

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**VYUŽITÍ UHPLC-HRMS PRO HODNOCENÍ DOPLŇKŮ STRAVY S OBSAHEM
GINSENOSIDŮ
DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Veronika Hlaváčová

Školitel: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití UHPLC-HRMS pro hodnocení doplňků stravy s obsahem ginsenosidů

Cílem této práce bylo vyvinout analytickou metodu pro analýzu hlavních obsahových látek doplňku stravy, ve kterém jsou zastoupeny následující rostlinné extrakty: semeno pískavice řecké seno, kořen rozchodnice růžové, kořen všehoje ženšenového a list pantaly rozkladité. K analýze byla využita ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (UHPLC-HRMS). Dalším cílem bylo určit, zda v doplňku stravy není přítomen nedeklarovaný testosteron. Měření probíhalo na přístroji ACQUITY UPLC I-Class System. K hmotnostní detekci byl využit kvadrupól ve spojení s analyzátozem doby letu SYNAPT G2-Si. Byla sbírána kontinuální data. Ke sběru dat byla využita metoda datově nezávislého skenu (DIA). Po vytvoření knihovny MS spekter očekávaných látek byly jako majoritní látky identifikovány ginsenosidy.

V prvním kroku byla optimalizována příprava vzorků doplňku stravy. Jako rozpouštědlo byla testována voda, acetonitril, methanol, ethanol a ethylacetát. V dalším kroku byla provedena optimalizace chromatografických podmínek. Bylo porovnáno 5 chromatografických kolon. Pro finální měření byla zvolena kolona Atlantis Premier BEH C18 AX. Pro nastavení hmotnostního spektrometru byly optimalizovány tyto parametry: desolvatační teplota, napětí na kapiláře, rychlost průtoku desolvatačního plynu, napětí na vstupním kuželu a kolizní energie pro DIA. Byla změřena kalibrační závislost testosteronu. Limit detekce byl 0,5 ng/ml. Testosteron nebyl ve vzorcích doplňku stravy identifikován.

Klíčová slova: ginsenosidy; testosteron; UHPLC-HRMS; doplňky stravy; vývoj metody; optimalizace

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Veronika Hlaváčová

Supervisor: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: UHPLC-HRMS in analysis of food supplements containing ginsenosides

The aim of this work was to develop an analytical method for the analysis of the main components of a dietary supplement, in which the following plant extracts are contained: fenugreek seed, roseroot root, Asian ginseng root and damiana leaf. The ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) was used. Another goal was to determine whether prohibited testosterone is present in the dietary supplement. Measurements were carried out with ACQUITY UPLC I-Class System. A quadrupole time-of-flight mass analyzer SYNAPT G2-Si was used for mass spectrometric detection. Continuous data were collected. The data independent acquisition method (DIA) was used to collect data. The library of MS spectra of potentially predicted substances was created and ginsenosides were identified as major compounds.

In the first step, the preparation of food supplement samples was optimized. Water, acetonitrile, methanol, ethanol and ethyl acetate were tested as solvents. In the next step, the chromatographic conditions were optimized. 5 chromatography columns were compared. The Atlantis Premier BEH C18 AX column was selected for the final measurements. The following parameters were optimized for the MS setup: desolvation temperature, capillary voltage, desolvation gas flow rate, cone voltage, and collision energy for DIA. The calibration curve of testosterone was measured. The limit of detection was 0.5 ng/ml. Testosterone has not been identified in the dietary supplement samples.

Keywords: ginsenosides; testosterone; UHPLC-HRMS; dietary supplements; method development; optimization

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 1. 9. 2023

.....

Veronika Hlaváčková

Chtěla bych tímto poděkovat prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za její odborné vedení, trpělivost a cenné rady. Dále děkuji ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie za vstřícnost a ochotu a Bc. Kateřině Pražákové za milou spolupráci na experimentech. Poděkování patří také mé rodině za podporu během celého studia.

OBSAH

ABSTRAKT.....	2
ABSTRACT.....	3
OBSAH.....	6
SEZNAM ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD.....	10
2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE.....	11
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	12
3.1 ULTRA-VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE.....	12
3.1.1 Stacionární fáze pro UHPLC.....	13
3.1.2 Možné budoucí trendy v UHPLC.....	15
3.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	16
3.2.1 Iontový zdroj.....	16
3.2.2 Hmotnostní analyzátoři.....	17
3.2.3 Detektor.....	18
3.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	18
3.2.5 Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením.....	19
3.2.6 Pokročilé metody sběru MS/MS dat.....	19
3.2.7 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.....	20
3.3 GINSENO SIDY.....	21
3.3.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti.....	21
3.3.2 Publikované analytické metody pro stanovení ginsenosidů v produktech s obsahem ženšenu.....	26
3.4 DOPLŇKY STRAVY A JEJICH REGULACE.....	31
3.5 TESTOSTERON.....	32
3.5.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti.....	32
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	34
4.2 POUŽITÉ POMŮCKY.....	34
4.3 POUŽITÉ STACIONÁRNÍ FÁZE.....	34
4.4 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	35
4.5 PRACOVNÍ POSTUP.....	37
4.5.1 Příprava zásobních roztoků standardů.....	37

4.5.2	Příprava pracovních roztoků standardů	37
4.5.3	Příprava směsí standardů	37
4.5.4	Příprava roztoků testosteronu pro měření kalibrační křivky.....	37
4.5.5	Příprava mobilní fáze	37
4.5.6	Příprava oplachových kapalin	38
4.5.7	Příprava kalibrantů HRMS.....	38
4.5.8	Příprava vzorků kapslí	39
4.5.9	Příprava vzorků kapslí s přidaným testosteronem	39
4.6	VÝVOJ UHPLC-HRMS METODY	40
4.6.1	Výchozí chromatografické podmínky	40
4.6.2	Finální chromatografické podmínky	41
4.6.3	Porovnání stacionárních fází.....	42
4.6.4	Podmínky HRMS	42
5.	VÝSLEDKY A DISKUSE	43
5.1	VYTVORENÍ KNIHOVNY SPEKTER OČEKÁVANÝCH LÁTEK.....	43
5.2	OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY VZORKU	50
5.3	OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK.....	56
5.3.1	Optimalizace nastavení gradientové eluce.....	57
5.3.2	Porovnání stacionárních fází.....	59
5.3.3	Finální chromatografické podmínky	60
5.4	OPTIMALIZACE MS PODMÍNEK	63
5.4.1	Optimalizace nastavení iontového zdroje	63
5.4.2	Optimalizace kolizní energie	66
5.5	HODNOCENÍ OBSAHOVÝCH LÁTEK DOPLŇKU STRAVY	71
5.6	HODNOCENÍ ADULTERACE DOPLŇKU STRAVY	73
5.6.1	Kalibrační závislost testosteronu	73
5.6.2	Měření vzorků kapslí s přidaným testosteronem.....	74
6.	ZÁVĚR.....	79
7.	POUŽITÉ LITERÁRNÍ ZDROJE	81
8.	PŘÍLOHY	88
8.1	NAMĚŘENÁ MS A MS/MS SPEKTRA GINSENOSEDŮ	88

SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BEH	hybridní stacionární fáze s ethylenovými můstky
CI	chemická ionizace
DDA	metoda datově závislého skenu
DIA	metoda datově nezávislého skenu
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
EtAc	ethylacetát
FA	kyselina mravenčí
GC	plynová chromatografie
H	výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
log P	rozdělovací koeficient látky v systému oktanol-voda
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmotnosti a náboje
pKa	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
PFP	pentafluorfenyl
Q	kvadrupól

QqQ	trojitý kvadрупól
Q-TOF	kvadрупól ve spojení s analyzátorem doby letu
RSD	relativní směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
SZPI	Státní zemědělská a potravinářská inspekce
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	spektrofotometrický detektor

1. ÚVOD

Doplňky stravy, jak už z názvu vyplývá, by měly pouze doplňovat běžnou stravu. Jsou řazeny mezi potraviny a obsahují ve větším množství vitaminy, minerály nebo jiné látky. Slouží k podpoře našeho zdraví a nejsou určeny k léčbě nebo k prevenci. V České republice nemá výrobce doplňků stravy povinnost ověřovat jejich účinnost, jako je tomu u léčivých přípravků. Stačí pouze oznámit uvedení na trh Ministerstvu zemědělství zasláním textu české etikety. Omezen není ani prodej doplňků stravy. Mohou být zakoupeny například v lékárnách, supermarketech, drogeriích nebo v internetových obchodech. Nikým ale není ověřováno, co a v jakém množství ve skutečnosti obsahují.

Kromě vitaminů a minerálních látek obsahují doplňky stravy často také části léčivých rostlin. Mezi jednu z nejvýznamnějších léčivých rostlin patří všehož ženšenový (*Panax ginseng*). Působí jako adaptogen a pozitivně ovlivňuje nervovou soustavu, srdce i imunitní systém. Využívá se zejména jeho kořen, jehož hlavními účinnými látkami jsou ginsenosidy. Jsou to triterpenické saponiny, které mají shodnou základní strukturu a liší se různými obměnami třech substituentů. Jedná se často o izomery, ať už strukturní nebo stereoizomery.

Jednou z možností, jak analyzovat izomerní látky, je využití kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). V kapalinovém chromatografu dojde k separaci analyzovaných látek, která umožní jejich následnou identifikaci v hmotnostním spektrometru. Kombinace těchto technik představuje citlivou a selektivní metodu, která je dnes již rutinně využívána. Vhodná je také pro analýzu komplexních směsí látek.

2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout analytickou metodu pro analýzu hlavních obsahových látek doplňku stravy, ve kterém jsou zastoupeny následující rostlinné extrakty: semeno pískavice řecké seno, kořen rozchodnice růžové, kořen všehoje ženšenového a list pantaly rozkladité. K analýze byla využita ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (UHPLC-HRMS). Doplněk stravy je určen ke zvýšení hladiny testosteronu. Dalším cílem bylo proto určit, zda v doplňku stravy není přítomen nedeklarovaný testosteron.

První krok spočíval v provedení rešerše literatury. Bylo nutné vyhledat obsahové látky daných rostlinných extraktů a zjistit o nich co možná nejvíce informací s ohledem na jejich strukturu a fyzikálně-chemické vlastnosti. Dílčím cílem bylo vytvoření knihovny MS spekter očekávaných látek.

Bylo třeba zvolit vhodnou přípravu vzorků doplňku stravy. Cílem v rámci optimalizace chromatografických podmínek bylo vyzkoušet různé nastavení gradientové eluce a porovnat několik chromatografických kolon.

Pro nastavení hmotnostního spektrometru bylo cílem optimalizovat tyto parametry: desolvatační teplotu, napětí na kapiláře, rychlost průtoku desolvatačního plynu, napětí na vstupním kuželu a kolizní energii.

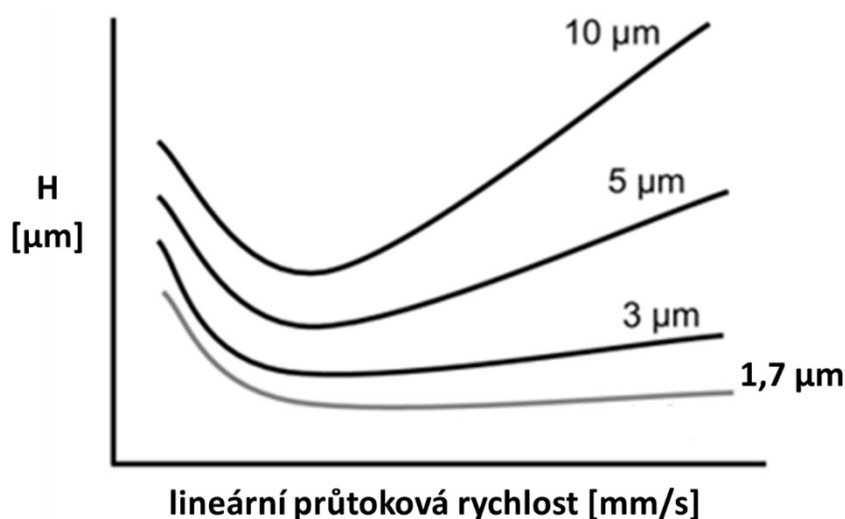
Dalším cílem bylo změřit kalibrační závislost testosteronu a zjistit limit detekce. Byly připraveny vzorky doplňku stravy s přídavkem testosteronu, ve kterých byla stanovena koncentrace testosteronu. Pro porovnání byly připraveny také vzorky doplňku stravy bez přídavku testosteronu. Dílčím cílem bylo posouzení adulterace daného doplňku stravy.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ULTRA-VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) je modifikací vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), a patří proto také mezi chromatografické separační metody. K separaci směsi analytů dochází v chromatografické koloně na základě rozdílných interakcí mezi stacionární (SF) a mobilní fází (MF) [1,2].

UHPLC využívá částice menší než 2 μm . Podstata jejich využití je patrná z van Deemterových křivek (Obrázek 1), které znázorňují závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární průtokové rychlosti u částic o různých průměrech. Se snižujícím se průměrem částic se snižuje H , a tedy zvyšuje účinnost separace. Menší částice zároveň umožňují použití vyšších lineárních průtokových rychlostí bez výraznější ztráty účinnosti, a tím urychlí analýzy. Mezi další výhody UHPLC metody patří vysoké rozlišení, menší spotřeba rozpouštědel a vzorků a zvýšení citlivosti [3–6].



Obrázek 1: Van Deemterovy křivky pro částice o velikosti 10, 5, 3 a 1,7 μm . Upraveno dle [7].

K zachování dostatečné chromatografické účinnosti je třeba minimalizovat mimokolonové objemy, a to zejména při použití kratších kolon s menším vnitřním průměrem. Mimokolonové objemy způsobují nechtěné rozšiřování chromatografických píků a mohou vznikat kdekoliv mezi dávkovačem vzorku a detektorem. Nejčastěji pocházejí z mrtvého objemu dávkovací smyčky, průtokové detekční cely a spojovacích kapilár [1,8,9].

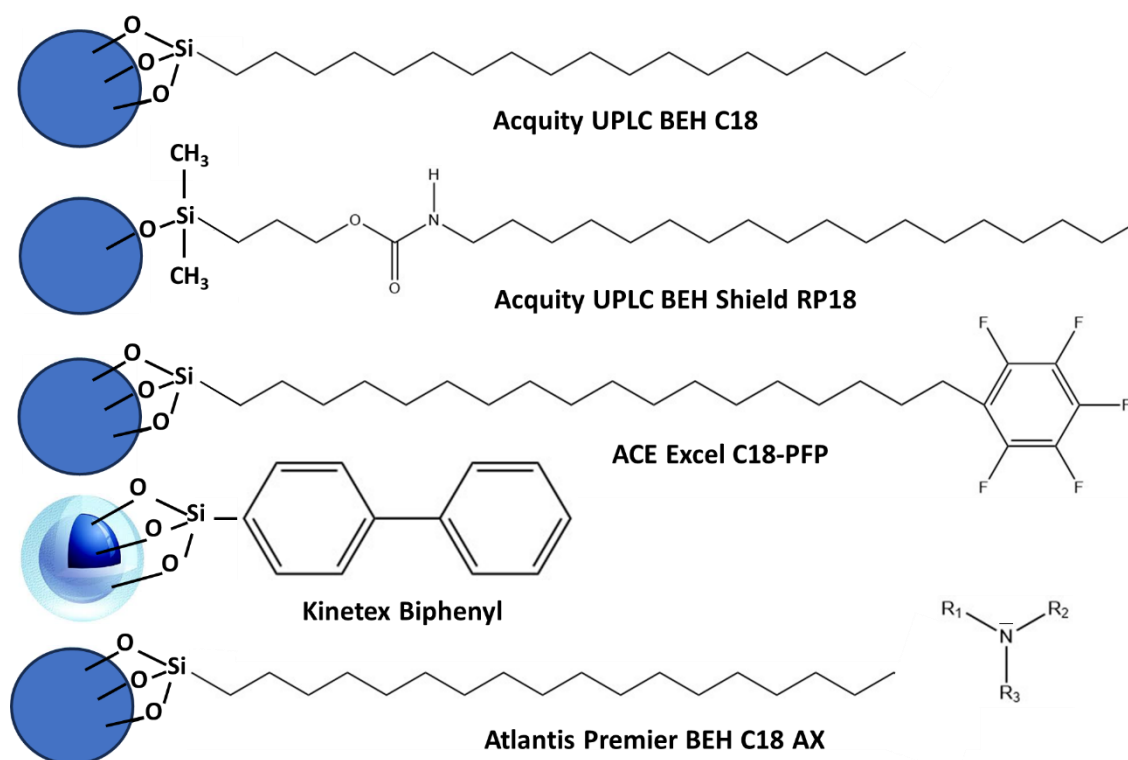
Menší částice způsobují výrazně vyšší zpětný tlak. Ten je při konstantní délce kolony a za optimální průtokové rychlosti nepřímo úměrný třetí mocnině velikosti částic. Zmenšení velikosti částic na třetinu, tak povede ke zpětnému tlaku, který je 27krát vyšší. UHPLC proto musí pracovat se specializovaným systémem, který je schopen fungovat za vysokých tlaků (až nad 100 MPa) [4].

3.1.1 Stacionární fáze pro UHPLC

Z důvodu separace za vysokých tlaků musí být stacionární fáze používané v UHPLC dostatečně stabilní. V současné době jsou nejčastěji využívány stacionární fáze na bázi silikagelu a fáze hybridní. Právě druhé zmíněné byly použity v prvním UHPLC systému vyrobeném pro komerční využití. Jednalo se o kolonu firmy Waters s technologií BEH (bridged-ethylene hybrid), která využívá ethylenové můstky vložené do matrice silikagelu. Tyto fáze disponují výbornou chemickou a mechanickou stabilitou. Při jejich použití dochází také k omezení chvostování píků bazických látek v důsledku sníženého množství volných silanolových skupin [9–11].

Za účelem změny selektivity separace je využíváno široké množství různých chemických modifikací stacionárních fází. Pro nejpoužívanější chromatografický mód, tedy chromatografii na reverzních fázích, se může jednat o modifikace jako C8, C18, fenyl nebo pentafluorfenyl (PFP), popřípadě jejich kombinace (např. C18–PFP). Další možnost představuje pozměněná C18 fáze, která vzniká vložením polární funkční skupiny (např. karbamátové nebo amidové) do uhlovodíkového řetězce. To přináší výhody ve formě odlišné selektivity, vyšší stability při použití až čistě vodných mobilních fází, nižšího množství volných silanolových skupin a zlepšeného tvaru píků bazických analytů [9,11,12].

Kolona Atlantis Premier BEH C18 AX použitá v této diplomové práci obsahuje C18 fázi, ale zároveň také terciární alkylaminové skupiny. Jedná se o tzv. vícemodální stacionární fázi, protože využívá více než jeden mechanismus separace, a tím více chromatografických interakcí. Typická je kombinace chromatografie na reverzních fázích a současně silného nebo slabého aneksu, kdy dochází k interakcím hydrofobním a elektrostatickým. Vícemodální chromatografie je vhodná zejména pro analýzu polárních látek, které nejsou při chromatografii na reverzních fázích zadržovány. Své využití najde ale také při analýze komplexních směsí látek různé povahy nebo tam, kde je potřeba odlišná selektivita ve srovnání s C18 fázemi. Přehled SF použitých v této diplomové práci je zobrazen na Obrázku 2 [13–17].



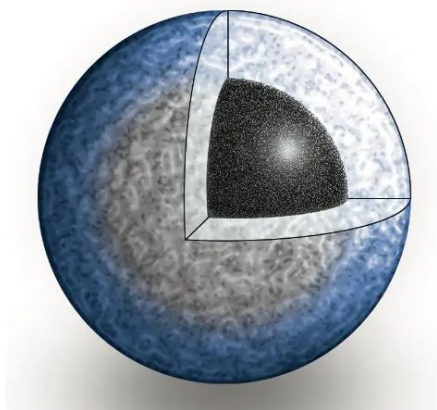
Obrázek 2: Schematické znázornění chemických modifikací stacionárních fází použitých v této diplomové práci. Vytvořeno podle [14,18] a [19].

3.1.2 Možné budoucí trendy v UHPLC

Technika UHPLC se neustále rozvíjí a hledají se nová technická řešení k jejímu vylepšení. Patří mezi ně využití povrchově porézních částic o velikosti pod 2 μm , zvýšení tlaku nad 140 MPa, zvýšení teploty mobilní fáze nad 60 °C a snížení velikosti částic pod 1,5 μm nebo zmenšení velikosti jejich distribuce [20,21].

3.1.2.1 Povrchově porézní částice v UHPLC

Povrchově porézní částice tvoří pevné neporézní jádro a povrchová porézní vrstva (Obrázek 3), ve které probíhá separace. Pevné jádro tak nepřispívá k podélné difuzi (člen B van Deemterovy rovnice) a umožňuje menší rozšiřování chromatografických píků. To jednak kvůli vyšší tepelné vodivosti jádra a také z důvodu omezení difuzních procesů. Povrchově porézní částice navíc zlepšují díky vyšší homogenitě proces plnění kolony, což vede ke snížení procesu vířivé difuze (člen A van Deemterovy rovnice). Zvyšují také její permeabilitu, což umožňuje využití vyšších průtokových rychlostí za nižších tlaků [21,22].



Obrázek 3: Zobrazení vrstev povrchově porézní částice. Převzato z [23].

Při použití kolony naplněné povrchově porézními částicemi bylo experimentálně prokázáno zvýšení chromatografické účinnosti o 30–50 % oproti koloně se stejnou velikostí částic, ale s částicemi plně porézními. Pokud se vezme v úvahu permeabilita kolony a horní tlakový limit UHPLC systému, jeví se jako nejvhodnější pro použití se současnou UHPLC instrumentací povrchově porézní částice o velikosti 1,6 μm s kolonou o délce 50 mm a s vnitřním průměrem 2,1 mm. Částice o velikosti

1,3 μm sice slibují vyšší účinnost, generují ale zpětný tlak, který může být až více než dvojnásobný [20,21].

