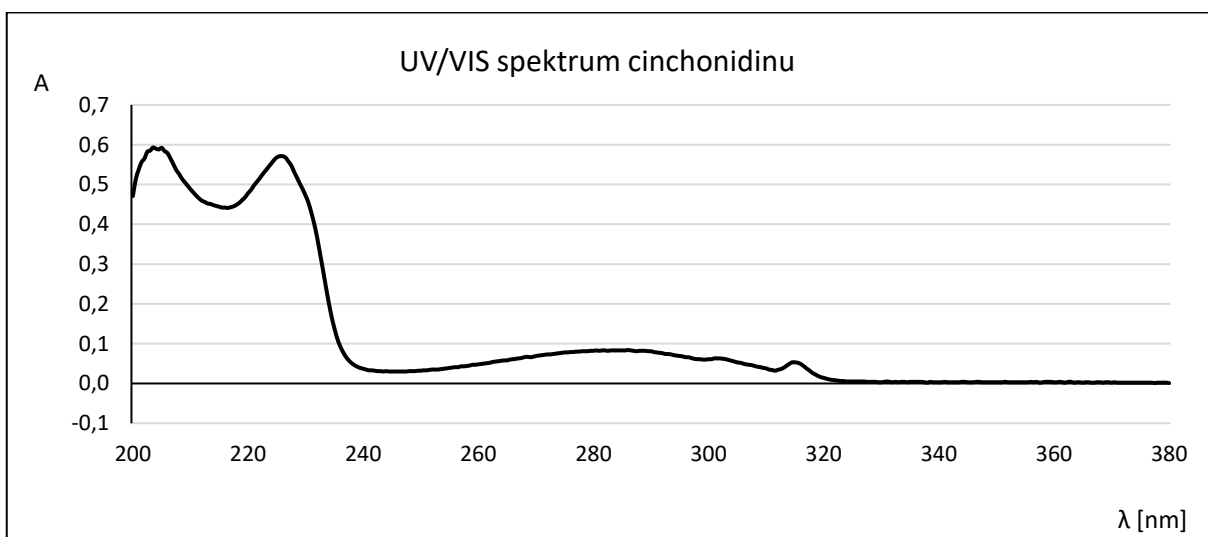
Graf P5: UV/VIS spektrum hydrochininu



Graf P6: UV/VIS spektrum hydrochinidinu



Graf P7: UV/VIS spektrum hydrocinchoninu



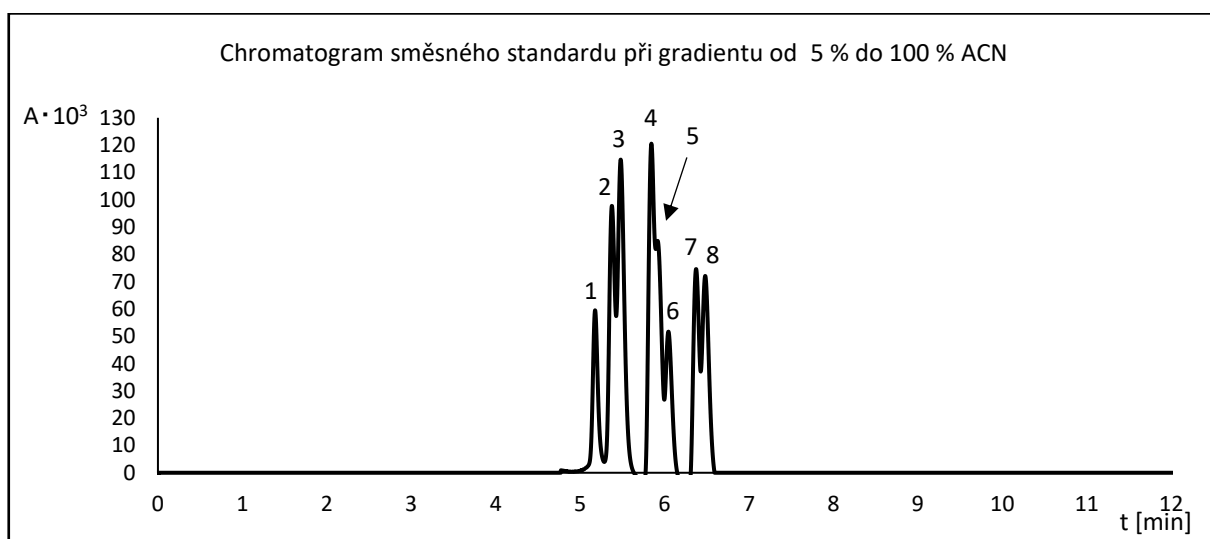
Graf P8: UV/VIS spektrum cinchonidinu

Tabulka P1: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 při profilu gradientu č. 1

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
Chinin	1,586	6,207	6,201	6,197	6,202	2,911
Chinidin		6,059	6,056	6,047	6,054	2,818
Cinchonin		5,481	5,483	5,475	5,480	2,456
Kofein		5,191	5,191	5,190	5,191	2,274
Hydrochinin		6,504	6,505	6,508	6,506	3,103
Hydrochinidin		6,395	6,394	6,385	6,391	3,031
Hydrocinchonin		5,887	5,866	5,872	5,875	2,705
Cinchonidin		5,504	5,499	5,503	5,502	2,470

Tabulka P2: Retenční charakteristika směsného standardu měřeného na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 při profilu gradientu č. 1

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	kofein	1,586	5,178	5,188	5,183	5,183	2,269
2	cinchonin		5,377	5,387	5,377	5,380	2,393
3	cinchonidin		5,481	5,490	5,480	5,484	2,459
4	hydrocinchonin		5,845	5,848	5,843	5,845	2,687
5	chinidin		5,918	5,919	5,915	5,917	2,732
6	chinin		6,046	6,048	6,042	6,045	2,813
7	hydrochinidin		6,374	6,375	6,371	6,373	3,020
8	hydrochinin		6,482	6,483	6,479	6,481	3,088



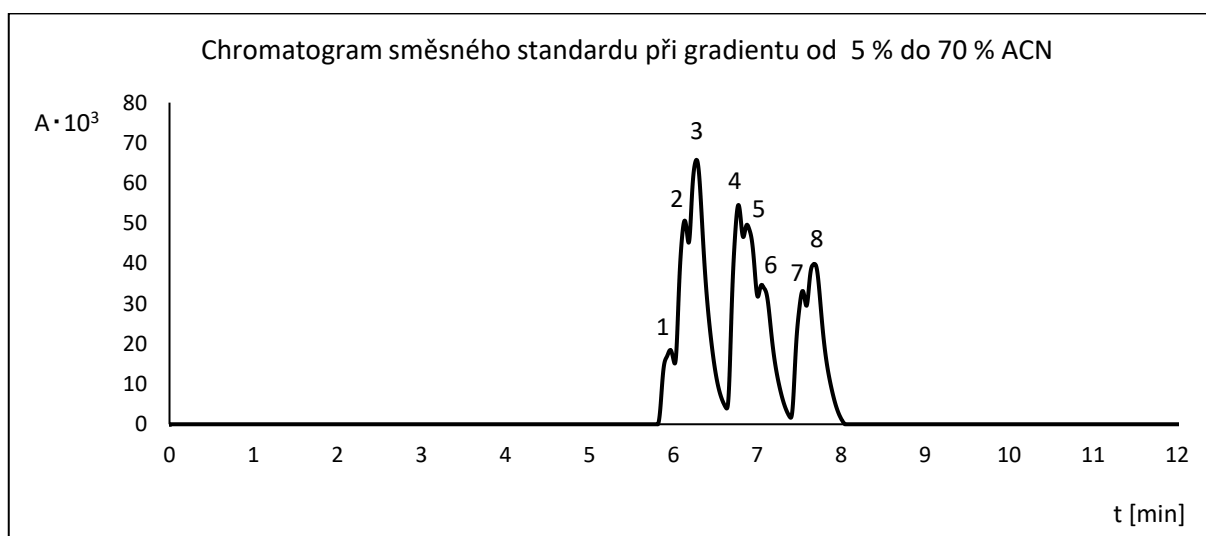
Graf P9: Chromatogram směsného standardu měřeného na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C1 při profilu gradientu č. 1; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofein; 2, cinchonin; 3, cinchonidin; 4, hydrocinchonin; 5, chinidin; 6, chinin; 7, hydrochinidin; 8, hydrochinin

Tabulka P3: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 při profilu gradientu č. 2

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,527	7,009	7,007	7,012	7,009	3,590
chinidin		6,904	6,899	6,902	6,902	3,519
cinchonin		6,086	6,04	6,087	6,071	2,975
kofein		5,908	5,906	5,912	5,909	2,869
hydrochinin		7,714	7,712	7,723	7,716	4,052
hydrochinidin		7,551	7,549	7,558	7,553	3,945
hydrocinchonin		6,792	6,784	6,791	6,789	3,445
cinchonidin		6,305	6,311	6,315	6,310	3,132

Tabulka P4: Retenční charakteristika směsného standardu měřeného na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 při profilu gradientu č. 2

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	kofein	1,527	5,965	5,963	5,966	5,965	2,905
2	cinchonin		6,137	6,317	6,141	6,198	3,058
3	cinchonidin		6,278	6,278	6,284	6,280	3,112
4	hydrocinchonin		6,777	6,779	6,788	6,781	3,440
5	chinidin		6,879	6,88	6,89	6,883	3,507
6	chinin		7,053	7,054	7,066	7,058	3,621
7	hydrochinidin		7,542	7,546	7,557	7,548	3,942
8	hydrochinin		7,684	7,691	7,699	7,691	4,036



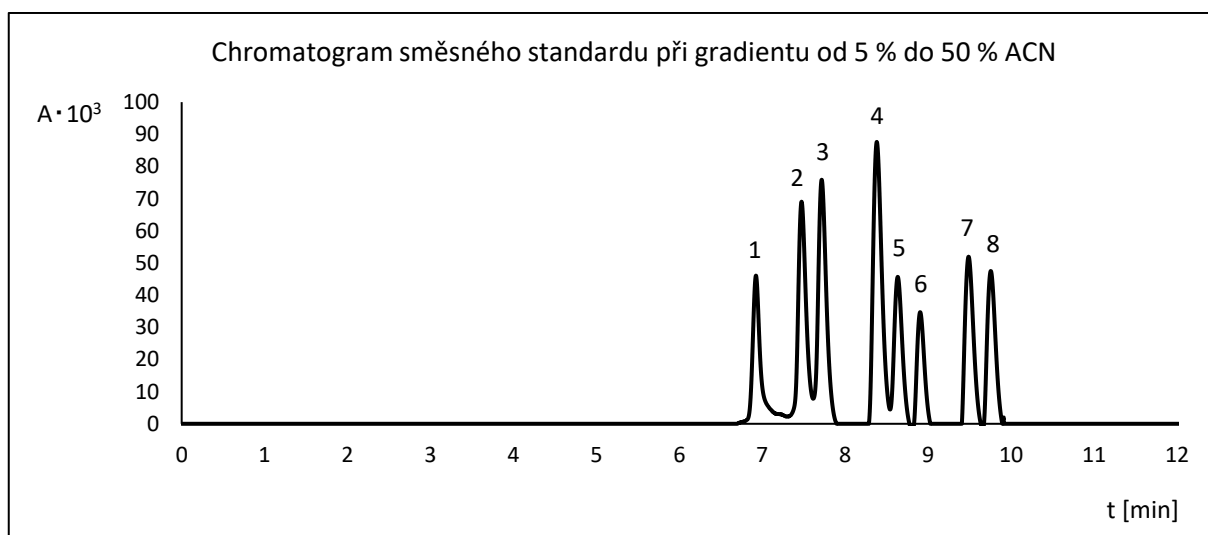
Graf P10: Chromatogram směsného standardu měřeného na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C1 při profilu gradientu č. 2; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofein; 2, cinchonin; 3, cinchonidin; 4, hydrocinchonin; 5, chinidin; 6, chinin; 7, hydrochinidin; 8, hydrochinin

Tabulka P5: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 při profilu gradientu č. 3

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,582	8,860	8,878	8,886	8,875	4,609
chinidin		8,594	8,605	8,596	8,598	4,434
cinchonin		7,466	7,465	7,469	7,467	3,719
kofoein		6,941	6,940	6,929	6,937	3,384
hydrochinin		9,767	9,777	9,780	9,775	5,178
hydrochinidin		9,511	9,502	9,509	9,507	5,009
hydrocinchonin		8,419	8,416	8,407	8,414	4,318
cinchonidin		7,747	7,744	7,747	7,746	3,896

Tabulka P6: Retenční charakteristika směsného standardu měřeného na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 při profilu gradientu č. 3

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	kofoein	1,582	6,925	6,924	6,929	6,926	3,377
2	cinchonin		7,473	7,474	7,478	7,475	3,724
3	cinchonidin		7,715	7,717	7,720	7,717	3,877
4	hydrocinchonin		8,376	8,381	8,377	8,378	4,295
5	chinidin		8,627	8,634	8,628	8,630	4,454
6	chinin		8,897	8,904	8,900	8,900	4,625
7	hydrochinidin		9,485	9,488	9,483	9,485	4,995
8	hydrochinin		9,752	9,756	9,749	9,752	5,164