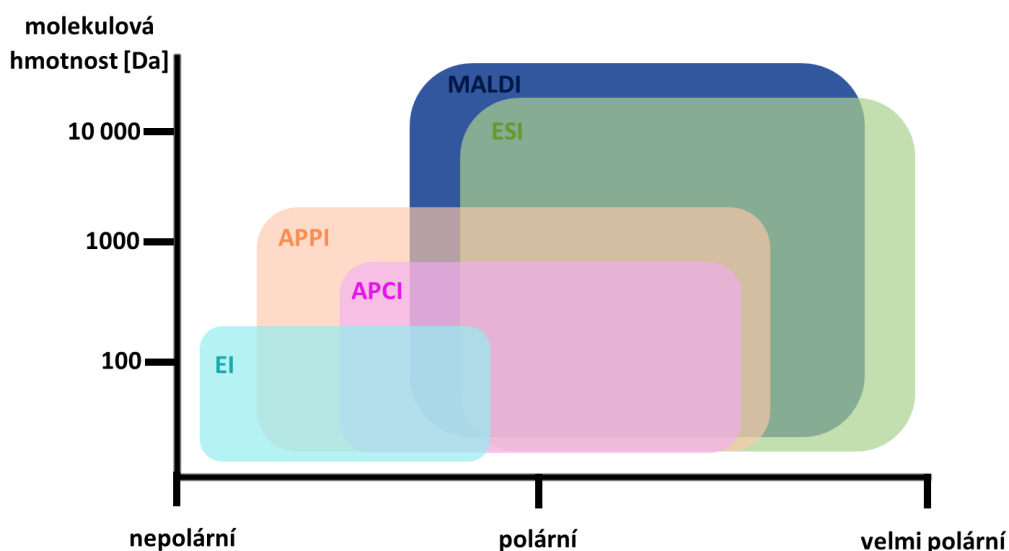
3.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, jejímž principem je převedení neutrálních molekul na ionty a následně separace iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Celý proces analýzy pomocí hmotnostního spektrometru lze rozdělit na tři základní kroky – ionizace, separace podle m/z a detekce. Ty probíhají postupně v iontovém zdroji, v hmotnostním analyzátoru a v detektoru. Výstupem je pak hmotnostní spektrum, které zobrazuje intenzitu signálů na ose y a poměry hmotnosti a náboje na ose x [24–26].

3.2.1 Iontový zdroj

V iontovém zdroji dochází k převedení neutrálních molekul na ionty, a to za vakua nebo za atmosférického tlaku. V současné době je k dispozici široké množství ionizačních technik a každá má své výhody i nevýhody. Volba typu ionizace může významně ovlivnit hmotnostně spektrometrickou analýzu. Při výběru ionizační techniky se proto bere ohled na strukturu analytu, jeho vlastnosti (Obrázek 4), charakter vzorku a důležitý je také cíl analýzy a dostupné vybavení dané laboratoře [25,27,28].

Podle množství dodané energie lze ionizační techniky rozdělit na tvrdé a měkké. Při použití tvrdých ionizačních technik, jako například elektronové ionizace (EI), dochází k rozsáhlé fragmentaci. Jejich nevýhodou může být v některých případech nepřítomnost molekulárního iontu. Při měkkých ionizačních technikách molekula získá energii méně, proto dochází k fragmentaci v menší míře a molekulární pík je přítomen. Tyto techniky podávají méně strukturálních informací. Mezi jejich zástupce patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) nebo matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI) [26,29].



Obrázek 4: Možnosti využití různých ionizačních technik v závislosti na molekulové hmotnosti a polaritě analytu. Upraveno podle [30] a [31].

3.2.2 Hmotnostní analyzátoary

Ionty vzniklé v iontovém zdroji jsou přivedeny do hmotnostního analyzátoary, kde dochází k jejich rozdělení podle m/z . Tento krok probíhá za vysokého vakua, které umožňuje volný pohyb iontů bez podstoupení kolizí nebo jiných nechtěných interakcí s dalšími plynnými molekulami. Pro kontrolu pohybu iontů je využito elektrické nebo magnetické pole. Dostupné jsou různé typy hmotnostních analyzátoary, které se liší svým rozlišením, správností hmoty, rozsahem m/z , citlivostí, dynamickým rozsahem a rychlostí sběru dat [25,32–34].

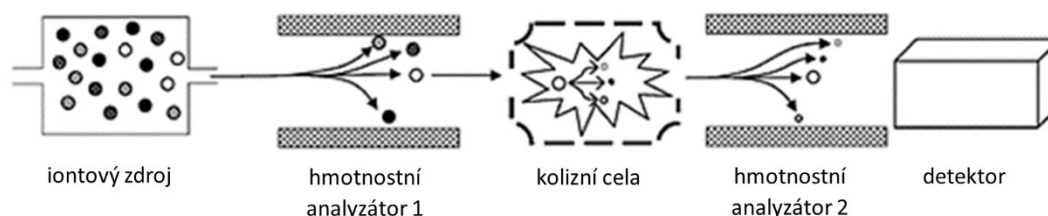
K separaci iontů podle m/z v hmotnostním analyzátoary dochází na základě různých fyzikálních principů. Kvadrupól (Q) a iontová past (IT) využívají různé stability oscilací iontů v kombinacích stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí. V analyzátoary doby letu (TOF) se ionty separují na základě různě dlouhého letu trubicí k detektoru. Různého zakřivení dráhy letu iontů v elektrickém nebo magnetickém poli využívá magnetický sektor. Orbitální past je schopna rozdělit ionty díky rozdílné frekvenci harmonických oscilací a iontová cyklotronová rezonance (ICR) podle odlišné frekvence cyklického pohybu iontů v kombinaci elektrického a magnetického pole [35].

3.2.3 Detektor

Detektor pracuje, stejně jako hmotnostní analyzátor, za vysokého vakua. Jeho úkolem je zaznamenat iontové proudy separovaných iontů a převést je na elektrický signál. Využívá se elektronový násobič, scintilační fotonásobič nebo Faradayova klec [25,33,36].

3.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Spojením více hmotnostních analyzátorů za sebou vzniká uspořádání, které se nazývá tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Při jeho použití dochází k izolaci vybraných iontů v prvním analyzátoru, jejich následné fragmentaci v kolizní cele a finální separaci fragmentů těchto iontů podle m/z v analyzátoru druhém (Obrázek 5). Tento způsob je označován jako MS/MS v prostoru. Existuje také MS/MS v čase, kdy probíhá stejný postup v jednom hmotnostním analyzátoru, ale v různých časových okamžicích. MS/MS v čase může být prováděna např. v analyzátoru typu iontové pasti nebo iontové cyklotronové rezonance [26,37].



Obrázek 5: Schematické znázornění principu tandemového hmotnostního spektrometru v prostoru [37].

Jedním z nejčastěji využívaných tandemových hmotnostních spektrometrů v prostoru je trojitý kvadrupól (QqQ), který vzniká spojením tří kvadrupólových analyzátorů. Prostřední z nich funguje v takovém případě jako kolizní cela. Dalším široce využívaným je kvadrupól ve spojení s analyzátozem doby letu (Q-TOF). Ten se označuje jako hybridní, protože vznikl spojením dvou různých hmotnostních analyzátorů – 2 kvadrupólů a 1 analyzátoru doby letu. V prvním kvadrupólu dochází k izolaci vybraných iontů, druhý kvadrupól funguje jako kolizní cela a v TOFu probíhá vlastní analýza. Mezi výhody tohoto tandemového hmotnostního spektrometru patří vysoká

správnost určení hmoty, vysoké rozlišení, vysoká skenovací rychlost a až 100x vyšší citlivost oproti QqQ [35,37].

Tandemová hmotnostní spektrometrie poskytuje strukturální informace o analytech a umožňuje studovat fragmentační procesy. Navíc lze dosáhnout dalšího zvýšení selektivity, které může být obzvláště přínosné pro analýzu komplexních směsí [38,39].

3.2.5 Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením

Schopnost rozlišit signály iontů o podobném m/z se nazývá rozlišovací schopnost neboli rozlišení. Za vysoké rozlišení jsou považovány hodnoty vyšší než 10 000. Těch jsou schopny dosahovat analyzátoři jako TOF, orbitální past, ICR a sektorový magnetický analyzátoř s dvojitou fokusací iontů. Tyto analyzátoři se vyznačují také vysokou správností určení hmoty, která se většinou pohybuje v rozmezí 1-5 ppm. Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) umožňuje identifikaci analytu s větší jistotou, protože měří m/z s přesností na několik desetinných míst. Při jejím použití je tak možné rozlišit dvě sloučeniny s m/z lišící se pouze v řádech tisícín nebo desetitisícín, které by se při použití nízkého rozlišení jevily jako identické [35,40,41].

Potřeba vysokého rozlišení roste se zvyšující se komplexností vzorku. Zejména, pokud je přítomno velké množství analyzovaných sloučenin s podobnou molekulovou hmotností. Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením je z tohoto důvodu ideální metodou pro necílené analýzy. Znalost přesné a správné hmoty umožní určit elementární složení, a limituje proto počet možných sloučenin, o které by se mohlo jednat. Může tak být provedena předběžná identifikace neznámých sloučenin bez nutnosti použití referenčních standardů nebo knihoven MS spekter, což ve výsledku umožní identifikaci většího množství sloučenin [40,42,43].

3.2.6 Pokročilé metody sběru MS/MS dat

Mezi pokročilé metody sběru MS/MS dat patří metoda datově závislého skenu (DDA) a metoda datově nezávislého skenu (DIA). Při metodě datově závislého skenu jsou získána MS spektra všech iontů ve stanoveném rozsahu m/z . MS/MS spektra jsou následně získána pouze pro zvolené prekurzory, které vyhovují předem stanoveným kritériím (nejčastěji minimální intenzitě signálu). Při DIA jsou získána MS spektra všech

iontů ve stanoveném rozsahu m/z a zároveň i jejich MS/MS spektra, protože dojde k fragmentaci všech detekovatelných iontů. Metoda datově nezávislého skenu umožňuje analyzovat i látky zastoupené v menším množství, protože na rozdíl od DDA jsou fragmentovány všechny prekurzorové ionty bez ohledu na jejich intenzitu. Jejím nevýhodou může být generování většího množství dat a problém s nedostatkem místa na počítačových discích pro jejich ukládání nebo zálohu. Výhodou obou metod je získání MS i MS/MS spekter v rámci jedné analýzy a možnost analyzovat data zpětně [44,45].

3.2.7 Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Hmotnostní spektra jsou specifická, a umožňují tak identifikaci analytů s poměrně velkou jistotou. Problém ale představují látky izomerní nebo chirální, které mají stejnou molekulovou hmotnost. Při samostatném použití hmotnostního spektrometru není možné je rozlišit. Při využití kapalinového chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem může dojít k separaci látek v kapalinovém chromatografu, která umožní jejich následnou identifikaci v hmotnostním spektrometru [46,47].

Spojením LC s MS je získána výborná separační účinnost v kombinaci s vysokou citlivostí a selektivitou. V dnešní době se jedná již o rutinní a široce rozšířenou analytickou techniku. Realizace tohoto spojení byla ale v porovnání s plynovou chromatografií (GC) v kombinaci s hmotnostní spektrometrií o něco složitější. Hlavní problémy, které bylo třeba vyřešit, představovalo složení mobilní fáze a nalezení vhodné metody ionizace. Na rozdíl od GC je mobilní fáze v LC kapalná. Dříve dostupné ionizační techniky, jako například elektronová ionizace a chemická ionizace (CI), však vyžadovaly, aby byl vzorek v plynné fázi. Otázka ionizace byla vyřešena vývojem ionizačních technik za atmosférického tlaku, při kterých probíhá ionizace v kapalně fázi. Dnes je nejčastěji využívána ESI a APCI, méně APPI. Co se týče mobilní fáze, je potřeba se vyhnout použití netěkavých pufrů (např. fosfátový nebo borátový) a iontově-párových činidel, které by mohly způsobit znečištění iontového zdroje [38,48,49].

Při volbě hmotnostního analyzátoru pro LC-MS techniku je nejdůležitějším parametrem rychlost sběru dat. Pro velmi rychlé separace je tak nejvýhodnější TOF nebo Q-TOF, které dosahují nejvyšších skenovacích rychlostí, a to zároveň s vysokým rozlišením.

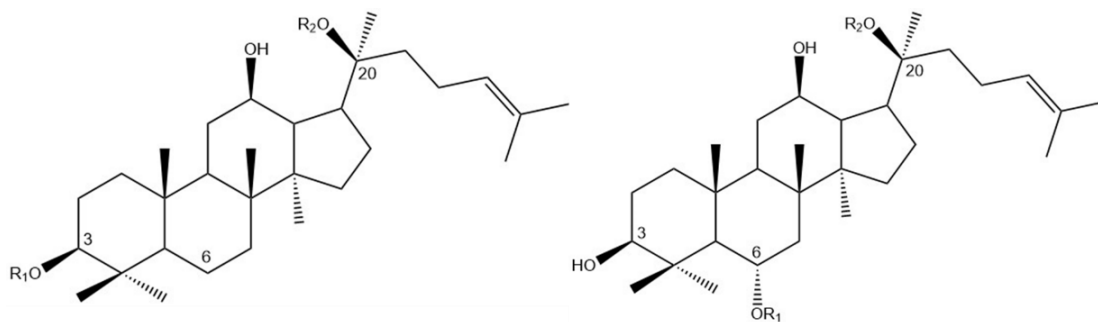
U orbitální pasti lze sice dosáhnout rychlého sběru dat, ale pouze za současné ztráty rozlišení. Kromě výše zmíněných analyzátorů se využívá také Q a IT, které dosahují střední rychlosti sběru dat [35,50].

3.3 GINSENOSIDY

Všehož ženšenový (*Panax ginseng*) je považován za jednu z nejvýznamnějších léčivých rostlin tradiční čínské medicíny. Patří do čeledi aralkovitých (*Araliaceae*) a pro léčebné účinky se nejčastěji využívá jeho kořen. Ten obsahuje jako hlavní účinné látky ginsenosidy. Jedná se o triterpenické saponiny, které se vyskytují téměř výhradně v ženšenu a jsou zodpovědné za jeho účinky. Ženšen je v dnešní době využíván zejména ke zvýšení odolnosti proti stresu a na podporu celkové vitality, tedy jako adaptogen. Ginsenosidy jsou cílem mnoha výzkumů, protože se ukazuje, že mohou ovlivňovat několik fyziologických funkcí. V *in vitro* a *in vivo* studiích byly prokázány potenciální účinky imunomodulační, protizánětlivé, antihypertenzní, antidiabetické, neuroprotektivní a preventivní účinky proti vzniku rakoviny [51,52].

3.3.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti

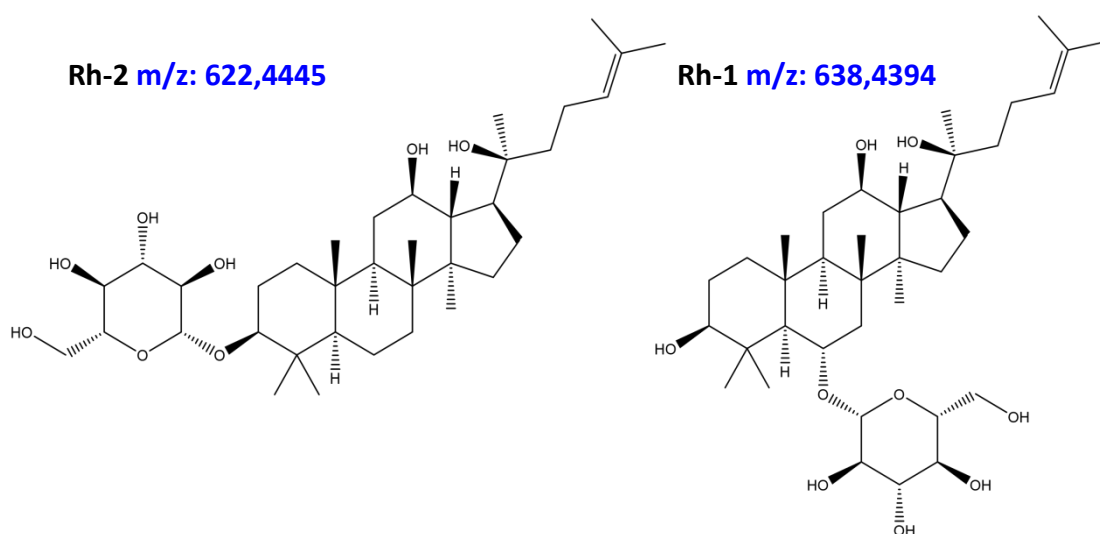
Ginsenosidy patří svou strukturou mezi O-glykosidy. Skládají se z části necukerné (aglykonu) a cukerné. Základ aglykonu tvoří cyklopentanoperhydrofenantren s navázanými methylovými skupinami v polohách 4, 4, 8, 14 a 19. Na tento základní skelet jsou připojeny cukerné zbytky. Většinou se jedná o monosacharidy jako glukosa, rhamnosa, xylosa nebo arabinosa. Ginsenosidy lze podle struktury rozdělit na dva hlavní typy: dammaranový a oleananový. Převažují ginsenosidy dammaranové, které jsou dále děleny na protopanaxadioly a protopanaxatrioly. Protopanaxadioly mají cukerné zbytky připojeny přes hydroxylové skupiny na C3 a/nebo C20, protopanaxatrioly na C6 a/nebo C20 (Obrázek 6). Oleananové ginsenosidy mají modifikovaný postranní řetězec na C20 [51–53].



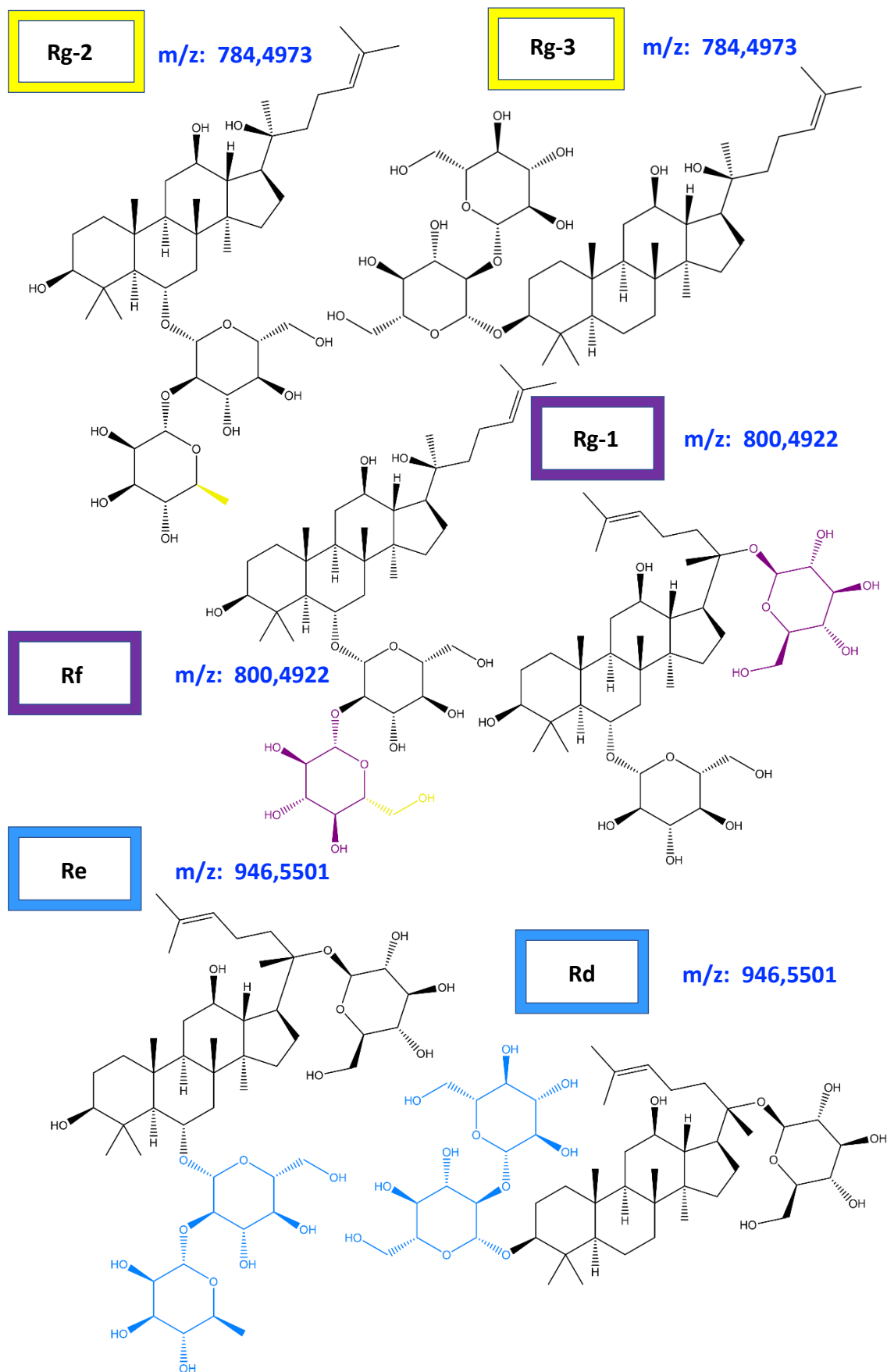
Obrázek 6: Struktura protopanaxadiolu (vlevo) a protopanaxatriolu (vpravo). Nakresleno v ChemDraw podle [54].

Jednotlivé ginsenosidy se liší nejen typem, polohou a počtem substituentů, ale také jejich prostorovým uspořádáním. Často se jedná o izomery, ať už strukturní nebo stereoizomery. Obrázky 7–9 poskytují přehled nejvýznamnějších ginsenosidů. Barevnými rámečky okolo názvu je odlišena skupina ginsenosidů, které jsou navzájem izomerní. Ve struktuře jsou barevně vyznačeny odlišnosti mezi strukturně podobnými ginsenosidy.

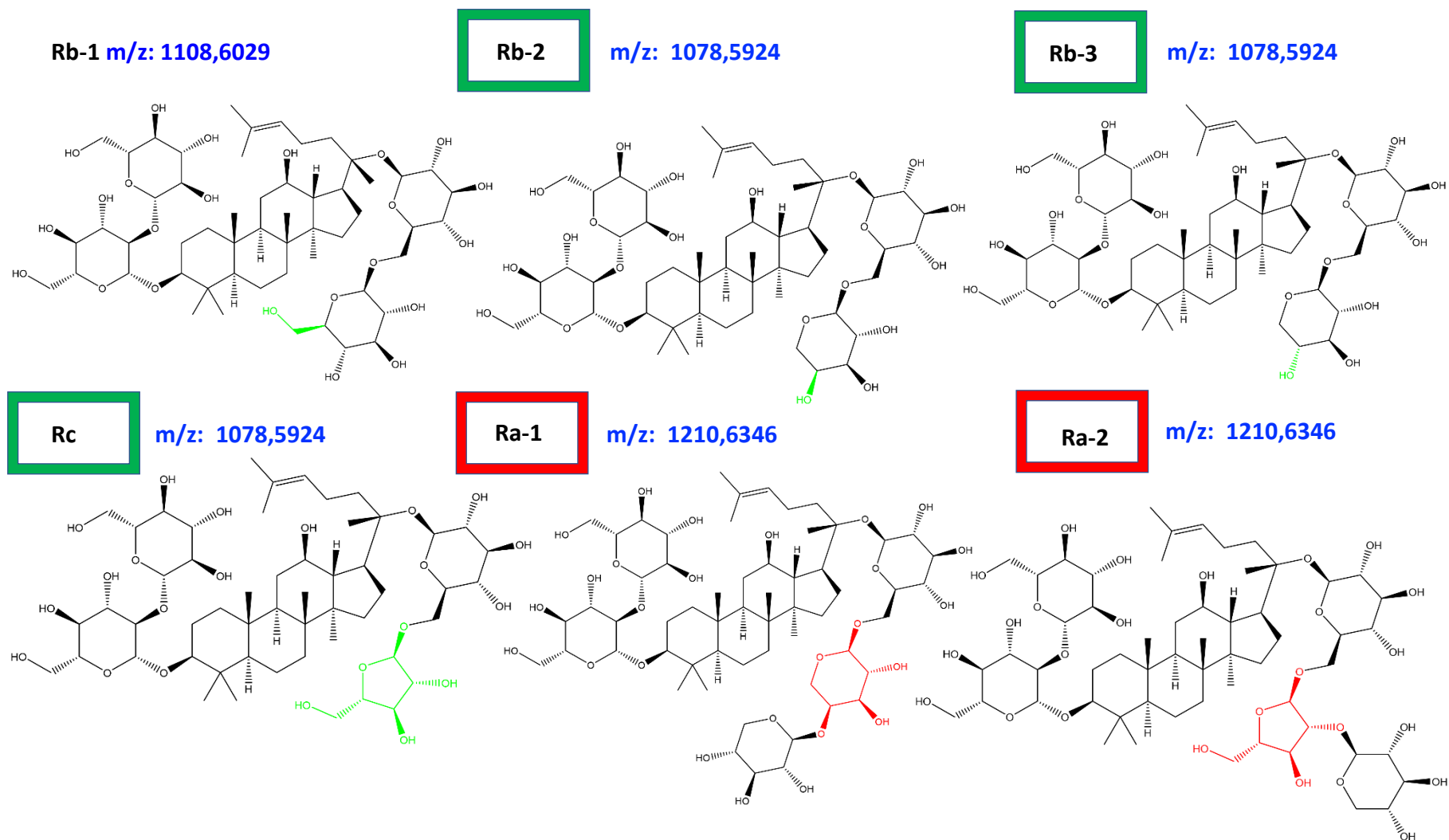
Základní fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných ginsenosidů shrnuje Tabulka 1. Podle hodnot log P (rozdělovací koeficient látky v systému oktanol-voda) se jedná spíše o látky lipofilní, jejichž rozpustnost ve vodě závisí na množství cukerných zbytků. Většinou jsou špatně rozpustné ve vodě a dobře rozpustné v methanolu [55]. Hodnoty pKa (záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny) se pohybují v rozmezí 12,85 až 12,91, jde tedy o velmi slabé kyseliny.



Obrázek 7: Přehled nejvýznamnějších ginsenosidů I. Nakresleno v ChemDraw.



Obrázek 8: Přehled nejvýznamnějších ginsenosidů II. Nakresleno v ChemDraw.



Obrázek 9: Přehled nejvýznamnějších ginsenosidů III. Nakresleno v ChemDraw.

Tabulka 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných ginsenosidů. Monoizotopické hmotnosti byly získány pomocí ChemDraw, ostatní údaje z databáze SciFinder [56].

název ginsenosidu	sumární vzorec	monoizotopická hmotnost	log P	pKa	donory protonů	akceptory protonů
Ra-1	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	1210,6346	0.056±0,994	12.85±0.70	16	26
Ra-2	C ₅₈ H ₉₈ O ₂₆	1210,6346	1.824±0,971	12.85±0.70	16	26
Rb-1	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1108,6029	1.876±0,908	12.85±0.70	15	23
Rb-2	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1078,5924	2.799±0,940	12.85±0.70	14	22
Rb-3	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1078,5924	2.799±0,940	12.85±0.70	14	22
Rc	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1078,5924	3.490±0,914	12.85±0.70	14	22
Rd	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	946,5501	3.383±0,862	12.85±0.70	12	18
Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	946,5501	1.890±0,841	12.85±0.70	12	18
Rf	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	800,4922	3.389±0,856	12.85±0.70	10	14
Rg-1	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	800,4922	1.502±0,473	12.91±0.70	10	14
Rg-2	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	784,4973	3.647±0,823	12.85±0.70	9	13
Rg-3	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	784,4973	5.140±0,854	12.85±0.70	9	13
Rh-1	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	638,4934	3.289±0,435	12.91±0.70	7	9
Rh-2	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	622,4445	5.025±0,428	12.91±0.70	6	8

3.3.2 Publikované analytické metody pro stanovení ginsenosidů v produktech s obsahem ženšenu

Ginsenosidy byly poprvé izolovány v roce 1963 a od té doby se neustále zvyšuje počet publikací, které se jimi zabývají. Do dnešní doby bylo izolováno více než 150 přirozeně se vyskytujících ginsenosidů. Pro kontrolu kvality ženšenových produktů jsou potřeba účinné kvalitativní a kvantitativní analytické metody [51,52].

První používanou technikou k analýze ginsenosidů byla tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC), která je v současnosti stále využívána v Evropském lékopise pro identifikaci rostlinného materiálu z kořene ženšenu. Později byla vyvinuta metoda pro analýzu ginsenosidů pomocí plynové chromatografie, která ale byla po nějaké době zastíněna HPLC. Ta zůstává i nadále zlatým standardem. Nejčastěji byla používána ve spojení se spektrofotometrickým detektorem (UV), který je v analytické laboratoři běžně dostupný. Ginsenosidy se ale vyznačují slabou a necharakteristickou absorpcí, která limituje citlivost UV detektoru. Jeho nízká citlivost také znemožňuje analýzu méně polárních ginsenosidů zastoupených v nižší koncentraci. V posledních letech jsou proto také využívány detektory s vyšší citlivostí, jako je MS a detektor rozptylu světla (ELSD) [52,57,58].

Přehled publikovaných metod pro analýzu ginsenosidů v produktech s obsahem ženšenu poskytuje Tabulka 2. Metodou volby je HPLC. Méně je zastoupena modernější UHPLC a pouze v jednom případě byla využita GC. Většina analýz probíhala na nepolární stacionární fázi s C18 modifikovaným silikagelem. Převládá gradientová eluce s využitím vody a acetonitrilu (ACN) jako mobilní fáze. Pokud je použito aditivum mobilní fáze, pak se nejčastěji jedná o kyselinu mravenčí (FA). Délka analýz se pohybuje v rozmezí 15–90 minut pro HPLC a UHPLC. U GC analýzy je to 14 minut pro 6 analytů. K detekci se nejvíce využívá MS a spektrofotometrický detektor. Nejčastěji je stanovováno 7 ginsenosidů. Vyšší počet stanovených ginsenosidů bývá vykoupěn delším časem analýzy.

Tabulka 2: Publikované analytické metody pro stanovení ginsenosidů v produktech s obsahem ženšenu.

identifikované ginsenosidy (počet)	metoda	stacionární fáze	mobilní fáze	dávkovaný objem [μl]	průtok [ml/min]	čas analýzy [min]	detekce	vzorek	rok zdroj
F11, RT5 (2)	HPLC	Acclaim RSLC 120 C18 (2,1 x 150 mm; 3 μm)	32% ACN + 0,34% FA	20	0,4	42	MS/MS (Q-IT)	komerční ženšenový produkt	2014 [59]
Rb-1, Rc, Rd, Re, Rg-1, Ro (6)	GC	DB-5 (0,18 mm x 13,3 m; 0,4 μm); DB-5 (0,32 mm x 15 m; 0,25 μm)	helium	–	2	14	FID	komerční ženšenový produkt	1995 [60]
Rb-1, Rb-2, Rc, Rd, Re, Rg-1 (6)	HPLC	Phenomenex Luna C18 (4,6 x 150 mm; 5 μm)	A: voda B: 80% ACN	10	1,5	45	UV (203 nm)	komerční ženšenový produkt	2013 [61]
Rb-1, Rb-2, Rc, Rd, Re, Rg-1 (6)	HPLC	Spherisorb ODS-2 RP-18 (4,6 x 250 mm; 5 μm)	A: voda B: ACN	10	1,6	70	UV (203 nm)	komerční ženšenový produkt	2002 [62]
Rb-1, Rb-2, Rc, Rd, Re, Rg-1 (6)	HPLC	Beckman's Ultrasphere C18 (4,6 x 250 mm; 5 μm)	A: ACN B: voda	10	1,6	70	UV (203 nm)	komerční ženšenový produkt	2003 [63]
Rb-1, Rb-2, Rc, Rd, Re, Rg-1, Rh-1 (7)	UHPLC	ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 μm)	A: voda B: ACN	10	0,2	15	MS/MS	produkt tradiční čínské medicíny	2016 [64]

ACN – acetonitril, FA – kyselina mravenčí, FID – plamenově ionizační detektor

Tabulka 2: Publikované analytické metody pro stanovení ginsenosidů v produktech s obsahem ženšenu – pokračování.

identifikované ginsenosidy (počet)	metoda	stacionární fáze	mobilní fáze	dávkovaný objem [μl]	průtok [ml/min]	čas analýzy [min]	detekce	vzorek	rok zdroj
Ra-3, Rb-1, Rd, Re, Rg-1, Rg-2, Rh-1 (7)	UHPLC	ACQUITY UPLC HSS T3 (2,1 x 100 mm; 1,8 μm)	A: voda + 0,1% FA B: ACN + 0,1% FA	2	0,45	18	MS (Q-TOF)	ženšenové prášky	2015 [65]
Rb-1, Rb-2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg-1 (7)	HPLC	YMC-Pack PVA-Sil (2,1 x 250 mm; 5 μm)	82,5% ACN	5	0,298	20	UV (203 nm)	komerční ženšenový produkt	2007 [66]
Rb-1, Rb-2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg-1 (7)	HPLC	Zorbax C18 (2,1 x 150 mm; 5 μm)	A: ACN B: voda	N/A	0,2	56	MS/MS (Q-IT)	komerční ženšenový produkt	2001 [67]
Rb-1, Rb-2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg-1 (7)	HPLC	Zorbax C-18 (2,1 x 150 mm; 5 μm); Alltima C-18 (5 μm, 250 x 4,6 mm)	A: voda B: ACN	N/A	1,3	73	MS/MS (Q-IT); PAD (203 nm)	komerční ženšenový produkt	2001 [68]
Rb-1, Rb-2, Rb-3, Rc, Rd, Re, Rg-1, Rg-3 (8)	HPLC	Pico Tag C18 (3,9 x 300 mm; 4 μm)	A: voda + 0,02% AA B: ACN + 0,02% AA	10	0,375	79	MS/MS	komerční ženšenový produkt	2014 [69]

ACN – acetonitril, AA – kyselina octová, FA – kyselina mravenčí, N/A neuvedeno, PAD – pulzní amperometrický detektor

Tabulka 2: Publikované analytické metody pro stanovení ginsenosidů v produktech s obsahem ženšenu – pokračování II.

identifikované ginsenosidy (počet)	metoda	stacionární fáze	mobilní fáze	dávkovaný objem [μl]	průtok [ml/min]	čas analýzy [min]	detekce	vzorek	rok zdroj
Rb-1, Rb-2, Rc, Rd, Re, Rg-1, Rg-3, Rg-5, Rk-1 (9)	HPLC	Gemini C18 (4,6 x 250 mm; 5 μm)	A: voda B: ACN	10	1	70	ELSD	komerční ženšenový produkt	2016 [70]
F11, Rb-1, Rb-2, Rc, Rd, Re, Rf, Rg-1, Ro (9)	HPLC	Adsorbosphere HS C18 (4,6 x 150 mm; 3 μm)	A: 50% ACN B: voda + 10mM acetát amonný	10	1	72	MS (QqQ)	komerční ženšenový produkt	2000 [71]
Rb-1, Rb-2, Rb-3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg-1, Rg-2, Rg-3, Rh-1, Rh-2 (12)	UHPLC	ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 μm)	A: ACN B: voda	2	0,3	20	PAD (203 nm)	komerční ženšenový produkt	2015 [72]
F4, Rb-1, Rb-2, Rc, Rd, Re, Rg-1, (R)-Rg-3, (S)-Rg-3, Rg-5, Rg-6, Rh-4, Rk-1, Rk-3 (14)	HPLC	Gemini C18 (4,6 x 250 mm; 5 μm)	A: voda B: ACN	20	N/A	80	CAD	komerční ženšenový produkt	2013 [57]

ACN – acetonitril, CAD – detektor nabitých částic, ELSD – detektor rozptylu světla, N/A nevedeno, PAD – pulzní amperometrický detektor

Tabulka 2: Publikované analytické metody pro stanovení ginsenosidů v produktech s obsahem ženšenu – pokračování III.

identifikované ginsenosidy (počet)	metoda	stacionární fáze	mobilní fáze	dávkovaný objem [μl]	průtok [ml/min]	čas analýzy [min]	detekce	vzorek	rok zdroj
C-K, F1, F2, R1, Rb-1, Rb-2, Rb-3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg-1, Rg-2, Rg-3, Rh-1, Rh-2 (16)	HPLC	Acclaim RSLC 120 C18 (2,1 x 150 mm; 2,2 μm)	A: voda + 0,1% FA B: ACN	20	0,4	45	DAD, MS/MS (Q-IT)	komerční ženšenový produkt	2017 [73]
F1, F11, K, R1, RT5, Rb-1, Rb-2, Rb-3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg-1, Rg-2, Rg-3, Rh-1, Rh-2 (17)	HPLC	Acclaim RSLC 120 C18 (2,1 x 150 mm; 3 μm)	A: voda + 0,5% FA B: ACN	N/A	0,4	45	MS (IT)	komerční ženšenový produkt	2015 [74]
F5, Rb-1, Rb-2, Rb-3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg-1, Rg-2, (R)-Rg-3, (S)-Rg-3, (R)-Rh-1, (S)-Rh-1, (R)-Rh-2, (S)-Rh-2, Rh-4, Rk-3, Ro (19)	HPLC	Agilent Zorbax SB-C18 (4,6 x 250 mm; 5 μm)	A: voda + 10 mM mravenčan amonný B: ACN + 0,1% FA	2	1	80	MS/MS (Q-TOF)	produkt tradiční čínské medicíny	2014 [75]
F1, F2, K, PPD, (R)PPT, (S)-PPT, Rb-1, Rb-2, Rb-3, Rc, Rd, Re, Rf, Rg-1, (R)-Rg-2, (S)-Rg-2, (R)-Rg-3, (S)-Rg-3, (R)-Rh-1, (S)-Rh-1, (R)-Rh-2, (S)-Rh-2 (22)	UHPLC	LaChromUltra C18 (2 x 100 mm; 2 μm); LaChromUltra C18 (2 x 50 mm; 2 μm)	A: 20% ACN B: 80% ACN	5	0,2; 0,3	90	UV (203 nm)	komerční ženšenový produkt	2013 [76]

ACN – acetonitril, DAD – detektor s diodovým polem, FA – kyselina mravenčí, N/A neuváděno

3.4 DOPLŇKY STRAVY A JEJICH REGULACE

Doplňkem stravy se podle zákona č. 110/1997 Sb. rozumí: „potravinu, jejímž účelem je doplňovat běžnou stravu a která je koncentrovaným zdrojem vitaminů a minerálních látek nebo dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem, obsažených v potravině samostatně nebo v kombinaci, určená k přímé spotřebě v malých odměřených množstvích.“ Doplňky stravy jsou v České republice legislativně upraveny zejména zákonem č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, který byl novelizován zákonem č. 174/2021 Sb, a vyhláškou č. 58/2018 Sb., o doplňcích stravy a složení potravin [77,78].

Doplňky stravy jsou užívány za účelem podpory našeho zdraví, nikoliv k léčbě nebo prevenci. Na rozdíl od léčivých přípravků nepodstupují rozsáhlá klinická hodnocení, ve kterých je třeba dokázat jejich jakost, účinnost a bezpečnost, a nejsou schvalovány Státním ústavem pro kontrolu léčiv. Povinností je pouze oznámit uvedení na trh Ministerstvu zemědělství. To se provádí zasláním českého textu etikety. Následně může být doplněk stravy uveden na trh. Spotřebitel si ho pak může zakoupit například v lékárně, drogerii, supermarketu nebo v internetovém obchodě [78–81].

U doplňků stravy není kontrolováno, zda je deklarované množství látky skutečně použito či zda daný přípravek neobsahuje navíc jiné látky, které nejsou uvedeny na obale. Kvůli nedostatečné regulaci zjišťuje Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) pravidelně falšované doplňky stravy. Při kontrole provedené na konci roku 2007 odhalila, že až třetina kontrolovaných výrobků obsahovala menší množství látek, než bylo deklarováno. Některé je dokonce neobsahovaly vůbec [82].

Kromě toho je v některých přípravcích také prokázána přítomnost nepovolených látek ohrožujících zdraví, jako např. anabolické steroidy. V roce 2020 zjistila SZPI, že doplněk stravy WARRIOR LABS SPARTAN 90 caps. obsahuje anabolické steroidy a další nedeklarované látky. Laboratorní analýzou byla mj. prokázána přítomnost testosteronu, androstendionu, boldenonu, klostebololu a chlordehydromethyltestosteronu [83].

V této diplomové práci byl testován doplněk stravy určený ke zvýšení hladiny testosteronu, který obsahuje extrakty z těchto rostlinných drog: semeno pískavice

řecké seno, kořen rozchodnice růžové, kořen všehoje ženšenového a list pantaly rozkladité. Otázkou bylo, zda daný doplněk stravy neobsahuje nedeklarovaný testosteron, který je uměle přidáván za účelem zvýšení účinků doplňku stravy.

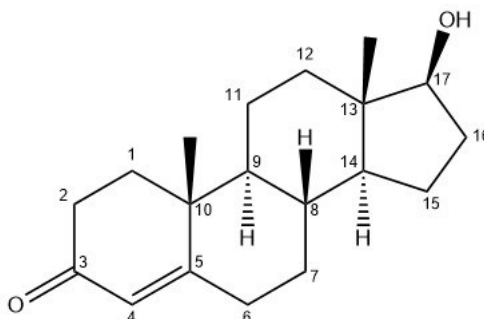
3.5 TESTOSTERON

Testosteron je produkován z největší části ve varlatech Leydigovými buňkami. Patří spolu s dihydrotestosteronem mezi hlavní přirozené androgeny, které jsou zodpovědné za vývoj mužských pohlavních orgánů a sekundárních pohlavních znaků. Má anabolické účinky, podporuje spermatogenezi a stimuluje tvorbu erytrocytů. Klinicky se testosteron využívá jako substituční terapie při hypogonadismu mužů, ke stimulaci růstu nebo jako anabolikum po traumatech a u těžce nemocných pacientů. Pro své anabolické účinky je také zneužíván sportovci k dopingu [84–86].

3.5.1 Struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti

Strukturní základ testosteronu tvoří androstan – alicyklický uhlovodík o 19 uhlících. Na něm je v poloze 3 navázána ketoskupina, v poloze 17 β hydroxyskupina a mezi uhlíky 4 a 5 je obsažena dvojná vazba. Testosteron lze tedy systematicky pojmenovat jako 17 β -hydroxyandrost-4-en-3-on (Obrázek 10).

Testosteron je bílý nebo krémově bílý krystalický prášek bez zápachu [87]. Jeho fyzikálně-chemické vlastnosti shrnuje Tabulka 3. Jedná se o látku spíše lipofilní, dobře rozpustnou v acetonitrilu nebo methanolu. Vzhledem k hodnotě pKa se jedná o velmi slabou kyselinu.



Obrázek 10: Struktura testosteronu. Vytvořeno v ChemDraw.