Graf P11: Chromatogram směsného standardu měřeného na koloně InfinityLab Poroshell 120 SB-C1 při profilu gradientu č. 3; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofoein; 2, cinchonin; 3, cinchonidin; 4, hydrocinchonin; 5, chinidin; 6, chinin; 7, hydrochinidin; 8, hydrochinin

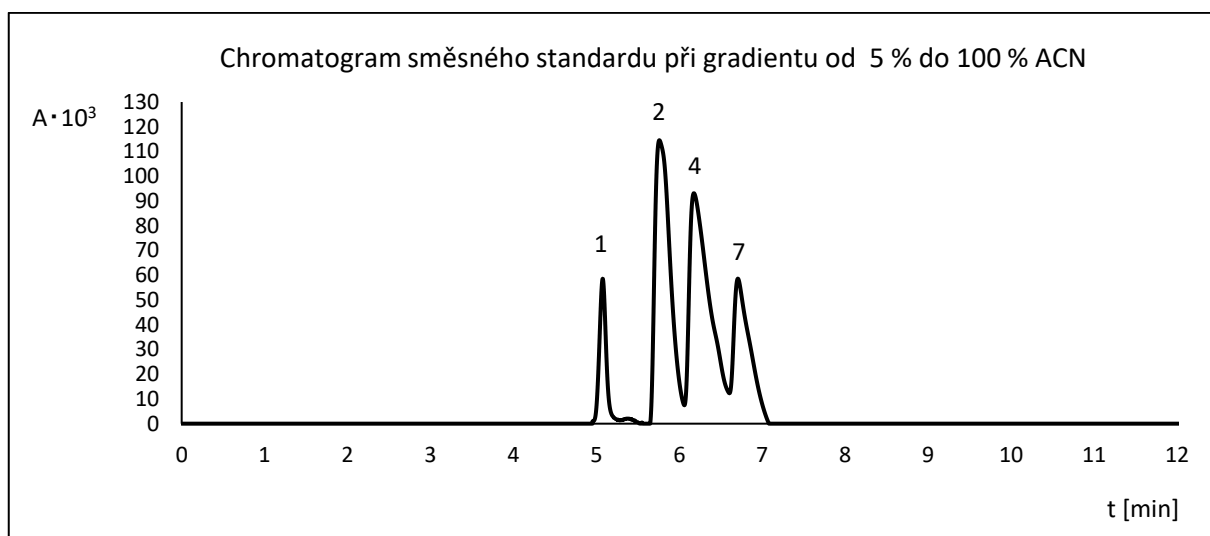
Tabulka P7: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu č. 1

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,567	6,403	6,411	6,429	6,414	3,094
chinidin		6,267	6,270	6,274	6,270	3,002
cinchonin		5,730	5,731	5,739	5,733	2,659
kofein		5,089	5,089	5,092	5,090	2,249
hydrochinin		6,846	6,850	6,852	6,849	3,372
hydrochinidin		6,741	6,740	6,745	6,742	3,303
hydrocinchonin		6,195	6,202	6,207	6,201	2,958
cinchonidin		5,861	5,862	5,862	5,862	2,741

Tabulka P8: Retenční charakteristika směsného standardu měřeného na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu č. 1

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	kofein	1,567	5,076	5,081	4,724	4,960	2,166
2	cinchonin		5,760	5,779	5,490	5,676	2,623
3	cinchonidin		nd	nd	nd	nd	nd
4	hydrocinchonin		6,176	6,196	5,944	6,105	2,897
5	chinidin		nd	nd	nd	nd	nd
6	chinin		nd	nd	nd	nd	nd
7	hydrochinidin		6,706	6,727	6,593	6,675	3,261
8	hydrochinin		nd	nd	nd	nd	nd

nd = nedetekováno



Graf P12: Chromatogram směsného standardu měřeného na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu č. 1; průtok 0,330 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofein; 2, cinchonin; 4, hydrocinchonin; 7, hydrochinidin

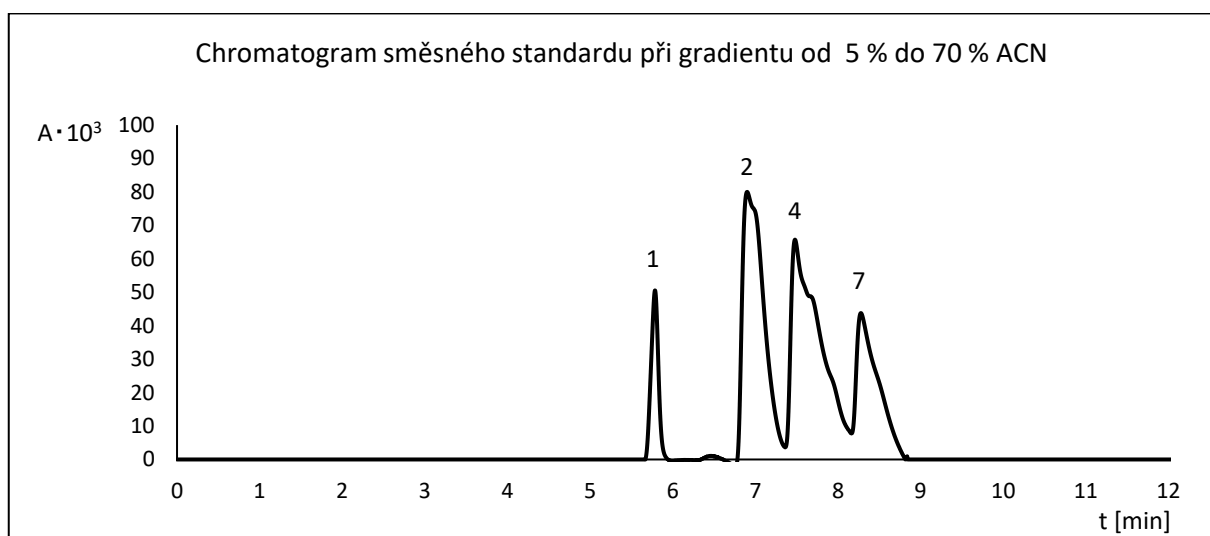
Tabulka P9: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu č. 2