Tabulka 3: Fyzikálně-chemické vlastnosti testosteronu. Monoizotopická hmotnost byla získána pomocí Chem-Draw, zbylé údaje z databáze SciFinder [56].

sumární vzorec	C ₁₉ H ₂₈ O ₂
monoizotopická hmotnost	288,2089
log P	3,179±0,277
pKa	15,06±0,60
donory protonů	1
akceptory protonů	2

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

- UHPLC systém: ACQUITY UPLC I-Class System, Waters, Milford, MA, USA
- hmotnostní spektrometr: SYNAPT G2-Si, Waters, Milford, MA, USA
- analytické váhy Sartorius, Göttingen, Německo
- ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec, Bandelin Electronic, Berlín, Německo
- třepačka IKA Vortex 3, Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo
- automatické mikropipety se špičkami Eppendorf, Hamburk, Německo
- software MassLynx V4.2, Waters, Milford, MA, USA
- software Unifi, Waters, Milford, MA, USA
- software ChemDraw Professional 17.1, PerkinElmer, Waltham, MA, USA

4.2 POUŽITÉ POMŮCKY

- injekční jehly Medoject, Chirana T. Injecta, a.s.; Stará Turá, Slovensko
- injekční stříkačky HSW HENKE-JECT, Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Německo
- stříkačkové filtry CHS FilterPure, Chromservis, Praha, Česká republika
- šroubovací vialky s uzávěry, Chromservis, Praha, Česká republika
- šroubovací vialky s uzávěry, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA

4.3 POUŽITÉ STACIONÁRNÍ FÁZE

- Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 μm), Waters, Milford, MA, USA
- Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2,1 x 100 mm; 1,7 μm), Waters, Milford, MA, USA
- ACE Excel C18-PFP (2,1 x 100 mm; 1,7 μm), Avantor, Radnor, PA, USA
- Atlantis Premier BEH C18 AX (2,1 x 150 mm; 1,7 μm), Waters, Milford, MA, USA
- Kinetex Biphenyl (2,1 x 100 mm; 1,7 μm), Phenomenex, Torrance, CA, USA

4.4 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- voda LC-MS grade, H₂O, Mr 18,02 (VWR International, Radnor, PA, USA)
- acetonitril LC-MS grade, čistota ≥ 99,9 %, C₂H₃N, Mr 41,05 (Fisher Chemical, Waltham, MA, USA)
- methanol LC-MS grade, čistota ≥ 99,9 %, CH₄O, Mr 32,04 (Fisher Chemical, Waltham, MA, USA)
- ethanol, čistota ≥ 99,7 %, C₂H₆O, Mr 46,07 (VWR International, Radnor, PA, USA)
- ethylacetát, čistota ≥ 99,7 %, C₄H₈O₂, Mr 88,11 (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- kyselina mravenčí LC-MS grade, čistota ≥ 99 %, CH₂O₂, Mr 46,03 (VWR International, Radnor, PA, USA)
- hydroxid sodný, čistota ≥ 98,0 %, NaOH, Mr 40,00 (Penta Chemicals, Chrudim, Česká republika)
- hydratovaný octan leucinu enkefalinu, čistota ≥ 95 %, C₂₈H₃₇N₅O₇.xC₂H₄O₂.yH₂O, Mr 555,62 (Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo)
- ultračistá voda, destilovaná v přístroji Milli Q RG, H₂O, Mr 18,02 (Millipore, Burlington, MA, USA)
- standardní látky ginsenosidů:
 - Rb-1, čistota ≥ 99,5 %, C₅₄H₉₂O₂₃ (HWI group, Rülzheim, Německo)
 - Rb-2, čistota ≥ 98,26 %, C₅₃H₉₀O₂₂ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)
 - Rb-3, čistota ≥ 99,12 %, C₅₃H₉₀O₂₂ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)
 - Rc, čistota ≥ 98,0 %, C₅₃H₉₀O₂₂ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)
 - Rd, čistota ≥ 95,0 %, C₄₈H₈₂O₁₈ (Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo)
 - Re, čistota ≥ 97,0 %, C₄₈H₈₂O₁₈ (Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo)
 - Rf, čistota ≥ 99,48 %, C₄₂H₇₂O₁₄ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA) – nesprávná standardní látka ginsenosidu Rf
 - Rf, čistota ≥ 99,2 %, C₄₂H₇₂O₁₄ (HWI group, Rülzheim, Německo)

- Rg-1, čistota $\geq 98,0$ %, $C_{42}H_{72}O_{14}$ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)
- Rg-2, čistota $\geq 94,0$ %, $C_{42}H_{72}O_{13}$ (Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo)
- Rg-3, čistota $\geq 96,0$ %, $C_{42}H_{72}O_{13}$ (Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo)
- Rh-1, čistota $\geq 98,0$ %, $C_{36}H_{62}O_9$ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)
- Rh-2, čistota $\geq 98,11$ %, $C_{36}H_{62}O_8$ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)
- referenční standardy jiných látek:
 - rosin, čistota $\geq 98,23$ %, $C_{15}H_{20}O_6$ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)
 - testosteron, čistota ≥ 99 %, $C_{19}H_{28}O_2$ (Sigma-Aldrich, Mnichov, Německo)
 - trigonellin, čistota $\geq 99,98$ %, $C_7H_7NO_2$ (MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA)
- kapsle zkoumaného doplňku stravy ve 3 šaržích (17637, 16583, 17292)

4.5 PRACOVNÍ POSTUP

4.5.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní roztoky standardů byly připraveny v koncentraci 1 mg/ml. Jako rozpouštědlo pro ginsenosidy, rosin a trigonellin byl použit methanol. Testosteron byl rozpouštěn v acetonitrilu. Takto připravené roztoky byly uchovávány v lednici maximálně 4 týdny.

4.5.2 Příprava pracovních roztoků standardů

Pracovní roztoky standardů byly připraveny naředěním zásobních roztoků desítkovou řadou. Nejčastěji byly použity pracovní roztoky o koncentraci 1 µg/ml. K ředění byl využíván methanol. Pracovní roztoky byly připravovány před každým měřením.

4.5.3 Příprava směsí standardů

Směsný standard ginsenosidů byl připraven v koncentraci 1 µg/ml. Pro jeho přípravu byl do vialky s 993 µl methanolu pipetován 1 µl z každého ze 7 zásobních roztoků ginsenosidů (Rb-1, Rc, Rd, Re, Rg-1, Rg-2 a Rg-3) o koncentraci 1 mg/ml. Po získání dalších 5 standardů ginsenosidů (Rb-2, Rb-3, Rf, Rh-1 a Rh-2) byl směsný standard rozšířen i o tyto ginsenosidy. Příprava probíhala stejným způsobem.

4.5.4 Příprava roztoků testosteronu pro měření kalibrační křivky

Roztoky testosteronu pro měření kalibrační křivky byly připraveny ze zásobního roztoku testosteronu o koncentraci 1 mg/ml. Byl vytvořen pracovní roztok testosteronu o koncentraci 1000 ng/ml, který byl nadále použit pro přípravu roztoků o koncentraci 500 ng/ml a 200 ng/ml. Tyto roztoky tvořily výchozí koncentrace pro 3 kalibrační řady a byly poté ředěny desítkovou řadou až na koncentrace 0,1; 0,5 a 0,2 ng/ml.

4.5.5 Příprava mobilní fáze

Mobilní fázi tvořila vodná složka A a organická složka B. Vodnou složku představoval 0,1% roztok kyseliny mravenčí ve vodě. Pro přípravu organické složky mobilní fáze byl použit čistý acetonitril a směs acetonitrilu a methanolu 2:1.

0,1% kyselina mravenčí ve vodě

Pro přípravu 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě byla odměrná baňka o objemu 1000 ml naplněna vodou téměř po rysku. V digestoři bylo do baňky napipetováno 1000 μ l kyseliny mravenčí a následně doplněno vodou po rysku.

směs acetonitrilu a methanolu 2:1

Pro přípravu směsi acetonitrilu a methanolu 2:1 bylo do zásobní láhve pomocí odměrného válce odměřeno 600 ml acetonitrilu a 300 ml methanolu.

Mobilní fáze byly připravovány před každým měřením.

4.5.6 Příprava oplachových kapalin

Jako oplachová kapalina jehly autosampleru (wash solvent) byl využíván čistý acetonitril. Promývací kapalinou (purge solvent) byl 50% roztok acetonitrilu ve vodě. Pro jeho přípravu bylo do zásobní láhve odměřeno 250 ml acetonitrilu a 250 ml vody. Oplachovou kapalinou pro píсты čerpadla byl 10% roztok methanolu ve vodě, který byl připraven z 50 ml methanolu a 450 ml vody.

4.5.7 Příprava kalibrantů HRMS

Jako externí kalibrant byl využíván 0,5 mM roztok mravenčanu sodného ve směsi acetonitrilu a vody 4:1. Do odměrné baňky o objemu 20 ml bylo odměřeno 16 ml acetonitrilu. Poté bylo napipetováno 100 μ l 0,1 M roztoku hydroxidu sodného a 200 μ l 10% roztoku kyseliny mravenčí ve vodě. Baňka byla doplněna vodou po rysku a sonifikována po dobu 5 minut.

Jako interní kalibrant byl využíván roztok leucinu enkefalinu o koncentraci 200 μ g/ μ l. Odměrná baňka o objemu 100 ml byla naplněna téměř po rysku 0,1% roztokem kyseliny mravenčí ve směsi acetonitrilu a vody 1:1. Do baňky bylo napipetováno 50 μ l roztoku leucinu enkefalinu o koncentraci 400 ng/ μ l. Baňka byla doplněna po rysku 0,1% roztokem kyseliny mravenčí ve směsi acetonitrilu a vody 1:1 a sonifikována po dobu 5 minut.

4.5.8 Příprava vzorků kapslí

Kapsle byla otevřena, vysypána do vialky a byl odvážen cca 1 mg jejího obsahu. Následně byl připraven roztok o koncentraci 1 mg/ml. Jako rozpouštědlo byla použita voda, acetonitril, methanol, ethanol nebo ethylacetát. Pro každé rozpouštědlo byly připraveny vždy 2 vzorky. Ty byly následně protřepány na vortexu a dále ponechány na ultrazvukové lázni 30 minut. Poté byly přefiltrovány přes membránový filtr s póry o velikosti 0,22 μm přímo do vialky. Pro nástřik byly používány výsledné roztoky kapslí nezředěné a 5x zředěné. K ředění byl využíván methanol.

4.5.9 Příprava vzorků kapslí s přidaným testosteronem

Pro přípravu vzorků kapslí obohacených testosteronem byly používány od každé ze 3 různých šarží vždy 3 kapsle. Pro kontrolu byla od každé šarže navíc připravena 1 kapsle bez přidaného testosteronu. Každá kapsle byla otevřena, vysypána do vialky a následně byl odvážen cca 1 mg jejího obsahu. K němu bylo napipetováno 10 μl standardu testosteronu o koncentraci 50, 500 nebo 2000 ng/ml. U kapslí bez přidaného testosteronu byl tento krok vynechán. Do všech vialek byl poté přidán methanol tak, aby výsledný objem činil 1 ml. Výsledné koncentrace roztoků testosteronu byly 0,5; 5 a 20 ng/ml. Následovalo krátké protřepání na vortexu, ponechání na ultrazvukové lázni po dobu 30 minut a přefiltrování přes membránový filtr s póry o velikosti 0,22 μm přímo do vialky. Vzorky nebyly dále ředěny kvůli získání dostatečné odezvy testosteronu a umožnění identifikace případné adulterace v doplňku stravy.

4.6 VÝVOJ UHPLC-HRMS METODY

4.6.1 Výchozí chromatografické podmínky

Kolona:	Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm; 1,7 µm)
Mobilní fáze (složka A):	0,1% kyselina mravenčí ve vodě
Mobilní fáze (složka B):	acetonitril
Rychlost průtoku mobilní fáze:	0,4 ml/min
Objem nástřiku vzorku:	0,5 µl
Teplota na koloně:	40 °C
Teplota dávkovače vzorku:	15 °C
Celkový čas analýzy:	15 minut

Průběh gradientové eluce je zobrazen v Tabulce 4.

Tabulka 4: Nastavení gradientové eluce při výchozích chromatografických podmínkách.

čas [min]	rychlost průtoku MF [ml/min]	A [%]	B [%]
0,00	0,400	98	2
1,00	0,400	98	2
15,00	0,400	2	98
15,10	0,400	98	2
17,00	0,400	98	2

4.6.2 Finální chromatografické podmínky

Kolona:	Atlantis Premier BEH C18 AX (2,1 x 150 mm; 1,7 µm)
Mobilní fáze (složka A):	0,1% kyselina mravenčí ve vodě
Mobilní fáze (složka B):	směs acetonitrilu a methanolu 2:1
Rychlost průtoku mobilní fáze:	0,4 ml/min
Objem nástřiku vzorku:	3 µl
Teplota na koloně:	40 °C
Teplota dávkovače vzorku:	15 °C
Celkový čas analýzy:	15 minut

Průběh gradientové eluce je zobrazen v Tabulce 5.

Tabulka 5: Nastavení gradientové eluce při finálních chromatografických podmínkách.

čas [min]	rychlost průtoku MF [ml/min]	A [%]	B [%]
0,00	0,400	70	30
13,00	0,400	5	95
13,10	0,400	70	30
15,00	0,400	70	30

4.6.3 Porovnání stacionárních fází

Celkem bylo porovnáno 5 chromatografických kolon se shodným průměrem a velikostí částic, ale odlišnými stacionárními fázemi a jejich chemickými modifikacemi, a tudíž odlišnou selektivitou. Jedná se o kolony Acquity UPLC BEH C18, Acquity UPLC BEH Shield RP18, ACE Excel C18-PFP, Kinetex Biphenyl a Atlantis Premier BEH C18 AX. Měření bylo provedeno pro všechny kolony za výchozích chromatografických podmínek uvedených v kapitole 4.6.1. Měření předcházela ekvilibrace kolony po dobu 10 minut.

4.6.4 Podmínky HRMS

K ionizaci byl využit elektrosprej v pozitivním i negativním módu. Optimalizace nastavení iontového zdroje probíhala v negativním módu, protože ginsenosidy vykazovaly v tomto módu ionizace vyšší intenzitu. Mezi optimalizované parametry patřilo napětí na kapiláře v rozsahu 0,5–3,0 kV, napětí na vstupním kuželu v rozmezí 10–70 V, desolvatační teplota s hodnotami 250–550 °C a rychlost průtoku desolvatačního plynu s rozpětím 500–1200 l/hod. Při měření každého z testovaných parametrů byly provedeny 2 nástřiky a k následnému vyhodnocení se používal průměr ze získaných hodnot.

Jako hmotnostní analyzátor byl použit Q-TOF se sběrem dat metodou datově nezávislého skenu (DIA). Analyzátor pracoval v módu rozlišení v rozmezí 100 – 1200 Da. Byla sbírána kontinuální data s rychlostí sběru 0,085 s.

Před každým měřením byla provedena externí kalibrace pro rozsah m/z 100 – 1200 pomocí 0,5 mM roztoku mravenčanu sodného. Jako interní kalibrant byl využíván roztok leucinu enkefalinu o koncentraci 200 pg/ μ l, který sloužil ke korekci přesné a správné hmoty.

Hodnoty kolizní energie byly optimalizovány pro pozitivní i negativní mód ionizace. Byl použit směsný standard ginsenosidů a testováno několik různých rozsahů kolizní energie pro zajištění optimální fragmentace ginsenosidů. Testované hodnoty se pohybovaly od 15–50 eV až po 60–70 eV v negativním módu a 45–70 eV v pozitivním módu.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 VYTVOŘENÍ KNIHOVNY SPEKTER OČEKÁVANÝCH LÁTEK

Zkoumaný doplněk stravy obsahuje kombinaci 4 rostlinných extraktů, proto nebylo známé, jaké obsahové látky se v něm nacházejí. V prvním kroku byla provedena literární rešerše a vytvořen seznam celkem 144 látek, které by mohly být potenciálně detekovány [88–94]. V databázi Pubchem [95] byly vyhledány IUPAC názvy. V programu ChemDraw byly nakresleny struktury daných sloučenin a zároveň získány jejich monoizotopické hmotnosti a hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu. Kompletní seznam očekávaných látek včetně hodnot monoizotopických hmotností a m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu je uveden v Tabulce 6. Knihovna spekter očekávaných látek byla vytvořena v programu Unifi.

Tabulka 6: Seznam látek očekávaných ve zkoumaném doplňku stravy.

název látky	monoizotopická hmotnost	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
cholin	104,1070	105,1143	103,0997
niacin	123,0320	124,0393	122,0248
sotolon	128,0473	129,0546	127,0401
n-oktanol	130,1358	131,1430	129,1285
cinnamyl alkohol	134,0732	135,0804	133,0659
p-cymen	134,1096	135,1168	134,1096
α-pinen	136,1252	137,1325	135,1179
β-pinen	136,1252	137,1325	135,1179
limonen	136,1252	137,1325	135,1179
α-felandren	136,1252	137,1325	135,1179
β-felandren	136,1252	137,1325	135,1179
trigonellin	137,0477	138,0550	136,0404
p-tyrosol	138,0681	139,0754	137,0608
nonanal	142,1358	143,1430	141,1285
kumarin	146,0368	147,0441	145,0295
lysin	146,1055	147,1128	145,0983
4-hydroxyisoleucin	147,0895	148,0968	146,0823
anethol	148,0888	149,0961	147,0815
thymol	150,1045	151,1117	149,0972
vanilin	152,0473	153,0546	151,0401

Tabulka 6: Seznam látek očekávaných ve zkoumaném doplňku stravy – pokračování I.

název látky	monoizotopická hmotnost	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
citral	152,1201	153,1274	151,1128
p-mentadienol	152,1201	153,1274	151,1128
1,8-cineol	154,1358	155,1430	153,1285
terpineol	154,1358	155,1430	153,1285
geraniol	154,1358	155,1430	153,1285
linalool	154,1358	155,1430	153,1285
nerol	154,1358	155,1430	153,1285
histidin	155,0695	156,0768	154,0622
dekanal	156,1514	157,1587	155,1441
n-dekanol	158,1671	159,1743	157,1598
kys. p-hydroxyskořicová	164,0473	165,0546	163,0401
eugenol	164,0837	165,0910	163,0765
pyridoxin	169,0739	170,0812	168,0666
kys. gallová	170,0215	171,0288	169,0142
rosiridol	170,1307	171,1380	169,1234
arginin	174,1117	175,1190	173,1044
hymekromon	176,0473	177,0546	175,0401
kys. kávová	180,0423	181,0495	179,0350
dodekanol	186,1984	187,2056	185,1911
trigoforin	188,0837	189,0910	187,0765
skopoletin	192,0423	193,0495	191,0350
kofein	194,0804	195,0877	193,0731
zingeron	194,0943	195,1016	193,0870
kalamen	202,1722	203,1794	201,1649
tryptofan	204,0899	205,0972	203,0826
α-kopaen	204,1878	205,1951	203,1805
δ-kadinen	204,1878	205,1951	203,1805
β-elemen	204,1878	205,1951	203,1805
cedren	204,1878	205,1951	203,1805
panasinsanol A	222,1984	223,2056	221,1911
panasinsanol B	222,1984	223,2056	221,1911
ginsenosol	222,1984	223,2056	221,1911
panaxynol	244,1827	245,1900	243,1754
gentianin	258,0528	259,0601	257,0455
rodiokyanosid A	259,1056	260,1129	258,0983
panaxydol	260,1776	261,1849	259,1704

Tabulka 6: Seznam látek očekávaných ve zkoumaném doplňku stravy – pokračování II.

název látky	monoizotopická hmotnost	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
lotaustralin	261,1212	262,1285	260,1140
apigenin	270,0528	271,0601	269,0455
genistein	270,0528	271,0601	269,0455
benzyl-β-D-glukopyranosid	270,1103	271,1176	269,1031
naringenin	272,0685	273,0757	271,0612
arbutin	272,0896	273,0969	271,0823
panaxytriol	278,1882	279,1955	277,1809
kempferol	286,0477	287,0550	285,0405
luteolin	286,0477	287,0550	285,0405
tetrafylin B	287,1005	288,1078	286,0932
gingerol	294,1831	295,1904	293,1758
rosin	296,1260	297,1333	295,1187
picein	298,1053	299,1125	297,0980
salidroside	300,1209	301,1282	299,1136
herbacetin	302,0427	303,0499	301,0354
kvercetin	302,0427	303,0499	301,0354
panacen	306,0255	307,0328	305,0183
sachalisid	312,1209	313,1282	311,1136
gossypetin	318,0376	319,0448	317,0303
vimalin	326,1366	327,1438	325,1293
gonzalizosin	328,0947	329,1020	327,0874
tricin	330,0740	331,0812	329,0667
rosiridin	332,1835	333,1908	331,1762
rodiolosid A	348,1784	349,1857	347,1711
rodiolosid D	350,1941	351,2013	349,1868
kys. chlorogenová	354,0951	355,1024	353,0878
hexakosanol	382,4175	383,4247	381,4102
cholecalciferol	384,3392	385,3465	383,3319
diosgenin	414,3134	415,3207	413,3061
yamogenin	414,3134	415,3207	413,3061
β-sitosterol	414,3862	415,3934	414,3789
tigogenin	416,3290	417,3363	415,3218
neotigogenin	416,3290	417,3363	415,3218
smilagenin	416,3290	417,3363	415,3218
sarsasapogenin	416,3290	417,3363	415,3218
triakontan	422,4852	423,4924	421,4779

Tabulka 6: Seznam látek očekávaných ve zkoumaném doplňku stravy – pokračování III.