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,567	7,875	7,912	7,919	7,902	4,044
chinidin		7,672	7,684	7,688	7,681	3,903
cinchonin		6,889	6,899	6,903	6,897	3,402
kofein		5,797	5,809	5,800	5,802	2,703
hydrochinin		8,494	8,495	8,500	8,496	4,423
hydrochinidin		8,331	8,339	8,336	8,335	4,320
hydrocinchonin		7,523	7,525	7,531	7,526	3,804
cinchonidin		7,047	7,047	7,048	7,047	3,498

Tabulka P10: Retenční charakteristika směsného standardu měřeného na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu č. 2

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	kofein	1,567	5,785	5,793	5,786	5,788	2,694
2	cinchonin		6,896	6,898	6,901	6,898	3,403
3	cinchonidin		nd	nd	nd	nd	nd
4	hydrocinchonin		7,466	7,470	7,481	7,472	3,769
5	chinidin		nd	nd	nd	nd	nd
6	chinin		nd	nd	nd	nd	nd
7	hydrochinidin		8,266	8,269	8,278	8,271	4,279
8	hydrochinin		nd	nd	nd	nd	nd

nd = nedetekováno



Graf P13: Chromatogram směsného standardu měřeného na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu č. 2; průtok 0,330 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofein; 2, cinchonin; 4, hydrocinchonin; 7, hydrochinidin

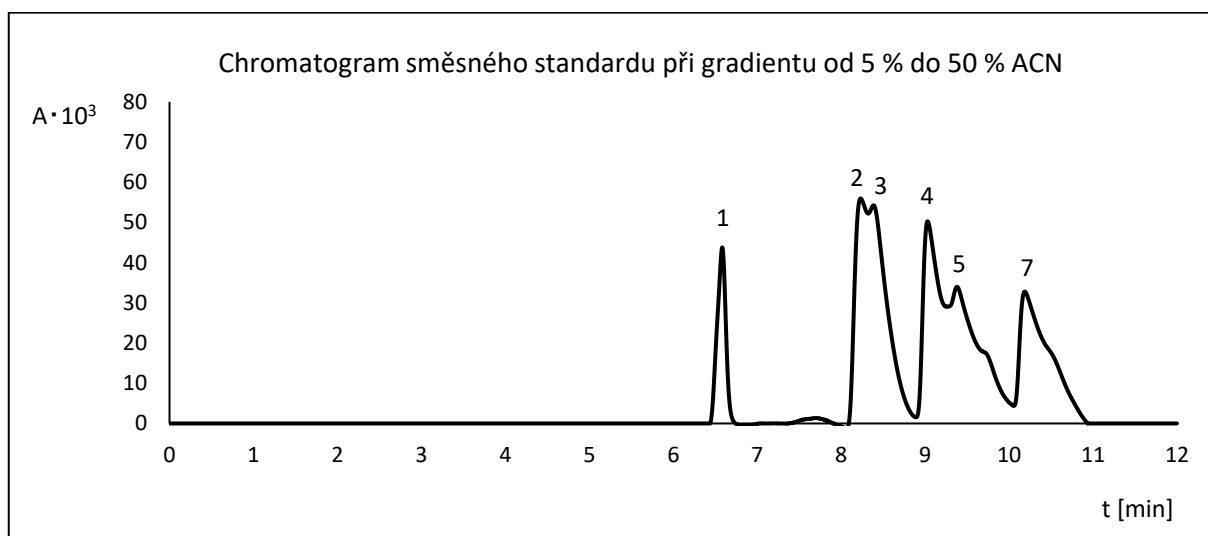
Tabulka P11: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu č. 3

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,568	9,778	9,790	9,807	9,792	5,246
chinidin		9,442	9,444	9,444	9,443	5,023
cinchonin		8,301	8,306	8,305	8,304	4,297
kofein		6,610	6,614	6,606	6,610	3,216
hydrochinin		10,567	10,568	10,583	10,573	5,744
hydrochinidin		10,317	10,317	10,328	10,321	5,583
hydrocinchonin		8,979	9,133	9,130	9,081	4,792
cinchonidin		8,473	8,480	8,469	8,474	4,405

Tabulka P12: Retenční charakteristika směsného standardu měřeného na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu č. 3

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	kofein	1,568	6,590	6,584	6,588	6,587	3,202
2	cinchonin		8,239	8,232	8,237	8,236	4,253
3	cinchonidin		8,392	8,386	8,390	8,389	4,351
4	hydrocinchonin		9,036	9,031	9,021	9,029	4,759
5	chinidin		9,386	9,381	9,360	9,376	4,980
6	chinin		nd	nd	nd	nd	nd
7	hydrochinidin		10,193	10,187	10,154	10,178	5,492
8	hydrochinin		nd	nd	nd	nd	nd

nd = nedetekováno



Graf P14: Chromatogram směsného standardu měřeného na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu č. 3; průtok 0,330 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofein; 2, cinchonin; 3, cinchonidin; 4, hydrocinchonin; 5, chinidin; 7, hydrochinidin

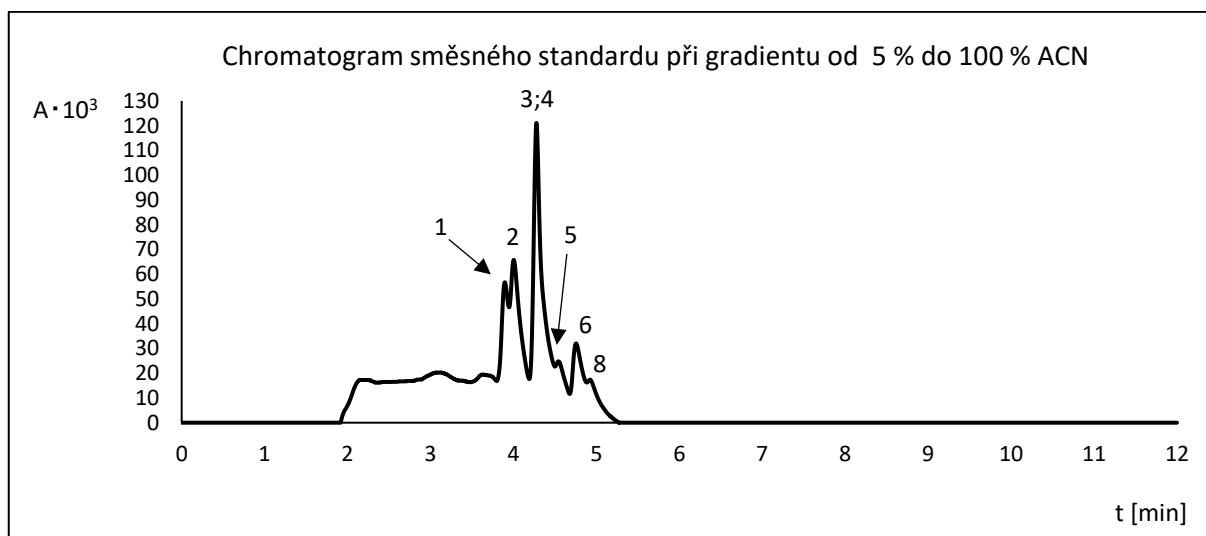
Tabulka P13: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně Kinetex EVO C18 při profilu gradientu č. 1

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,357	4,757	4,741	4,721	4,740	2,494
chinidin		4,500	4,483	4,481	4,488	2,309
cinchonin		4,006	3,993	3,985	3,995	1,945
kofein		4,270	4,286	4,287	4,281	2,156
hydrochinin		4,972	4,969	4,968	4,970	2,664
hydrochinidin		4,807	4,807	4,778	4,797	2,537
hydrocinchonin		4,340	4,340	4,336	4,339	2,198
cinchonidin		4,042	4,043	4,035	4,040	1,978

Tabulka P14: Retenční charakteristika směsného standardu měřeného na koloně Kinetex EVO C18 při profilu gradientu č. 1

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	cinchonin	1,357	3,897	3,891	3,891	3,893	1,870
2	cinchonidin		4,004	3,998	3,998	4,000	1,949
3	kofein		4,278	4,274	4,274	4,275	2,152
4	hydrocinchonin		4,543	4,54	4,54	4,541	2,348
5	chinidin		4,755	4,75	4,75	4,752	2,503
6	chinin		nd	nd	nd	nd	nd
7	hydrochinidin		4,922	4,918	4,917	4,919	2,626
8	hydrochinin						

nd = nedetekováno



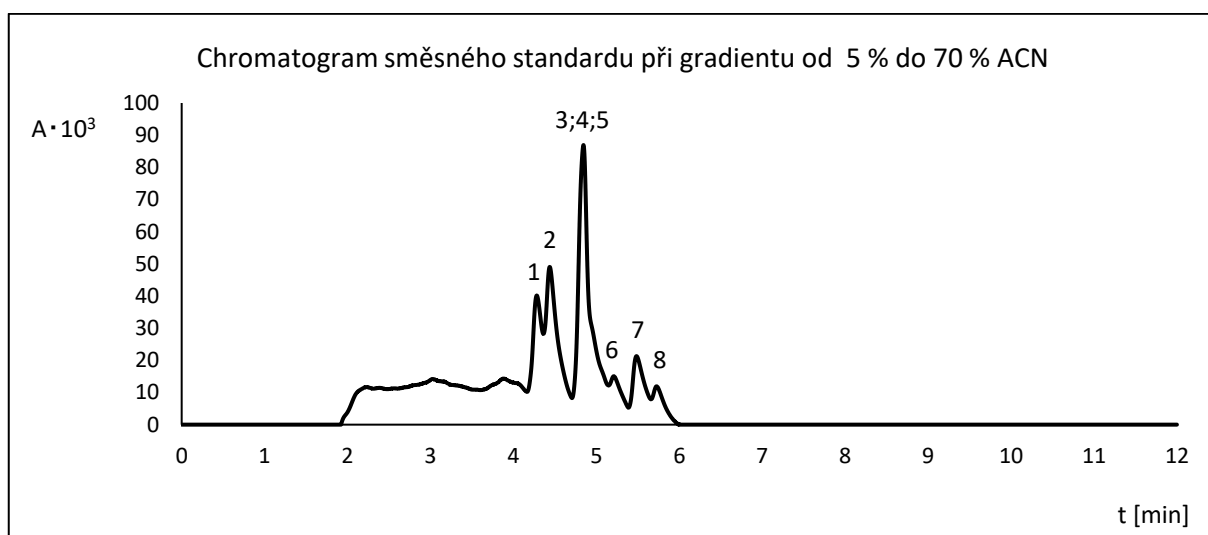
Graf P15: Chromatogram směsného standardu měřeného na koloně Kinetex EVO C18 při profilu gradientu č. 1; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, cinchonin; 2, cinchonidin; 3, kofein; 4, hydrocinchonin; 5, chinidin; 6, chinin; 8, hydrochinin

Tabulka P15: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně Kinetex EVO C18 při profilu gradientu č. 2

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,359	5,110	5,070	5,101	5,094	2,749
chinidin		4,839	4,847	4,842	4,843	2,564
cinchonin		4,200	4,205	4,204	4,203	2,093
kofein		4,861	4,853	4,849	4,854	2,573
hydrochinin		5,617	5,607	5,615	5,613	3,131
hydrochinidin		5,402	5,409	5,422	5,411	2,982
hydrocinchonin		4,789	4,800	4,802	4,797	2,530
cinchonidin		4,432	4,438	4,441	4,437	2,266

Tabulka P16: Retenční charakteristika směšného standardu měřeného na koloně Kinetex EVO C18 při profilu gradientu č. 2

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	cinchonin	1,359	4,262	4,283	4,281	4,275	2,147
2	cinchonidin		4,424	4,441	4,438	4,434	2,264
3	hydrocinchonin		4,847	4,852	4,844	4,848	2,568
4	chinidin						
5	kofein		5,187	5,210	5,210	5,202	2,829
6	chinin		5,458	5,480	5,484	5,474	3,029
7	hydrochinidin		5,702	5,722	5,726	5,717	3,207
8	hydrochinin						



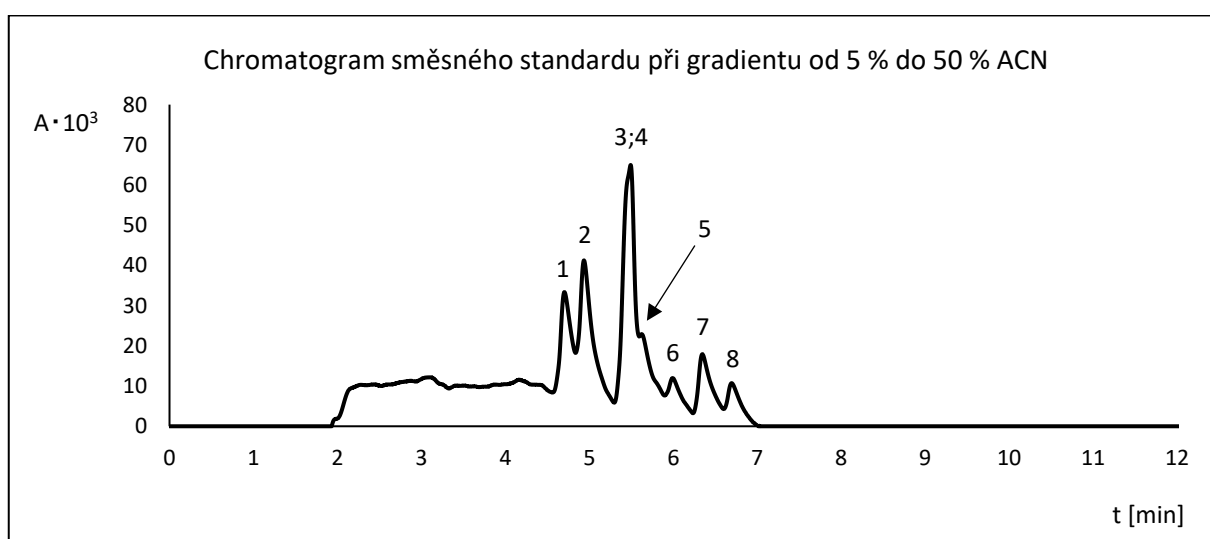
Graf P16: Chromatogram směšného standardu měřeného na koloně Kinetex EVO C18 při profilu gradientu č. 2; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, cinchonin; 2, cinchonidin; 3, hydrocinchonin; 4, chinidin; 5, kofein; 6, chinin; 7, hydrochinidin; 8, hydrochinin