název látky	monoizotopická hmotnost	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
rosarin	428,1682	429,1755	427,1610
rosavin	428,1682	429,1755	427,1610
cinnamyl-(xylopyranosyl)-glukopyranosid	428,1682	429,1755	427,1610
yuccagenin	430,3083	431,3156	429,3010
kempferol-7-ramnosid	432,1056	433,1129	431,0984
vitexin	432,1056	433,1129	431,0984
isovitexin	432,1056	433,1129	431,0984
gitogenin	432,3240	433,3312	431,3167
neogitogenin	432,3240	433,3312	431,3167
rodalin	434,0849	435,0922	433,0776
rodionin	448,1006	449,1078	447,0933
orientin	448,1006	449,1078	447,0933
isorientin	448,1006	449,1078	447,0933
kvercitrin	448,1006	449,1078	447,0933
kys. oleanová	456,3603	457,3676	455,3531
4-methoxycinnamyl-(arabinopyranosyl)-glukopyranosid	458,1788	459,1861	457,1715
rodiolgin	464,0955	465,1028	463,0882
rodiolosid E	466,2414	467,2487	465,2341
karpain	478,3771	479,3843	477,3698
rodiolin	480,1056	481,1129	479,0984
rodiolosid B	494,2363	495,2463	493,2291
rodiolosid C	494,2363	495,2463	493,2291
vicenin-1	564,1479	565,1552	563,1406
daucosterol	576,4390	577,4463	575,4317
vicenin-2	594,1585	595,1657	593,1512
afrosid	594,1585	595,1657	593,1512
rodalidin	596,1377	597,1450	595,1305
rodionidin	610,1534	611,1607	609,1461
rodiosin	610,1534	611,1607	609,1461
ginsenosid Rh-2	622,4445	623,4157	621,4372
rodiolgidin	626,1483	627,1556	625,1410
ginsenosid Rh-1	638,4394	639,4467	637,4321
fenugreekin	663,1091	664,1164	662,1018
ginsenosid Rg-2	784,4973	785,5046	783,4900

Tabulka 6: Seznam látek očekávaných ve zkoumaném doplňku stravy – pokračování IV.

název látky	monoizotopická hmotnost	[M+H]⁺	[M-H]⁻
ginsenosid Rg-3	784,4973	785,5046	783,4900
ginsenosid Rf	800,4922	801,4955	799,4849
ginsenosid Rg-1	800,4922	801,4955	799,4849
dioscin	868,4820	869,4893	867,4748
trigofoenosid A	902,4875	903,4948	901,4802
trigofoenosid B	920,4981	921,5054	919,4908
ginsenosid Re	946,5501	947,5574	945,5428
ginsenosid Rd	962,5450	963,5523	961,5378
trigofoenosid E	1048,5454	1049,5527	1047,5381
protodioscin	1048,5454	1049,5527	1047,5381
trigofoenosid D	1064,5403	1065,5476	1063,5331
trigofoenosid C	1066,5560	1067,5633	1065,5487
ginsenosid Rb-2	1078,5924	1079,5997	1077,5851
ginsenosid Rb-3	1078,5924	1079,5997	1077,5851
ginsenosid Rc	1078,5924	1079,5997	1077,5851
ginsenosid Rb-1	1108,6029	1109,6102	1107,5957
ginsenosid Ra-1	1210,6346	1211,6419	1209,6274
ginsenosid Ra-2	1210,6346	1211,6419	1209,6274

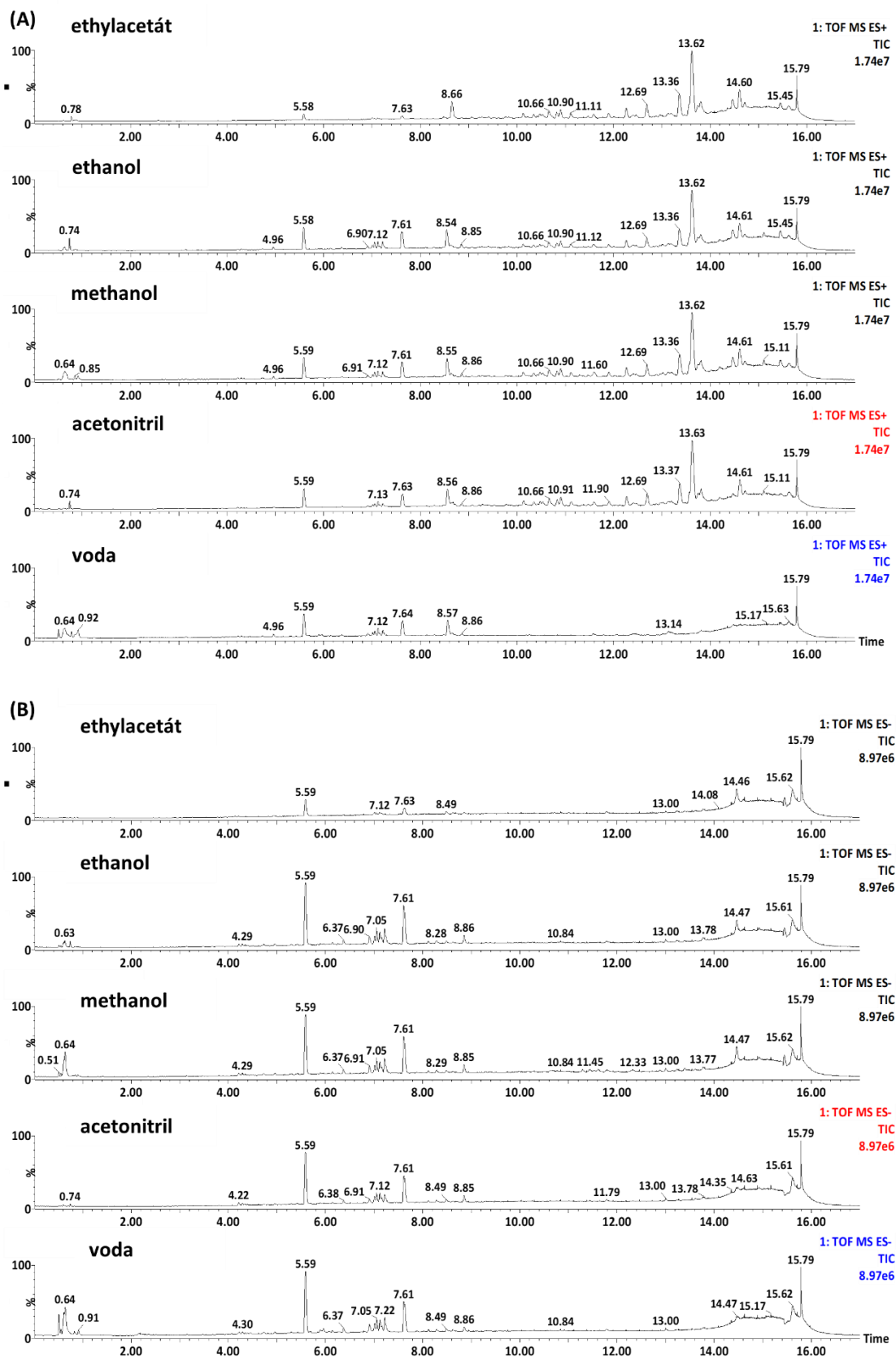
Testosteron nepatří mezi očekávané látky, ale byl přidán do knihovny spekter z důvodu identifikace případné adulterace daného doplňku stravy. Jeho hodnoty monoizotopické hmotnosti a m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Hodnoty monoizotopické hmotnosti a m/z protonované a deprotonované molekuly testosteronu.

název látky	monoizotopická hmotnost	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
testosteron	288,2089	289,2162	287,2017

Po změření vzorků doplňku stravy v pozitivním i negativním módu ionizace za výchozích chromatografických podmínek uvedených v kapitole 4.6.1 bylo třeba určit hlavní obsahové látky, pro které budou následně upravovány experimentální podmínky. Chromatogramy získané z tohoto měření jsou zobrazeny na Obrázku 11. Stejně měření bylo zároveň využito pro výběr vhodného rozpouštědla, proto jsou na Obrázku 11 zobrazeny chromatogramy vzorků doplňku stravy extrahovaných v různých rozpouštědlech.

Na naměřené vzorky byla aplikována vytvořená knihovna a jako majoritní látky byly identifikovány ginsenosidy, kterým odpovídá většina nejvyšších píků. S využitím standardů ginsenosidů byla proto prováděna po jejich zakoupení optimalizace celé metody. Mezi příklady látek, které identifikovány nebyly patří např. flavonoidy apigenin a luteolin, fenolické kyseliny kyselina kávová a kyselina chlorogenová, fenylypropanoidní glykosid rosin nebo pyridinový alkaloid trigonellin.



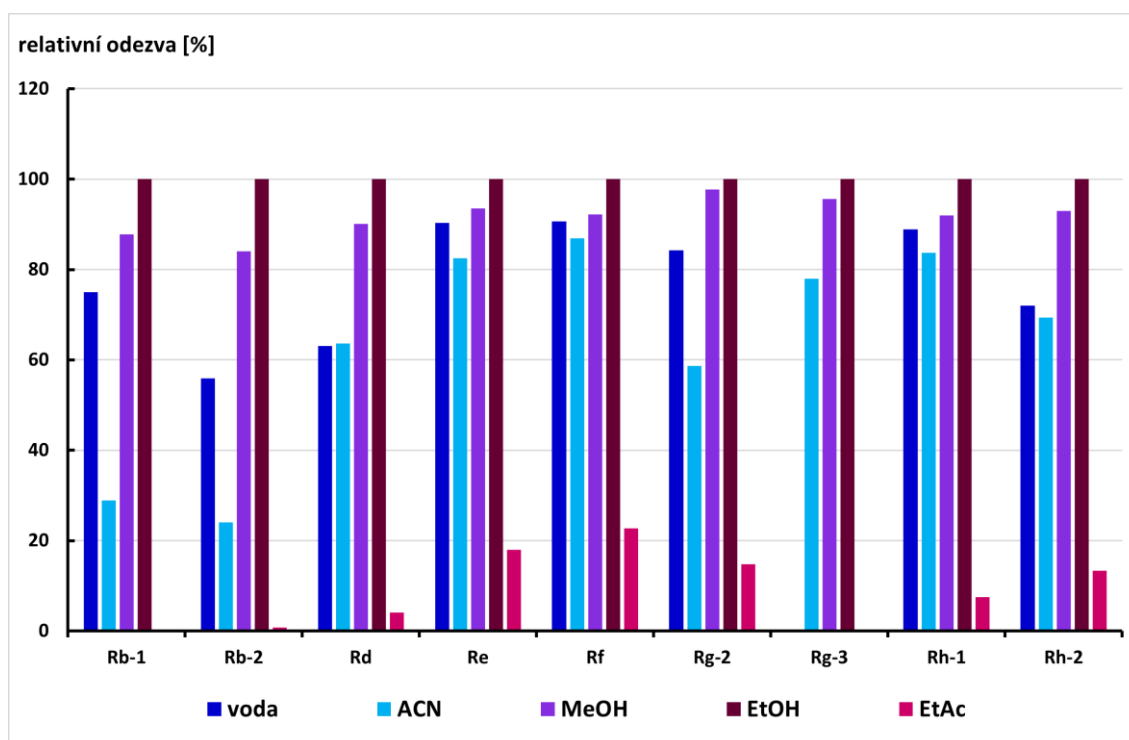
Obrázek 11: Chromatogramy vzorků doplnku stravy extrahovaných v různých rozpouštědlech změřené v pozitivním (A) i negativním (B) módu za výchozích chromatografických podmínek.

5.2 OPTIMALIZACE PŘÍPRAVY VZORKU

V rámci optimalizace přípravy vzorku bylo třeba zvolit vhodné rozpouštědlo a upravit postup rozpouštění tak, aby bylo extrahováno co největší množství látek a zároveň získána co největší odezva. Pro přípravu vzorků kapsle byla zkoušena tato rozpouštědla: voda, acetonitril (ACN), methanol (MeOH), ethanol (EtOH) a ethylacetát (EtAc). Po přidání rozpouštědla a krátkém protřepání na vortexu nedošlo ani v jednom případě k úplnému rozpuštění. Vzorky byly proto podrobeny působení ultrazvuku nejdříve po dobu 15 minut, ale výraznější zlepšení přineslo dle vizuálního zhodnocení až prodloužení doby sonifikace na 30 minut. Vzorky byly poté přefiltrovány přes membránový filtr s póry o velikosti 0,22 μm .

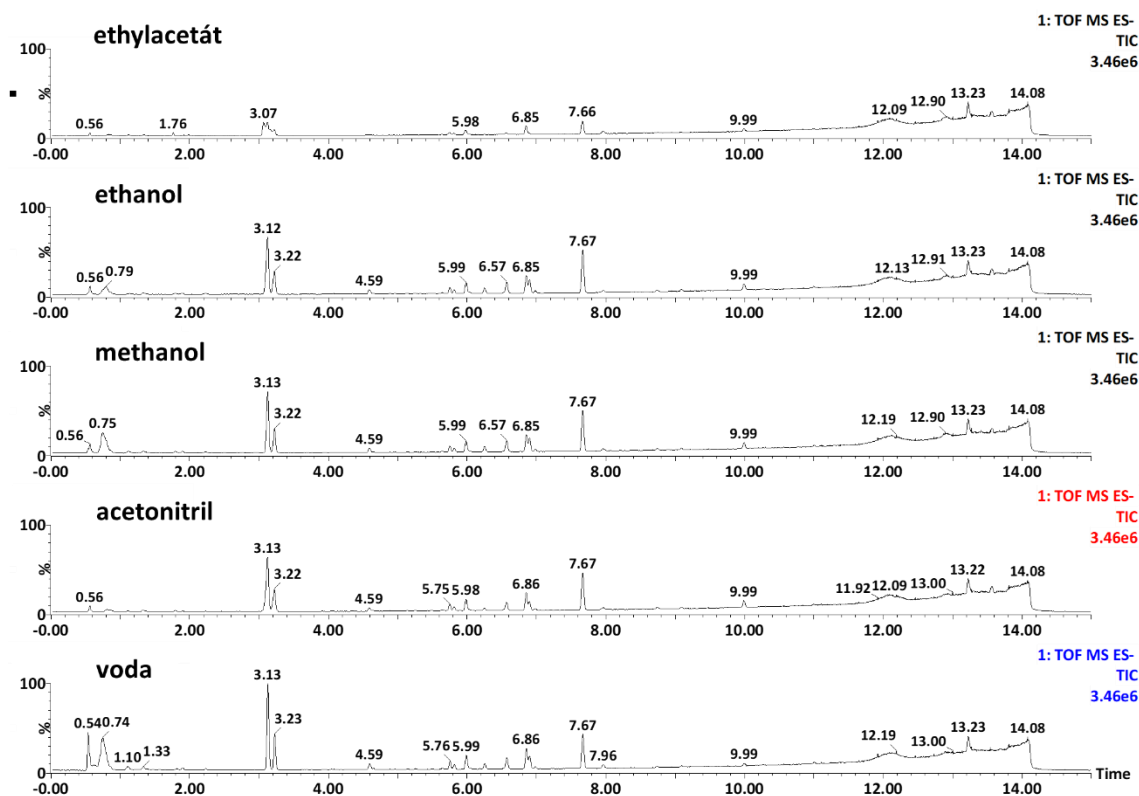
Pro výběr vhodného rozpouštědla bylo provedeno měření za výchozích chromatografických podmínek uvedených v kapitole 4.6.1 v pozitivním i negativním módu ionizace. K vyhodnocení byly využívány získané chromatogramy uvedené na Obrázku 11. Porovnáváno bylo množství extrahovaných látek. Z tohoto hlediska byl nejméně vhodným rozpouštědlem v obou módech ionizace ethylacetát. Mezi acetonitrilem, methanolem a ethanolom nebyly pozorovány významné rozdíly. Voda byla pro látky ionizující v pozitivním módu méně vhodným rozpouštědlem. V negativním módu vykazovala podobné výsledky jako acetonitril, methanol a ethanol. U methanolu a vody bylo extrahováno v obou módech ionizace více polárních látek na začátku chromatogramu. Vyšší odezva byla získána pro všechna rozpouštědla při použití negativního módu ionizace.

Pro ginsenosidy identifikované na základě aplikace vytvořené knihovny spekter byla stanovena odezva v jednotlivých rozpouštědlech v negativním módu ionizace. K vyhodnocení byly využívány průměrné plochy píků ze získaných chromatogramů. Získané hodnoty byly vztaženy k hodnotám ethanolu a vyjádřeny jako relativní odezva v procentech (Obrázek 12). Nejlepší výsledky pro dané látky přineslo použití ethanolu a methanolu. Méně vhodná byla voda a acetonitril. Voda vykazovala v porovnání s acetonitrilem lepší výsledky s výjimkou ginsenosidu Rg-3, který nebyl ve vodě extrahován. Nejnižší odezvy bylo pro všechny ginsenosidy dosaženo při použití ethylacetátu.



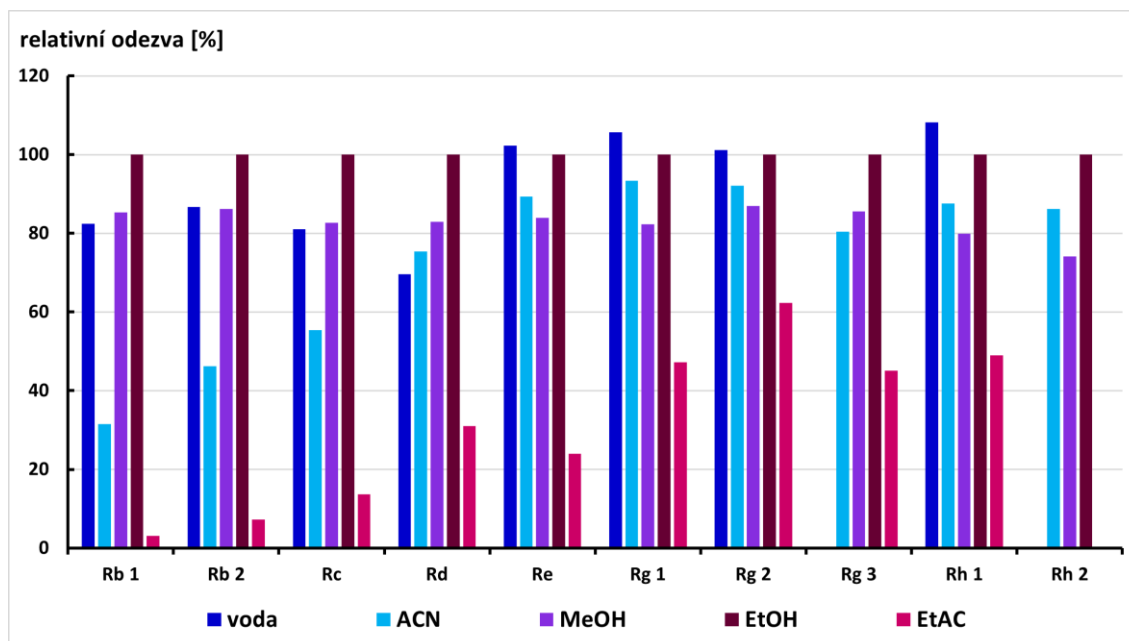
Obrázek 12: Relativní odezva ginsenosidů při měření doplňku stravy v různých rozpouštědlech v negativním módu ionizace, vztaženo k hodnotám ethanolu. ACN – acetonitril, MeOH – methanol, EtOH – ethanol, EtAc – ethylacetát.

Vliv rozpouštědel byl znovu otestován za finálních chromatografických podmínek uvedených v kapitole 4.6.2 v negativním módu ionizace. Vzorky kapslí byly připraveny stejným způsobem a 5x zředěny s výslednou koncentrací 200 µg/ml. Získané chromatogramy jsou zobrazeny na Obrázku 13. Ethylacetát byl stále jednoznačně nejméně vhodným rozpouštědlem. Mezi ostatními rozpouštědly nebyly pozorovány významné rozdíly.



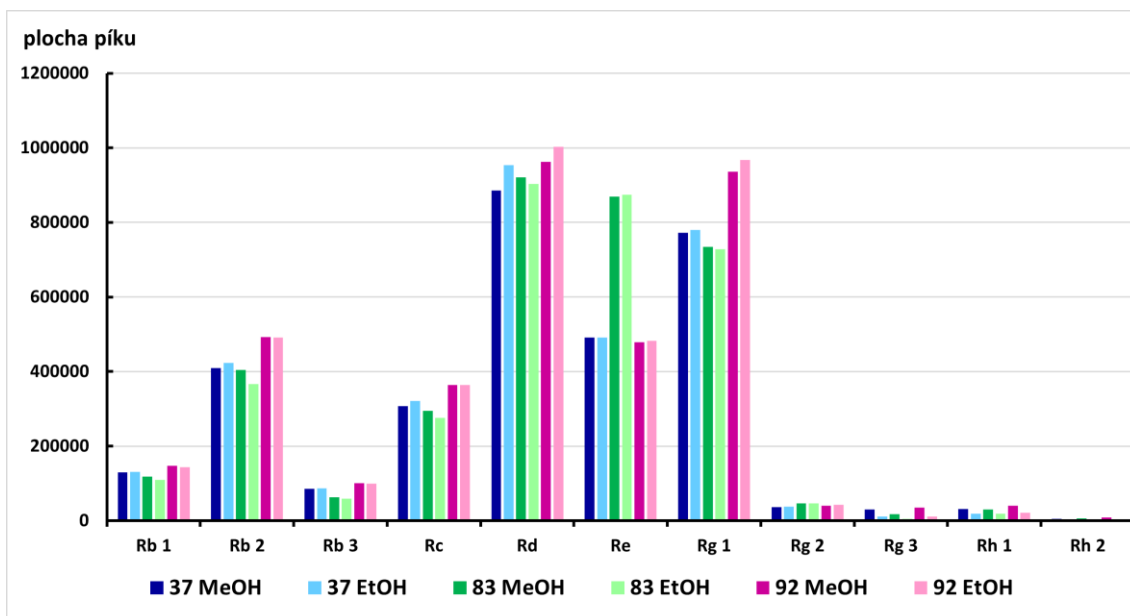
Obrázek 13: Chromatogramy vzorků doplňku stravy extrahovaných v různých rozpouštědlech změřené za finálních chromatografických podmínek v negativním módu ionizace.