Tabulka P17: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně Kinetex EVO C18 při profilu gradientu č. 3

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,362	6,029	6,040	6,022	6,030	3,428
chinidin		5,636	5,659	5,640	5,645	3,145
cinchonin		4,724	4,718	4,718	4,720	2,465
kofein		5,516	5,518	5,513	5,516	3,050
hydrochinin		6,704	6,698	6,701	6,701	3,920
hydrochinidin		6,387	6,384	6,390	6,387	3,689
hydrocinchonin		5,471	5,468	5,464	5,468	3,014
cinchonidin		4,972	4,961	4,943	4,959	2,641

Tabulka P18: Retenční charakteristika směšného standardu měřeného na koloně Kinetex EVO C18 při profilu gradientu č. 3

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	cinchonin	1,362	4,701	4,704	4,704	4,703	2,453
2	cinchonidin		4,935	4,937	4,937	4,936	2,624
3	hydrocinchonin		5,490	5,493	5,492	5,492	3,032
4	kofein		5,620	5,624	5,620	5,621	3,127
5	chinidin		5,991	5,993	5,989	5,991	3,399
6	chinin		6,345	6,347	6,345	6,346	3,659
7	hydrochinidin		6,693	6,696	6,694	6,694	3,915
8	hydrochinin						



Graf P17: Chromatogram směšného standardu měřeného na koloně Kinetex EVO C18 při profilu gradientu č. 3; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, cinchonin; 2, cinchonidin; 3, hydrocinchonin; 4, kofein; 5, chinidin; 6, chinin; 7, hydrochinidin; 8, hydrochinin

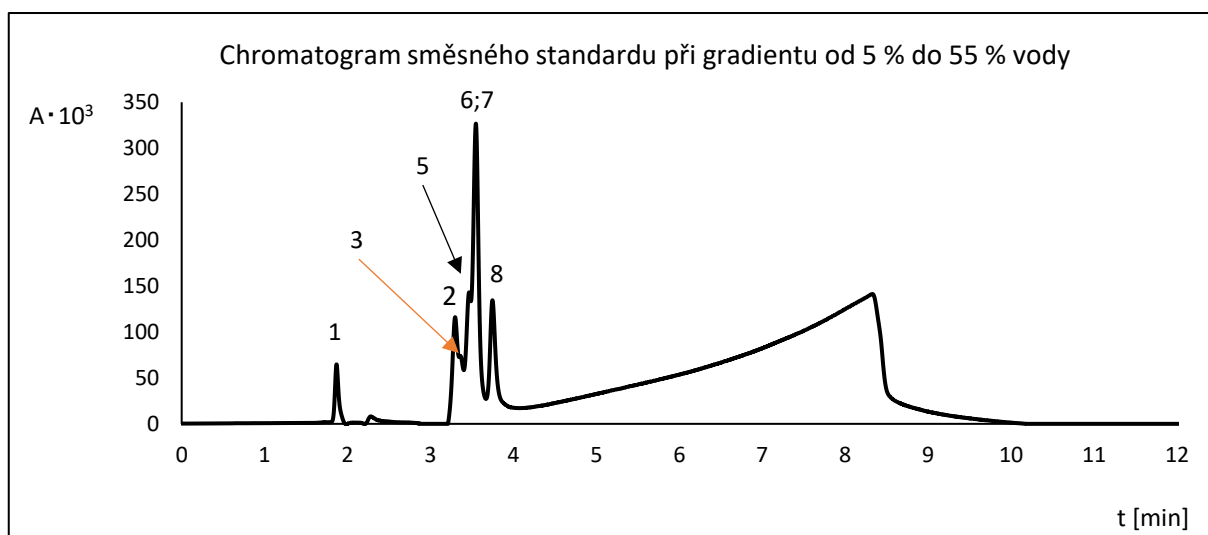
Tabulka P19: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně Luna HILIC při profilu gradientu č. 1

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,700	3,346	3,312	3,289	3,316	0,952
chinidin		3,191	3,175	3,164	3,177	0,870
cinchonin		3,463	3,458	3,459	3,460	1,037
kofein		1,871	1,868	1,869	1,869	0,101
hydrochinin		3,51	3,513	3,513	3,512	1,068
hydrochinidin		3,358	3,367	3,371	3,365	0,981
hydrocinchonin		3,726	3,726	3,729	3,727	1,194
cinchonidin		3,524	3,528	3,531	3,528	1,077

Tabulka P20: Retenční charakteristika směsného měřeného na koloně Luna HILIC při profilu gradientu č. 1

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	kofein	1,700	1,864	1,865	1,867	1,865	0,098
2	chinidin		3,277	3,284	3,297	3,286	0,935
3	chinin		3,345	3,350	3,360	3,352	0,973
4	hydrochinidin		nd	nd	nd	nd	nd
5	cinchonin		3,439	3,449	3,466	3,451	1,032
6	hydrochinin		3,530	3,536	3,547	3,538	1,083
7	cinchonidin		3,739	3,742	3,747	3,743	1,204
8	hydrocinchonin						

nd = nedetekováno



Graf P18: Chromatogram směsného standardu měřeného na koloně Luna HILIC při profilu gradientu č. 1; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofein; 2, chinidin; 3, chinin; 5, cinchonin; 6, hydrochinin; 7, cinchonidin; 8, hydrocinchonin