Odezva v jednotlivých rozpouštědlech byla stanovena pro ginsenosidy, které byly identifikovány na základě aplikace vytvořené knihovny spekter a jejichž identita byla potvrzena shodou retenčních časů s retenčními časy jejich standardů. K vyhodnocení byly využity znovu průměrné plochy píků ze získaných chromatogramů a výsledkem je opět graf s hodnotami vztaženými k ethanolu a vyjádřenými jako relativní odezva v procentech (Obrázek 14). Ethanol a methanol byly i nadále nejlepší volbou. Oproti prvnímu testu rozpouštědel (Obrázek 12) přinášelo použití vody a acetonitrilu pro některé ginsenosidy vyšší odezvu, přestože byl postup extrakce stejný. Nejnižší odezvy bylo pro všechny ginsenosidy opět dosaženo při použití ethylacetátu.

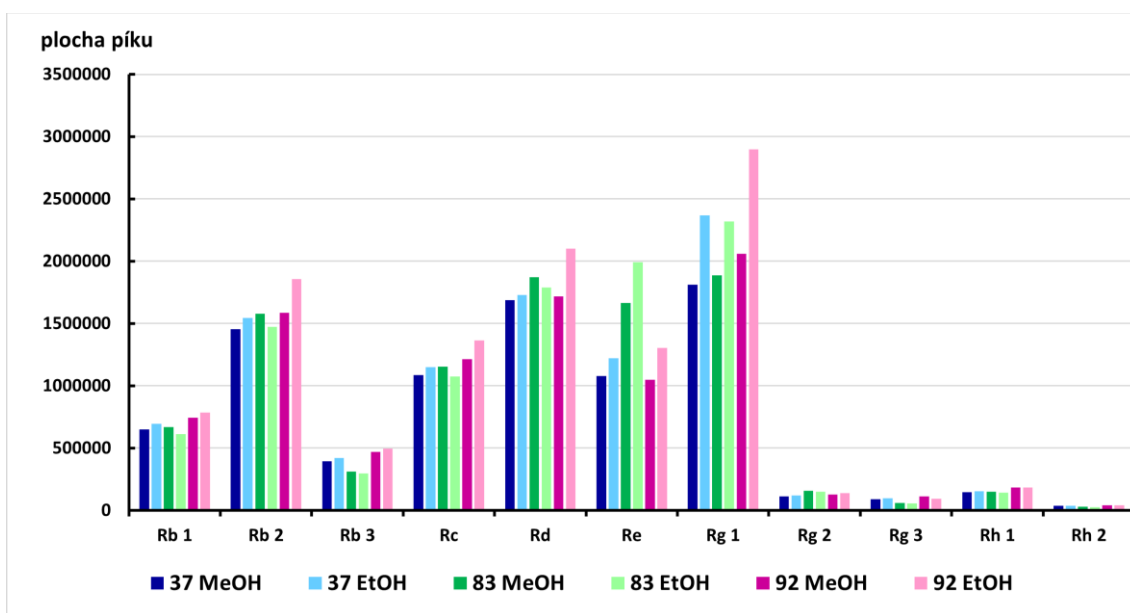


Obrázek 14: Relativní odezva ginsenosidů při měření doplňku stravy v různých rozpouštědlech za finálních chromatografických podmínek, vztaheno k hodnotám ethanolu. ACN – acetonitril, MeOH – methanol, EtOH – ethanol, EtAc – ethylacetát.

Methanol a ethanol byly znovu testovány jako rozpouštědla v rámci měření vzorků kapslí ze 3 různých šarží. Od každé šarže byly připraveny 3 vzorky. Všechny vzorky byly připraveny v koncentraci 200 µg/ml (5x zředěné) a 1 mg/ml (nezředěné) a měřeny za finálních chromatografických podmínek. Na Obrázku 15 je zobrazen graf s průměrnými plochami ginsenosidů v methanolu a v ethanolu ve 3 různých šaržích kapslí. Jedná se o kapsle 5x zředěné. Stejný graf pro kapsle nezředěné je zobrazen na Obrázku 16. Mezi jednotlivými rozpouštědly nebyly pozorovány významné rozdíly. Pro měření kapslí s přidaným testosteronem byl proto jako rozpouštědlo zvolen methanol, ve kterém testosteron vykazoval nejvyšší odezvu. Vzorky kapslí byly připravovány nezředěné kvůli získání dostatečné odezvy testosteronu a umožnění identifikace adulterace v doplňku stravy.



Obrázek 15: Porovnání průměrných ploch píků ginsenosidů v methanolu a ethanolu ve 3 různých šaržích 5x zředěných kapslí. Různými barvami jsou odlišeny různé šarže kapslí. Tmavým a světlým odstínem dané barvy pak použití methanolu nebo ethanolu. 37, 83 a 92 jsou zkrácená označení šarží 17637, 16583 a 17292.



Obrázek 16: Porovnání průměrných ploch píků ginsenosidů v methanolu a ethanolu ve 3 různých šaržích nezředěných kapslí. Různými barvami jsou odlišeny různé šarže kapslí. Tmavým a světlým odstínem dané barvy pak použití methanolu nebo ethanolu. 37, 83 a 92 jsou zkrácená označení šarží 17637, 16583 a 17292.

V rámci šarže i mezi šaržemi byla navíc z průměrných ploch píků ginsenosidů stanovena variabilita měření formou relativní směrodatné odchylky (RSD). Získané hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 8–11. RSD se pohybuje pro jednotlivé šarže v rozmezí 2,14–20,73 %, mezi šaržemi dosahuje až 35,92 %.

Tabulka 8: Variabilita měření stanovená v 5x zředěných vzorcích kapslí v methanolu.

ginsenosid	RSD šarže 37 [%]	RSD šarže 83 [%]	RSD šarže 92 [%]	RSD mezi šaržemi [%]
Rb-1	17,10	12,31	10,17	16,18
Rb-2	15,67	11,90	11,01	15,86
Rb-3	15,26	10,44	9,75	22,72
Rc	15,18	12,23	9,80	15,48
Rd	10,79	8,35	9,13	10,02
Re	10,30	7,99	7,87	30,91
Rg-1	11,35	8,32	6,78	13,91
Rg-2	10,84	9,33	8,40	14,56
Rg-3	14,38	8,45	10,36	30,22
Rh-1	12,74	12,09	5,29	15,76
Rh-2	16,96	7,72	3,69	20,87

Tabulka 9: Variabilita měření stanovená v 5x zředěných vzorcích kapslí v ethanolu.

ginsenosid	RSD šarže 37 [%]	RSD šarže 83 [%]	RSD šarže 92 [%]	RSD mezi šaržemi [%]
Rb-1	10,96	19,08	6,93	16,39
Rb-2	12,04	20,73	9,82	18,34
Rb-3	10,29	17,38	6,90	23,09
Rc	11,16	17,88	7,76	16,53
Rd	6,94	12,90	6,00	9,87
Re	7,58	11,92	4,26	31,51
Rg-1	8,71	13,58	5,09	15,44
Rg-2	5,94	12,63	4,28	12,40
Rg-3	7,54	21,20	6,93	35,92
Rh-1	7,70	10,73	4,47	9,67
Rh-2	18,23	–	–	18,23

Tabulka 10: Variabilita měření stanovená v nezřaděných vzorcích kapslí v methanolu.

ginsenosid	RSD šarže 37 [%]	RSD šarže 83 [%]	RSD šarže 92 [%]	RSD mezi šaržemi [%]
Rb-1	19,03	8,42	8,75	13,95
Rb-2	12,62	5,65	9,43	10,25
Rb-3	18,11	7,59	6,26	20,53
Rc	12,26	4,11	9,73	10,27
Rd	4,99	2,14	8,91	7,47
Re	6,32	4,35	4,00	22,98
Rg-1	8,32	3,63	2,79	7,54
Rg-2	17,85	6,13	4,94	17,10
Rg-3	15,69	9,56	9,47	27,08
Rh-1	19,00	9,43	3,79	15,97
Rh-2	18,10	8,83	3,92	20,04

Tabulka 11: Variabilita měření stanovená v nezřaděných vzorcích kapslí v ethanolu.

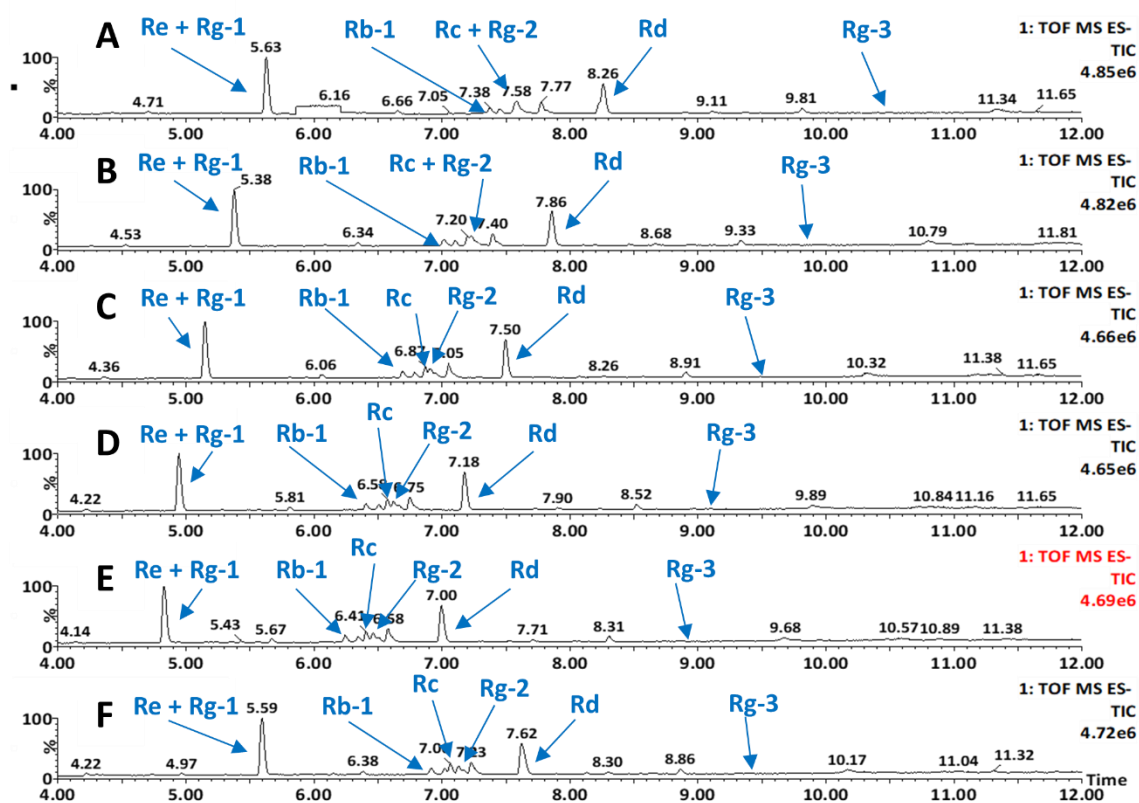
ginsenosid	RSD šarže 37 [%]	RSD šarže 83 [%]	RSD šarže 92 [%]	RSD mezi šaržemi [%]
Rb-1	10,45	15,66	8,48	15,36
Rb-2	8,78	14,94	7,74	14,68
Rb-3	9,55	13,81	8,36	22,48
Rc	8,92	13,46	8,51	14,47
Rd	5,99	11,02	11,81	13,44
Re	2,87	9,62	8,05	24,43
Rg-1	4,20	10,84	4,28	12,36
Rg-2	9,31	14,03	7,01	14,37
Rg-3	9,44	19,00	14,65	34,38
Rh-1	5,96	14,83	5,34	14,30
Rh-2	7,05	12,89	4,71	18,82

5.3 OPTIMALIZACE CHROMATOGRAFICKÝCH PODMÍNEK

U strukturně podobných látek, jako jsou ginsenosidy, je chromatografická separace důležitým krokem optimalizace. Zejména, pokud dané látky vytváří strukturní izomery (viz Obrázky 7–9). Z ginsenosidů Rb-1, Rc, Rd, Re, Rg-1, Rg-2 a Rg-3, jejichž standardy byly zakoupeny, byly kritickými páry izomerní ginsenosidy Rd + Re a Rg-2 + Rg-3. Výchozí chromatografické podmínky uvedené v kapitole 4.6.1 byly proto optimalizovány s cílem dosáhnout separace všech identifikovaných ginsenosidů. Ginsenosidy Rb-1, Rc, Rd, Rg-2 a Rg-3 byly separovány již při výchozích chromatografických podmínkách. U ginsenosidů Re a Rg-1 docházelo ke koeluci.

5.3.1 Optimalizace nastavení gradientové eluce

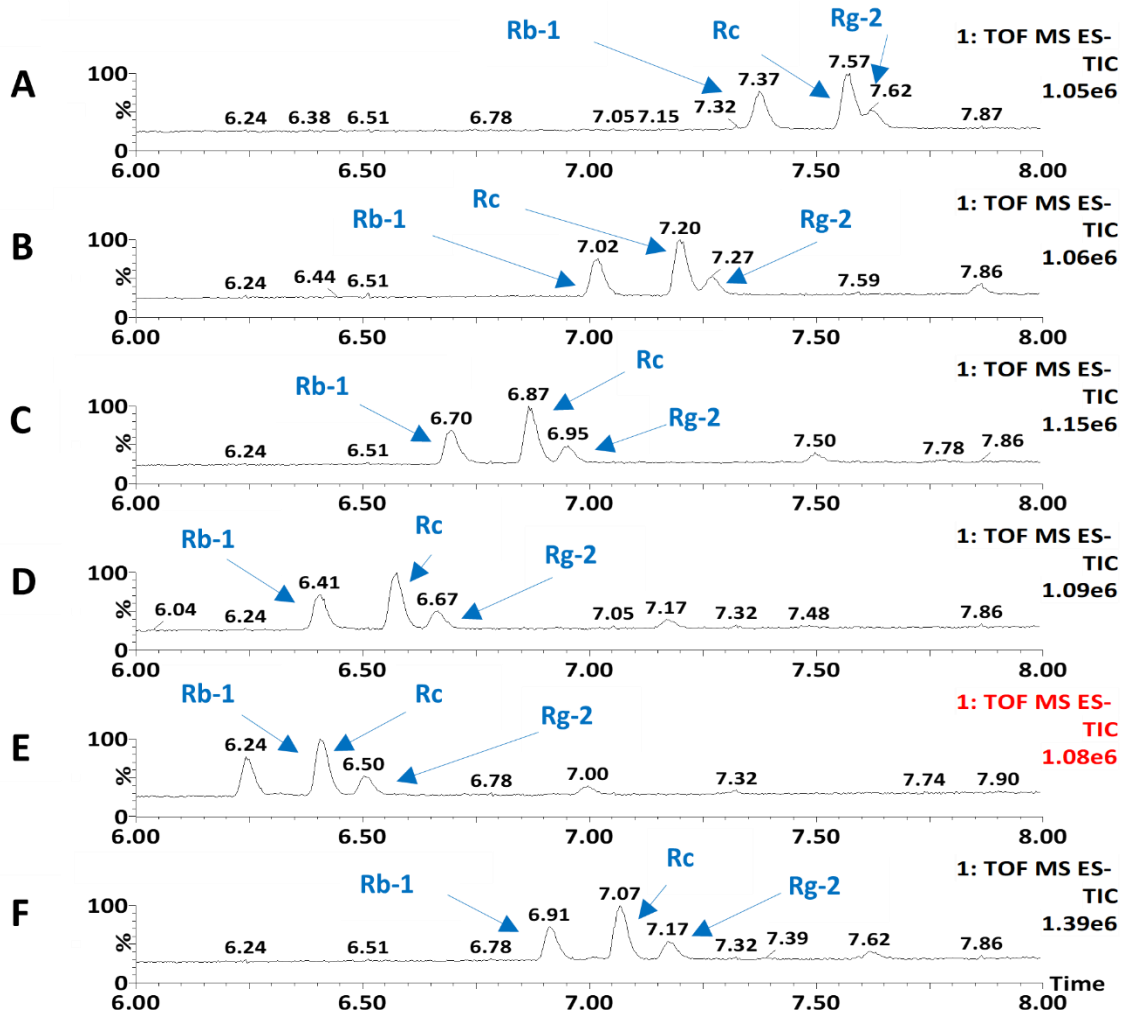
Nastavení gradientové eluce bylo optimalizováno pro ginsenosidy na vzorku kapsle v methanolu a z důvodu správné identifikace jejich píků bylo porovnáváno se směsným standardem ginsenosidů. Optimalizace probíhala na výchozí koloně Acquity UPLC BEH C18. Testováno bylo nastavení gradientové eluce 2–98 %, 5–95 %, 10–90 %, 15–85 % a 20–80 % acetonitrilu. Ve všech případech byl vynechán isokratický krok v první minutě oproti výchozím podmínkám, aby bylo rozšířeno okno gradientu. Chromatogramy vzorku kapsle s identifikovanými ginsenosidy a měnícími se podmínkami gradientové eluce jsou zobrazeny na Obrázku 17.



Obrázek 17: Separace ginsenosidů ve vzorku kapsle při různých profilech gradientové eluce. **A** – 15 min 20–80 % ACN, **B** – 15 min 15–85 % ACN, **C** – 15 min 10–90 % ACN, **D** – 15 min 5–95 % ACN, **E** – 15 min 2–98 % ACN, **F** – 1 min 2 % ACN → 15 min 2–98 % ACN.

Se zvyšujícím se podílem acetonitrilu při počátečním složení docházelo k rozšiřování separačního okna ginsenosidů. Ani v jednom případě se však nepodařilo rozdělit ginsenosid Re a Rg-1, které koeluovaly při původních podmínkách v čase 5.59. Skupina ginsenosidů Rb-1, Rc a Rg-2 s původní elucí kolem sedmé minuty byla dobře separována již při výchozích podmínkách. V jejich případě způsoboval vyšší podíl

acetonitrilu naopak zhoršení separace ginsenosidů Rc a Rg-2, jak je lépe patrné z chromatogramů směšného standardu na Obrázku 18. Celkově bylo nejvíce píků ve vzorku kapsle separovaných při gradientu 2–98 %.

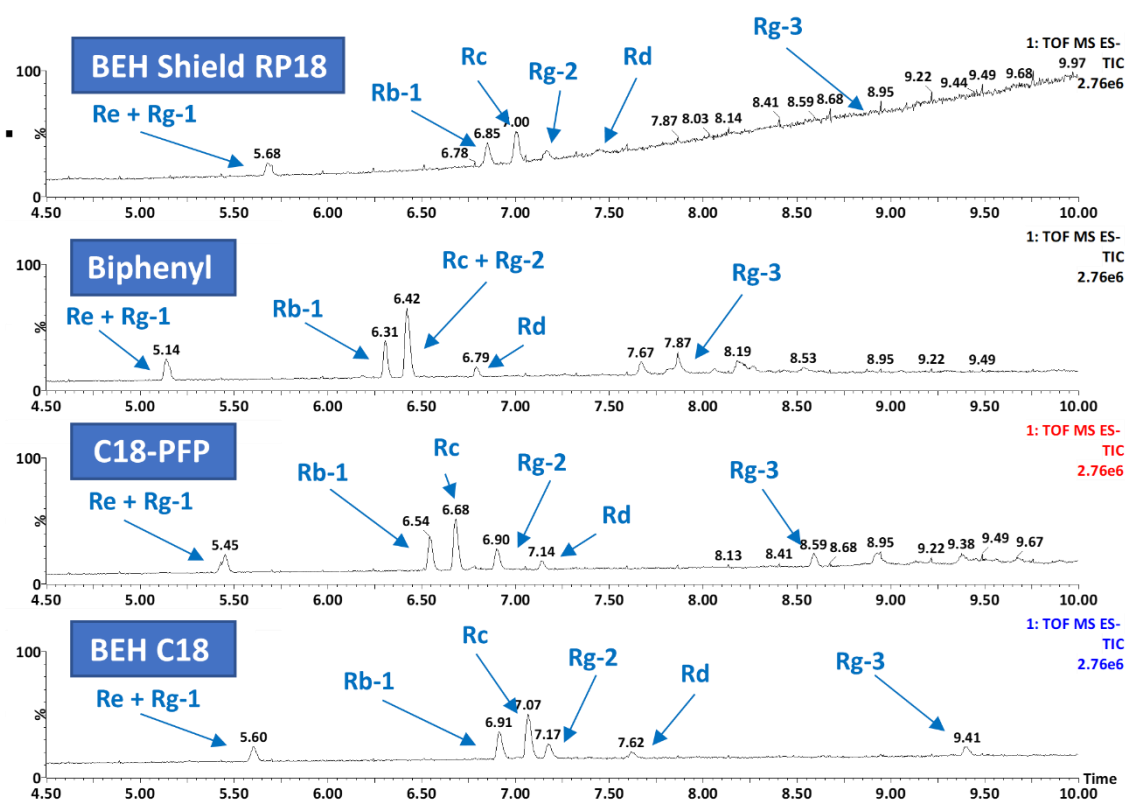


Obrázek 18: Separace ginsenosidů Rb-1, Rc a Rg-2 ve směšném standardu při různých profilech gradientové eluce. **A** – 15 min 20–80 % ACN, **B** – 15 min 15–85 % ACN, **C** – 15 min 10–90 % ACN, **D** – 15 min 5–95 % ACN, **E** – 15 min 2–98 % ACN, **F** – 1 min 2 % ACN → 15 min 2–98 % ACN.

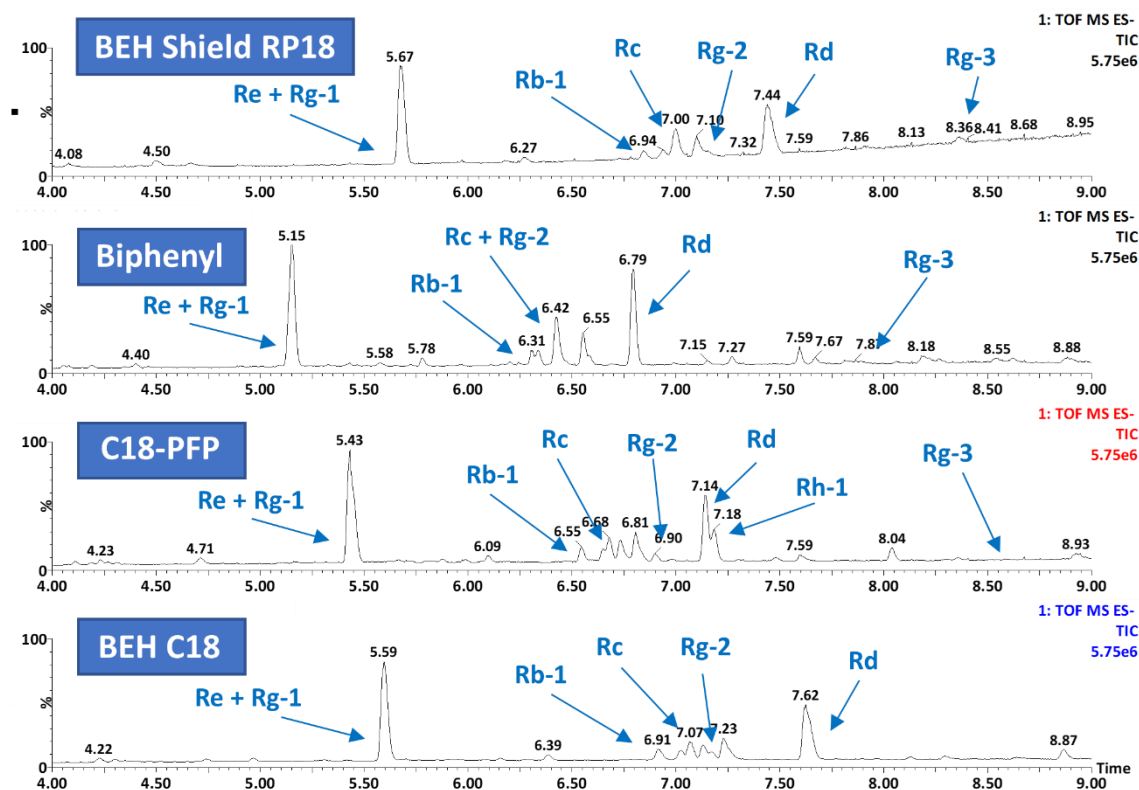
5.3.2 Porovnání stacionárních fází

Změny v profilu gradientu nebyly pro separaci směsi ginsenosidů dostatečné, proto bylo provedeno porovnání 4 stacionárních fází s odlišnými chemickými modifikacemi, a tudíž odlišnou selektivitou. Retence a selektivita separace ginsenosidů byla hodnocena ve vzorku kapsle v methanolu a v jejich směsném standardu. Použité kolony a podmínky měření jsou uvedeny v kapitole 4.6.3. Chromatogram směsného standardu ginsenosidů je na Obrázku 19. Jako nevhodná se ukázala kolona Kinetex Biphenyl, u které dochází ke koeluci ginsenosidů Rc a Rg-2. Na koloně Acquity BEH Shield RP18 sice eluuje všech 7 ginsenosidů, píky ginsenosidu Rd a Rg-3 mají ale velmi nízkou odezvu.

Nejlepší výsledků bylo dosaženo na koloně ACE Excel C18-PFP, na jejímž chromatogramu je v čase 5.45 vidět náznak možné separace dvojice ginsenosidů Re a Rg-1. Ve vzorku kapsle (Obrázek 20) dochází navíc oproti výchozí koloně Acquity UPLC BEH C18 k eluci dalšího analytu v čase 7.18. Ten byl později pomocí nového standardu identifikován jako ginsenosid Rh-1.



Obrázek 19: Separace směsného standardu ginsenosidů na 4 různých kolonách.



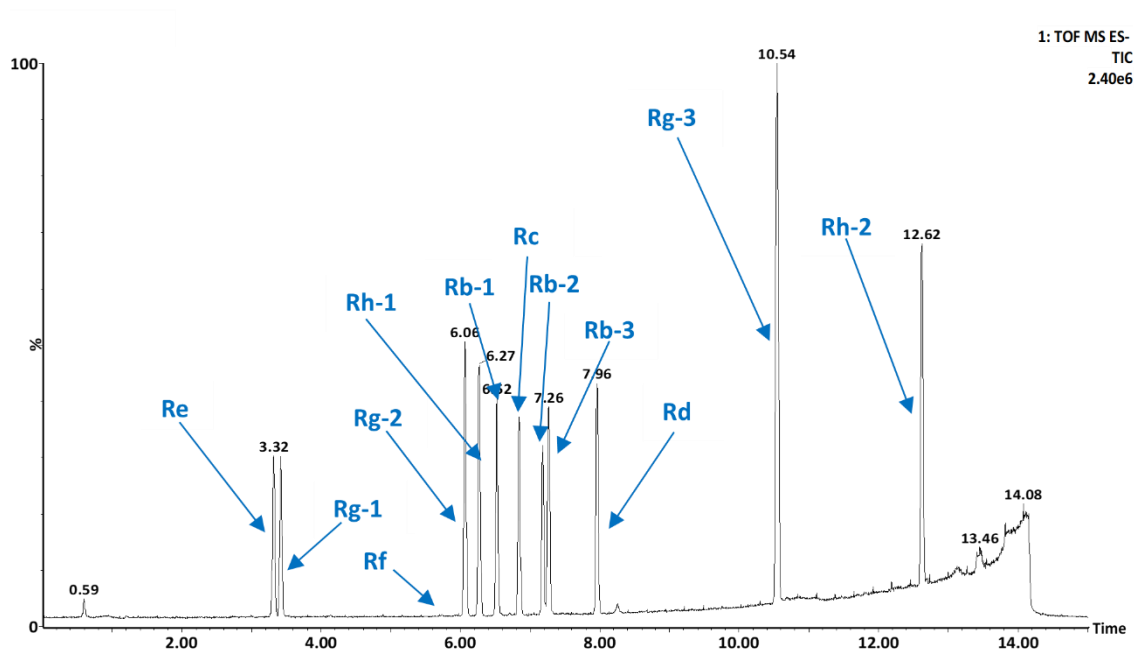
Obrázek 20: Separace ginsenosidů ve vzorku kapsle na 4 různých kolonách.

5.3.3 Finální chromatografické podmínky

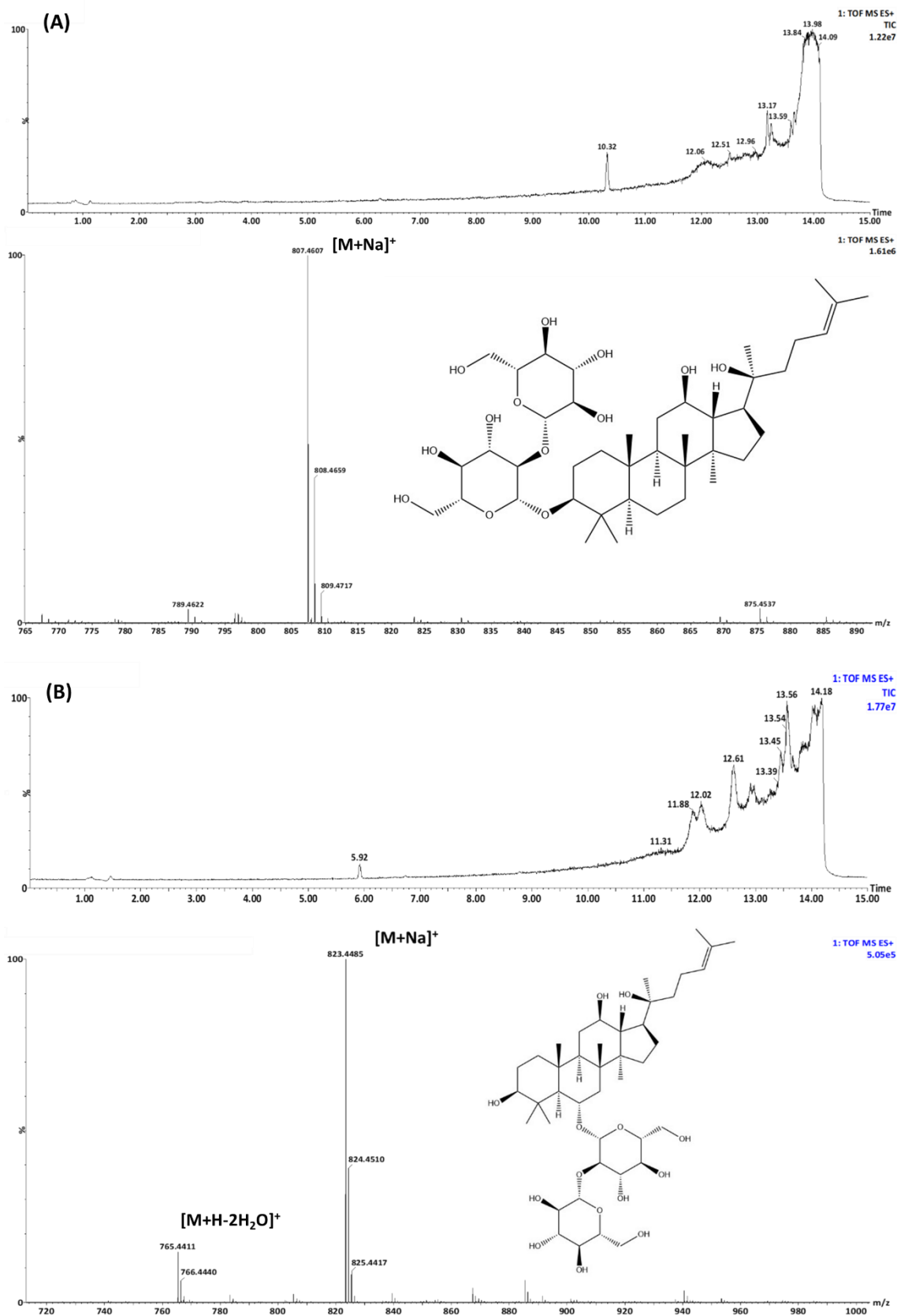
Z důvodu komplexnosti problematiky separace strukturně podobných ginsenosidů na ni byl zaměřen samostatný projekt. V rámci něho probíhala další podrobná optimalizace chromatografických podmínek na směsném standardu 12 ginsenosidů. K původním 7 bylo zakoupeno 5 nových na základě podrobné analýzy HRMS dat. Byl proveden screening 14 chromatografických kolon. S kolonami, které poskytovaly nejlepší výsledky, bylo optimalizováno nastavení gradientové eluce. Proběhla také optimalizace složení mobilní fáze. Tyto výsledky nejsou v této diplomové práci podrobně uvedeny, neboť jejich autorkou je jiná studentka.

Optimalizované chromatografické podmínky byly převzaty a otestovány na směsném standardu všech 12 ginsenosidů a zároveň na vzorku kapsle. Chromatogram směsného standardu všech 12 ginsenosidů je zobrazen na Obrázku 21. Povedlo se rozdělit ginsenosid Re a Rg-1, ale problémovou dvojicí zůstávají ginsenosidy Rb-2 a Rb-3, které nejsou zcela separované. Ginsenosid Rf koeluuje s ginsenosidem Rg-3 v čase 10.54. Později bylo zjištěno, že firma zaslala nesprávný standard tohoto ginsenosidu. Podle

spektra této látky by to mohl být ginsenosid Rg-3. Pro porovnání je na Obrázku 22 zobrazen chromatogram a spektrum standardu ginsenosidu Rf nesprávného a standardu ginsenosidu Rf získaného na konci experimentu od jiné firmy. Struktury se liší polohou cukerných zbytků a jednou hydroxylovou skupinou. Při syntéze tak pravděpodobně došlo k nesprávnému navázání cukerných zbytků na C3 místo C6. Na Obrázku 21 je naznačeno, kde eluuje správný ginsenosid Rf.

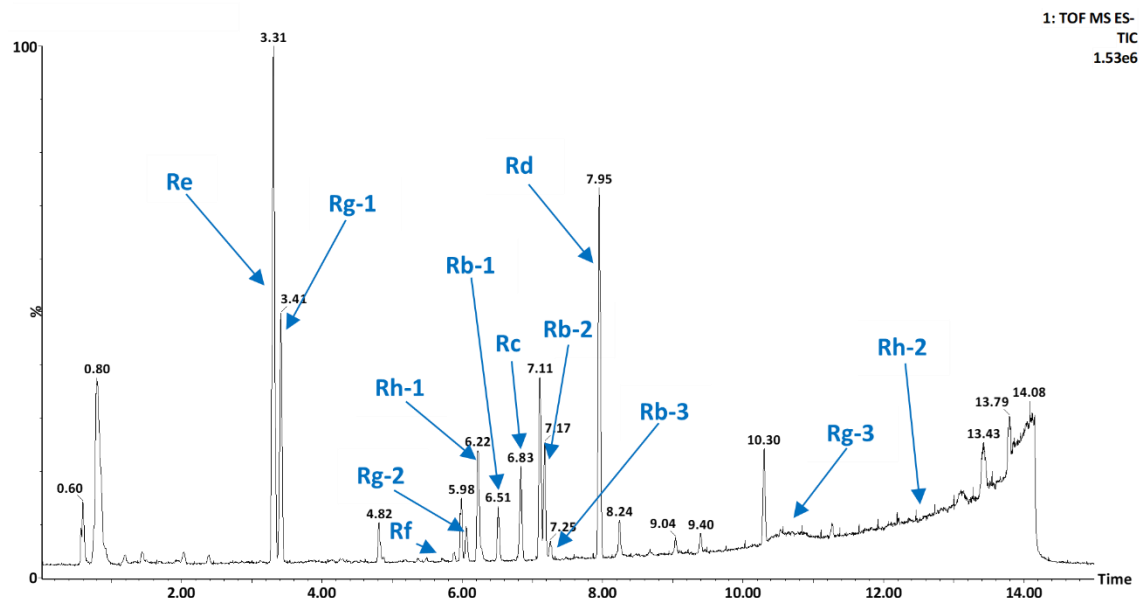


Obrázek 21: Separace ginsenosidů v jejich směsném standardu za převzatých chromatografických podmínek.



Obrázek 22: Porovnání chromatogramů a spekter standardů ginsenosidu Rf. V horní části (A) je zobrazen nesprávný standard. Pravděpodobně jde o ginsenosid Rg-3 s $[M+H]^+$ 785,5046 a $[M-H]^-$ 783,4900. V dolní části (B) je zobrazen správný standard ginsenosidu Rf s $[M+H]^+$ 801,4955 a $[M-H]^-$ 799,4849.

Na Obrázku 23 je zobrazen chromatogram vzorku kapsle v methanolu změřený za převzatých chromatografických podmínek. Bylo identifikováno všech 12 ginsenosidů.



Obrázek 23: Separace ginsenosidů ve vzorku kapsle v methanolu za převzatých chromatografických podmínek.

Převzaté chromatografické podmínky byly otestovány, upraveny pro UHPLC-HRMS a používány pro další měření jako finální chromatografické podmínky této metody. Uvedené jsou v kapitole 4.6.2.

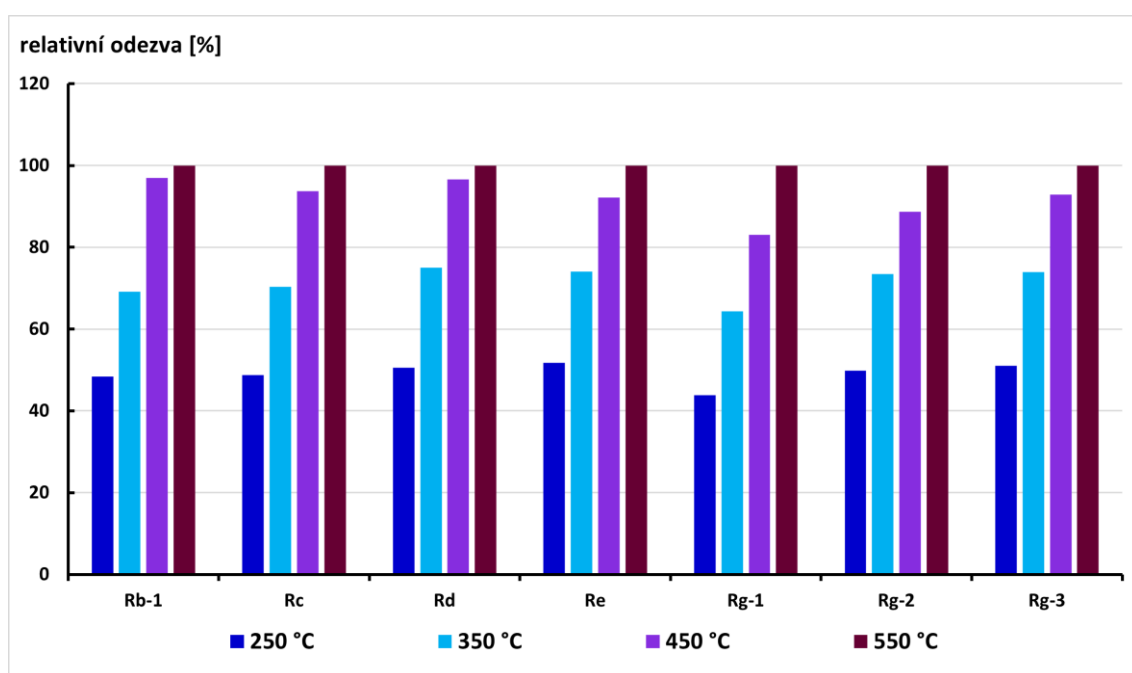
5.4 OPTIMALIZACE MS PODMÍNEK

5.4.1 Optimalizace nastavení iontového zdroje

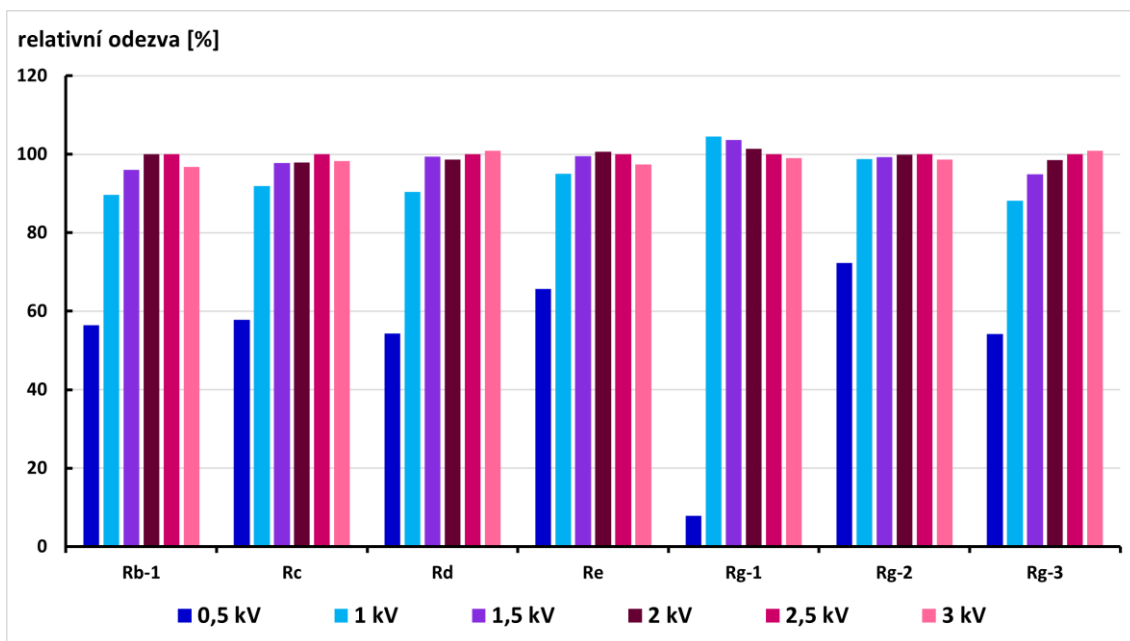
K optimalizaci nastavení iontového zdroje byl využíván směsný standard ginsenosidů, které byly identifikovány jako hlavní obsahové látky ve vzorku kapsle. Jelikož vykazovaly vyšší intenzitu v negativním módu ionizace, probíhala optimalizace parametrů iontového zdroje v tomto módu. Optimalizovány byly tyto parametry: napětí na vstupním kuželu, napětí na kapiláře, desolvatační teplota a rychlost průtoku desolvatačního plynu. Rozsah testovaných hodnot je uveden v kapitole 4.6.4. K vyhodnocení byly využívány průměrné plochy píků ze získaných chromatogramů.