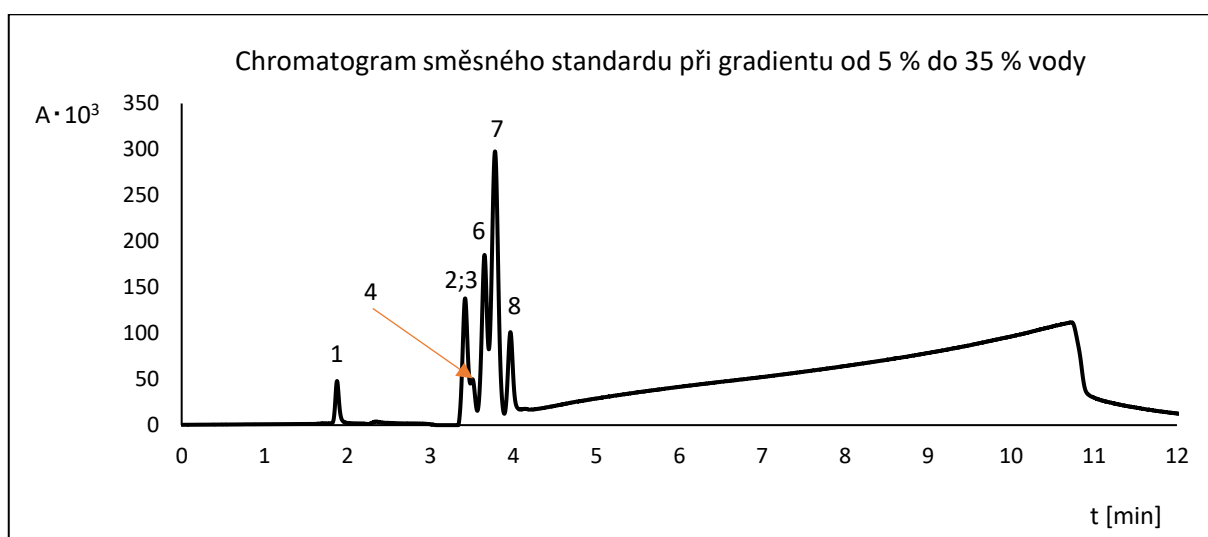
Tabulka P21: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně Luna HILIC při profilu gradientu č. 2

Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,696	3,119	3,111	3,117	3,116	0,837
chinidin		3,150	3,172	3,191	3,171	0,870
cinchonin		3,527	3,541	3,558	3,542	1,089
kofein		1,868	1,869	1,870	1,869	0,102
hydrochinin		3,650	3,668	3,692	3,670	1,164
hydrochinidin		3,560	3,573	3,583	3,572	1,106
hydrocinchonin		3,914	3,925	3,930	3,923	1,313
cinchonidin		3,754	3,767	3,772	3,764	1,220

Tabulka P22: Retenční charakteristika směsného standardu měřeného na koloně Luna HILIC při profilu gradientu č. 2

Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	kofein	1,696	1,876	1,873	1,876	1,875	0,106
2	chinin		3,418	3,417	3,428	3,421	1,017
3	chinidin		3,507	3,506	3,516	3,510	1,070
4	cinchonin						
5	hydrochinidin		nd	nd	nd	nd	nd
6	hydrochinin		3,653	3,652	3,664	3,656	1,156
7	cinchonidin		3,779	3,778	3,790	3,782	1,230
8	hydrocinchonin		3,964	3,964	3,979	3,969	1,341

nd = nedetekováno



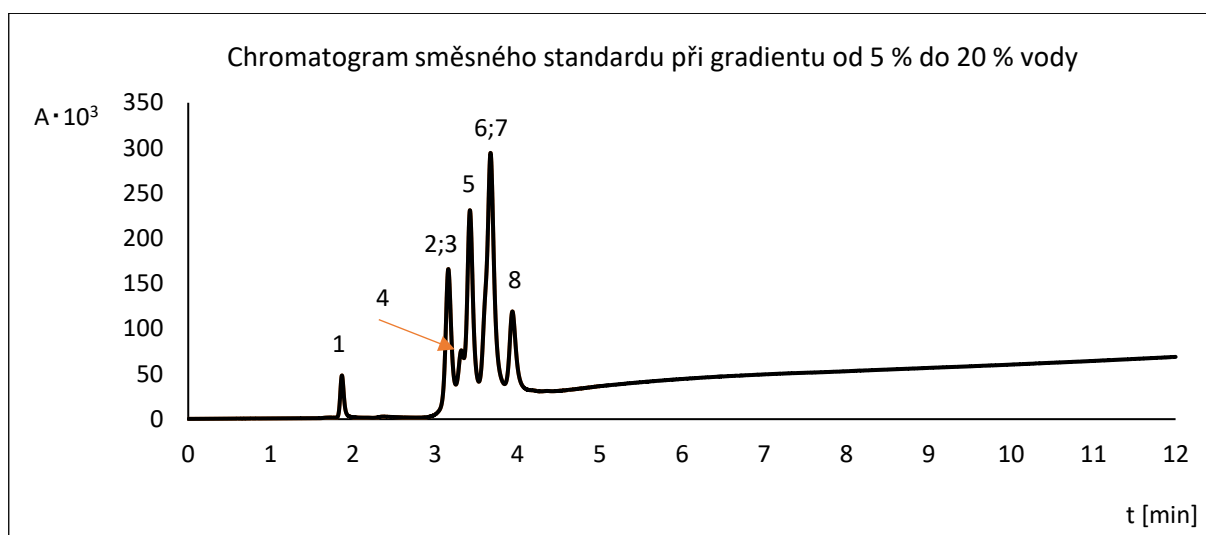
Graf P19: Chromatogram směsného standardu měřeného na koloně Luna HILIC při profilu gradientu č. 2; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofein; 2, chinin; 3, chinidin; 4, cinchonin; 6, hydrochinin; 7, cinchonidin; 8, hydrocinchonin

Tabulka P23: Retenční charakteristika standardů měřených na koloně Luna HILIC při profilu gradientu č. 3

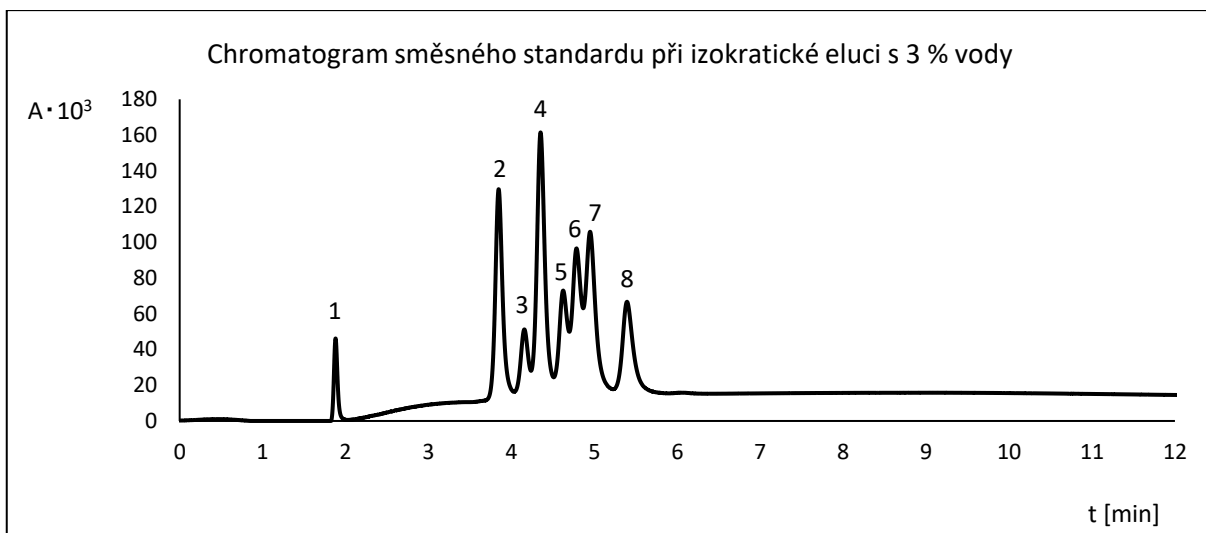
Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
chinin	1,681	2,975	2,978	3,996	3,316	0,973
chinidin		3,012	3,026	3,039	3,026	0,800
cinchonin		3,486	3,497	3,511	3,498	1,081
kofein		1,866	1,867	1,867	1,867	0,110
hydrochinin		3,617	3,624	3,632	3,624	1,156
hydrochinidin		3,392	3,394	3,401	3,396	1,020
hydrocinchonin		3,920	3,922	3,926	3,923	1,333
cinchonidin		3,668	3,666	3,668	3,667	1,181

Tabulka P24: Retenční charakteristika směšného standardu měřeného na koloně Luna HILIC při profilu gradientu č. 3

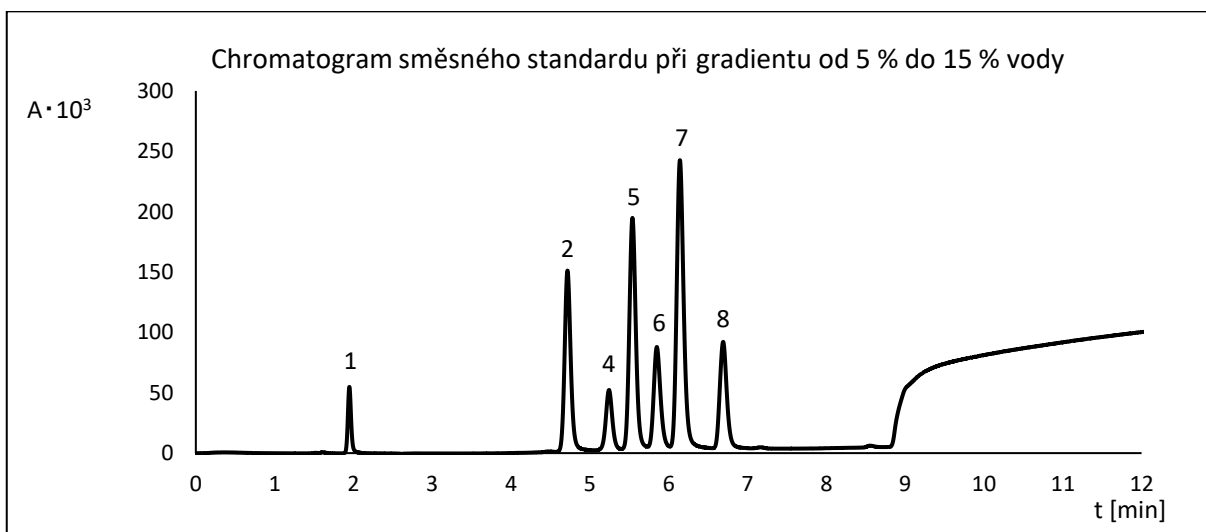
Pořadí	Standard	t_M [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	$t_{\text{průměr}}$ [min]	k'
1	kofein	1,681	1,866	1,866	1,868	1,867	0,110
2	chinin		3,152	3,156	3,161	6,156	0,877
3	chinidin		3,311	3,314	3,319	3,315	0,972
4	hydrochinidin		3,414	3,417	3,424	3,418	1,033
6	hydrochinin		3,664	3,668	3,674	3,669	1,182
7	cinchonidin		3,928	3,933	3,94	3,934	1,340
8	hydrocinchonin						



Graf P20: Chromatogram směšného standardu měřeného na koloně Luna HILIC při profilu gradientu č. 3; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofein; 2, chinin; 3, chinidin; 4, hydrochinidin; 5, cinchonin; 6, hydrochinin; 7, cinchonidin; 8, hydrocinchonin



Graf P21: Chromatogram směšného standardu měřeného na koloně Luna HILIC izokratickou elucí s 3 % vody; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofein; 2, chinidin; 3, chinin; 4, hydrochinidin; 5, cinchonin; 6, hydrochinin; 7, cinchonidin; 8, hydrocinchonin



Graf P22: Chromatogram směšného standardu měřeného na koloně Luna Omega SUGAR při profilu gradientu od 5 % do 15 % vody; průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; UV detekce při 230 nm; analyty; 1, kofein; 2, chinidin; 4, hydrochinidin; 5, cinchonin; 6, hydrochinin; 7, cinchonidin; 8, hydrocinchonin

Tabulka P25: Plochy piků kalibrační řady chininu

Koncentrace [mg/l]	A ₁	A ₂	A ₃	A _{průměr}
10	38,9	44,9	44,5	42,8
20	84,2	88,4	89,1	87,2
40	192,4	189,5	178,9	186,9
60	265,2	260,7	267,3	264,4
80	357,5	350,7	346,8	351,7

Tabulka P26: Plochy píkù chininu ve vzorcích tonikù

Vzorek	A₁	A₂	A₃	A_{průměr}
River Indian Tonic Water	158,2	146,8	145,6	150,2
Kinley Tonic Water	97,5	102,7	105,9	102,0
Schweppes Indian Tonic	184,8	180,9	174,6	180,1
Schweppes Bitter Lemon	229,1	242,1	244,8	238,7