Nejvýraznější trend byl zaznamenán u desolvatační teploty, kdy se s rostoucí teplotou zvyšovala odezva všech ginsenosidů. Vybrána byla proto nejvyšší testovaná hodnota, tedy 550 °C. V případě napětí na kapiláře nebyly vhodné 2 nejnižší testované hodnoty,

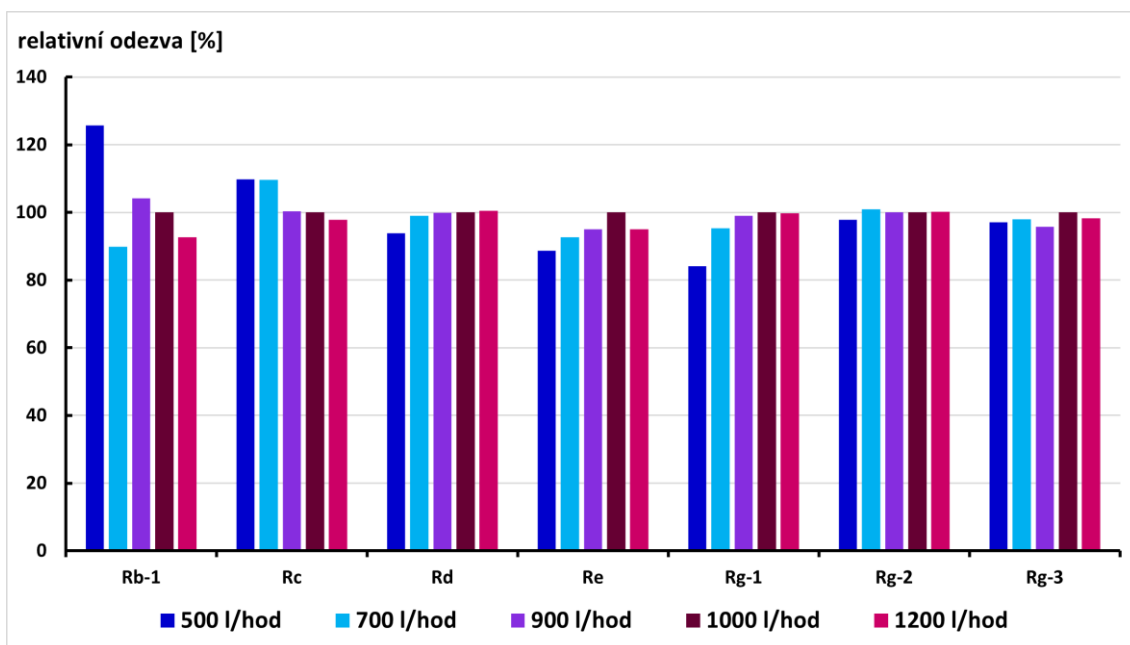
tedy 0,5 kV a 1 kV. Pro ostatní hodnoty byla odezva velmi podobná, napětí na kapiláře bylo proto ponecháno na původních 2,5 kV. Pro rychlost průtoku desolvatačního plynu byla jako kompromis zvolena hodnota, která byla optimální asi pro polovinu ginsenosidů, tedy 1000 l/hod. V případě napětí na vstupním kuželu byly pozorovány minimální rozdíly mezi získanými odezvami ginsenosidů v širokém rozmezí testovaných hodnot. Mírný pokles byl zaznamenán pro testovaná napětí 60, 65 a 70 V, ale mimo toto rozmezí nemělo napětí na vstupním kuželu vliv na odezvy ginsenosidů, a bylo proto ponecháno na původních 40 V. Vliv jednotlivých parametrů zobrazují grafy na Obrázcích 24–27.



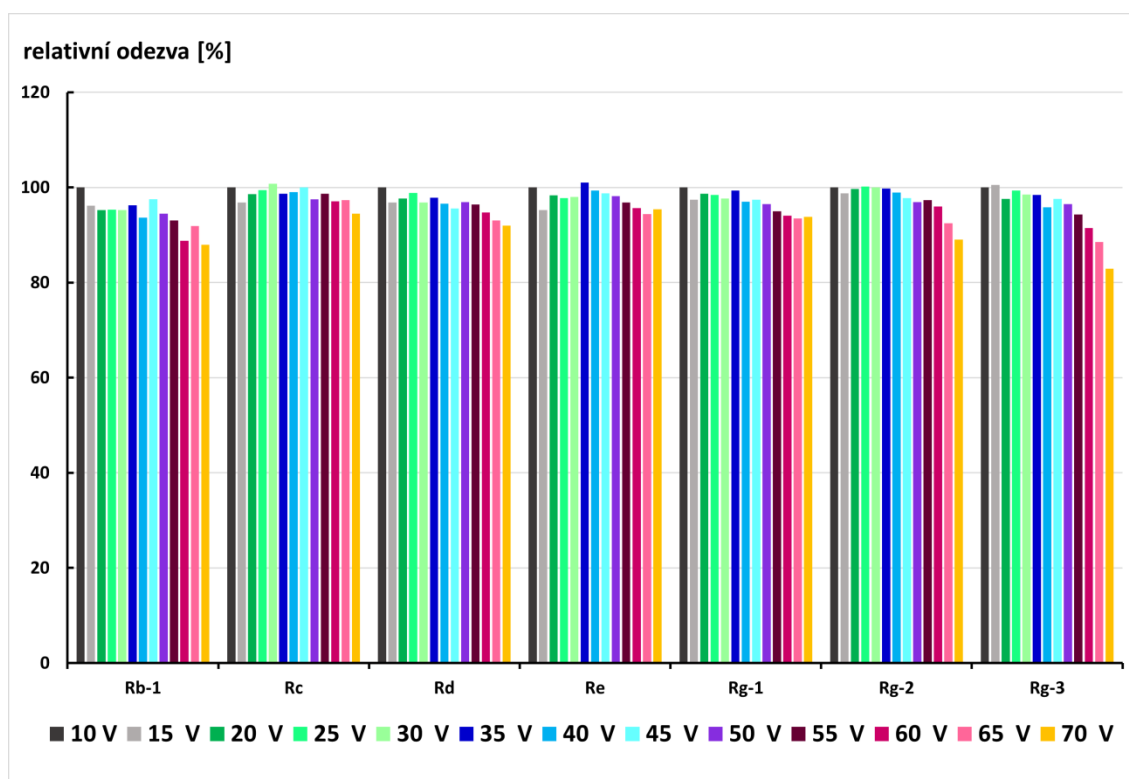
Obrázek 24: Relativní odezva ginsenosidů při optimalizaci desolvatační teploty. Vztaženo k hodnotám při 550 °C.



Obrázek 25: Relativní odezva ginsenosidů při optimalizaci napětí na kapiláře. Vztaženo k hodnotám při 2,5 kV.



Obrázek 26: Relativní odezva ginsenosidů při optimalizaci rychlosti průtoku desolvatačního plynu. Vztaženo k hodnotám při 1000 l/hod.



Obrázek 27: Relativní odezva ginsenosidů při optimalizaci napětí na vstupním kuželu. Vztaženo k hodnotám při 10 V.

5.4.2 Optimalizace kolizní energie

Kolizní energie byla optimalizována nejdříve v negativním a poté také v pozitivním módu ionizace. K optimalizaci byl využit směsný standard ginsenosidů. Cílem bylo nalézt optimální rozmezí kolizní energie k zajištění dostatečné fragmentace všech testovaných ginsenosidů a zároveň zachování iontu prekursoru v nízké intenzitě. Data byla sbírána metodou datově nezávislého skenu. Při ní je získáno MS spektrum všech iontů ve stanoveném rozsahu m/z a zároveň i jejich MS/MS spektrum, protože dojde k fragmentaci všech detekovatelných iontů. Bylo provedeno několik experimentů s postupně se měnící spodní a horní hodnotou rozmezí. K vyhodnocení byla využívána spektra jednotlivých ginsenosidů a hodnoty kolizní energie byly upravovány na základě počtu a intenzity viditelných fragmentů.

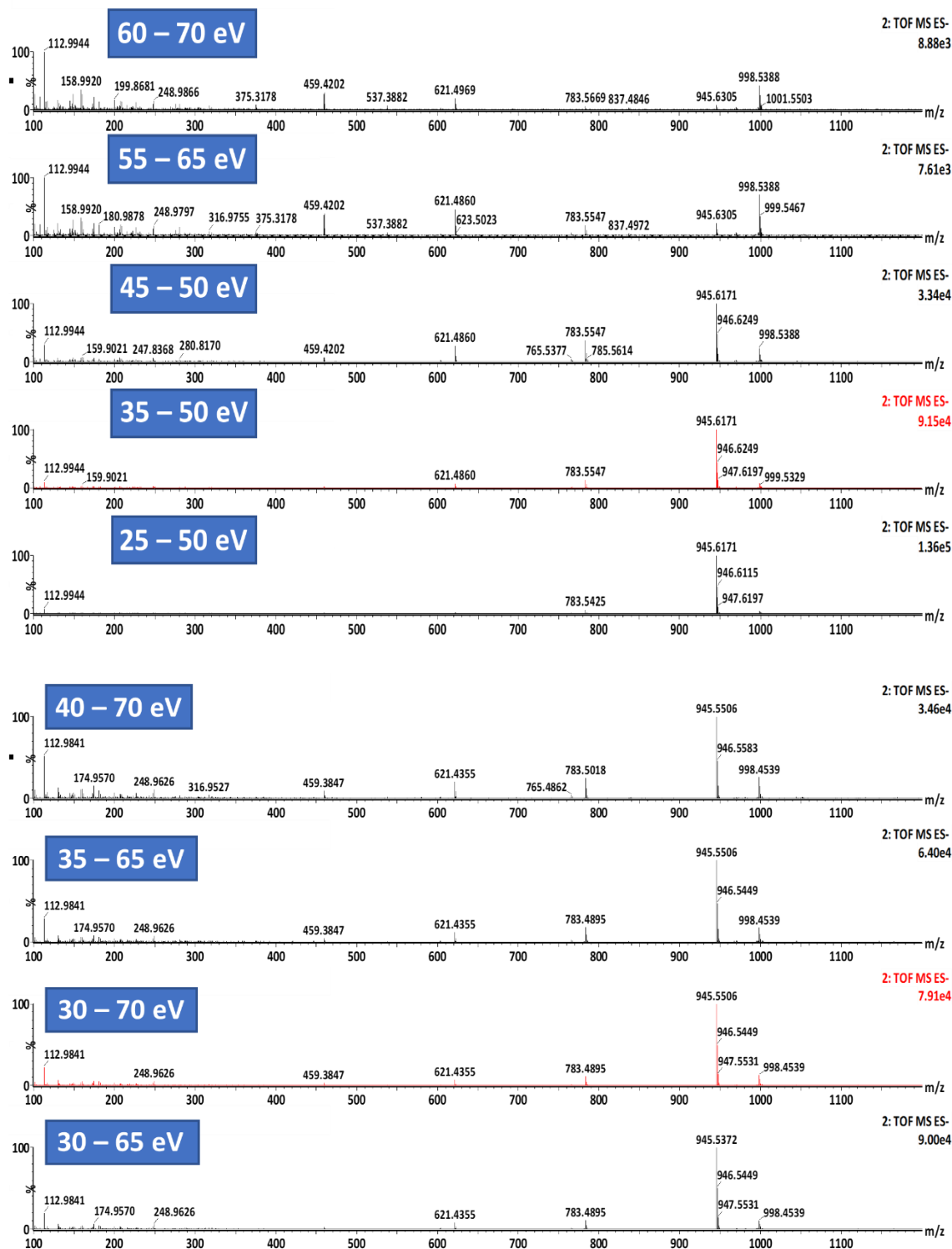
V první řadě byla testována následující rozmezí kolizní energie v negativním módu ionizace: 25–50 eV, 35–50 eV, 45–50 eV, 55–65 eV a 60–70 eV. Pro většinu ginsenosidů se ukázala jako nejvýhodnější rozmezí 35–50 eV a 45–50 eV, při kterých byly v MS/MS spektru přítomny fragmenty o dostatečné intenzitě. Při 25–50 eV ginsenosidy

nefragmentovaly vůbec nebo poskytovaly fragmenty o nízké intenzitě. Při vyšších hodnotách kolizní energie už se intenzita většiny fragmentů dále nezvyšovala a některé z nich už naopak na intenzitě ztrácely. V MS/MS spektru byly při hodnotách 55–65 eV a 60–70 eV přítomny nové nespecifické fragmenty o nízké intenzitě.

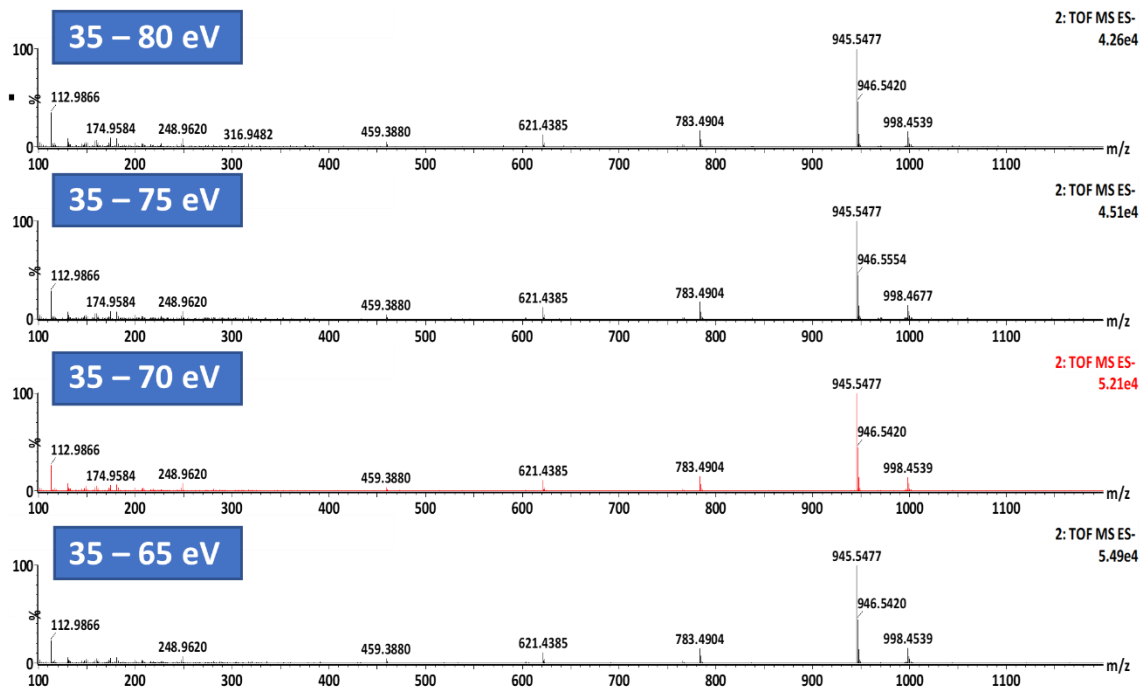
V další části experimentu byla zkoušena širší rozmezí kolizní energie s dolní hraniční hodnotou na minimálně 30 eV a to: 30–65 eV, 30–70 eV, 35–65 eV a 40–70 eV. Intenzita většiny fragmentů se zvyšovala až do 35–65 eV. Při 40–70 eV již k dalšímu nárůstu intenzity fragmentů nedocházelo. Při posledním kroku optimalizace kolizní energie tak byla ponechána spodní hodnota rozmezí na 35 eV a měnila se hranice horní. Mezi 35–65 eV, 35–70 eV, 35–75 eV a 35–80 eV už nebyly pozorovány významné rozdíly v intenzitě jednotlivých fragmentů, a proto bylo zvoleno jako optimální rozmezí kolizní energie pro negativní mód ionizace 35–65 eV. Příklady spekter ginsenosidu Rd a Rg-2 při měnících se hodnotách kolizní energie jsou uvedeny na Obrázku 28–31. U ostatních ginsenosidů docházelo k podobnému způsobu fragmentace.

V případě pozitivního módu ionizace byly výsledky obdobné. Nejdříve byly zkoušeny hodnoty kolizní energie 25–50 eV, 30–55 eV, 35–60 eV, 40–65 eV a 45–70 eV. Jako optimální rozmezí pro většinu ginsenosidů se jevílo 35–60 eV. Při pozdějším porovnání s 35–65 eV, 35–70 eV, 35–75 eV a 35–80 eV bylo ale nakonec znovu zvoleno 35–65 eV stejně jako pro negativní mód ionizace.

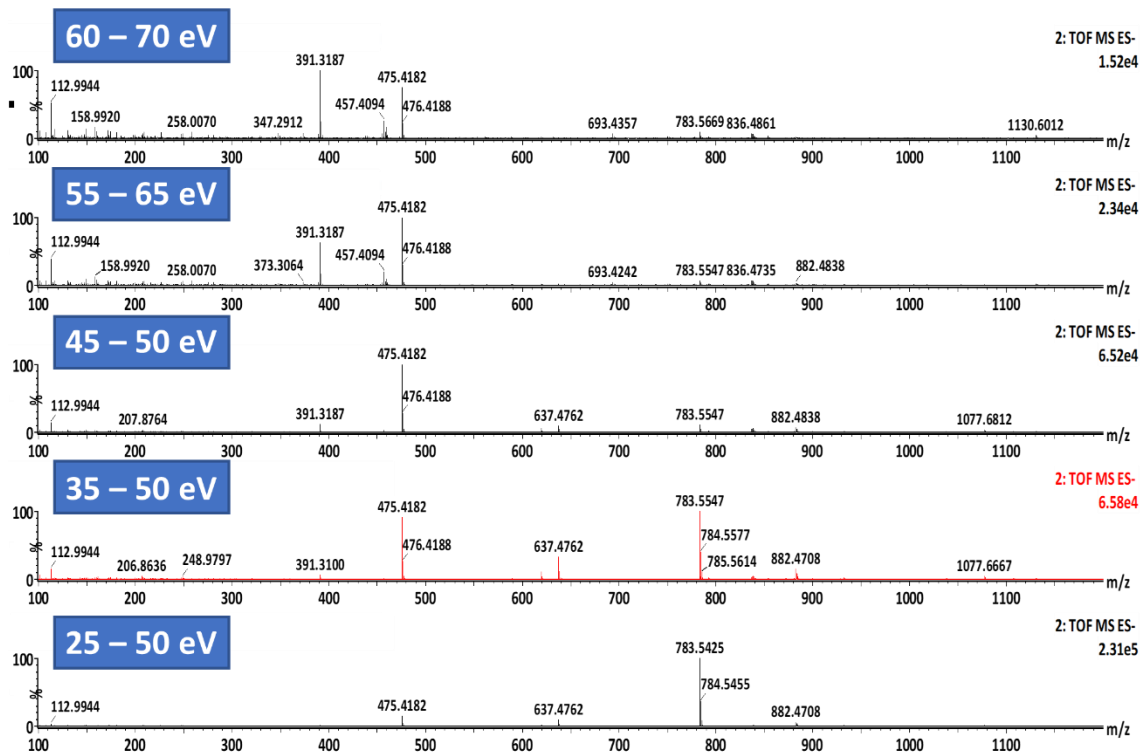
V příloze jsou zobrazena všechna naměřená MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rb-1, Rb-2, Rb-3, Rc, Rd, Re, Rg-1, Rg-2, Rg-3, Rh-1 a Rh-2 v pozitivním i negativním módu.



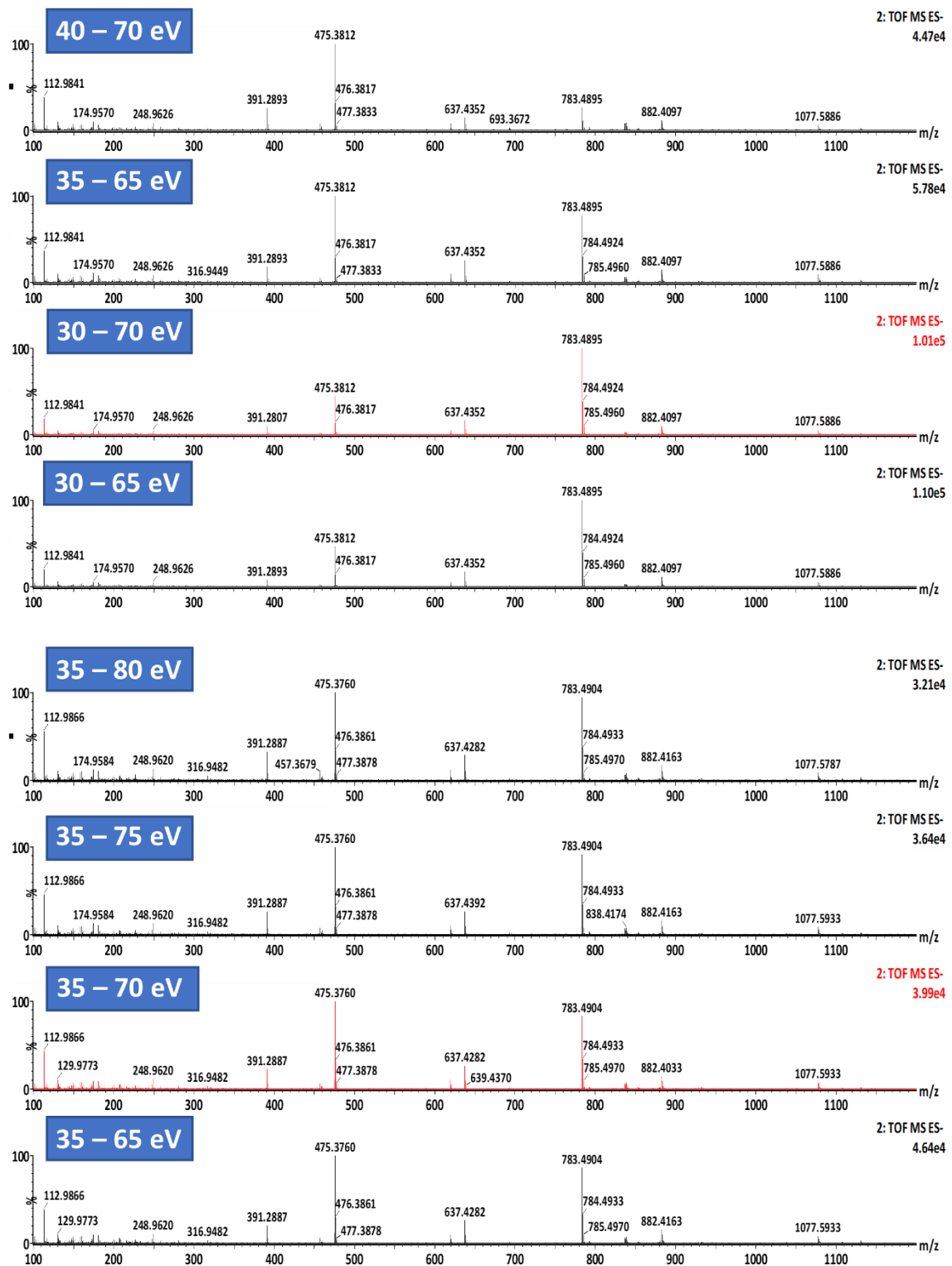
Obrázek 28: MS/MS spektra ginsenosidu Rd při optimalizaci kolizní energie v negativním módu ionizace. m/z 945,5477 odpovídá $[M-H]^-$.



Obrázek 29: MS/MS spektra ginsenosidu Rd při optimalizaci kolizní energie v negativním módu ionizace II. m/z 945,5477 odpovídá $[M-H]^-$.



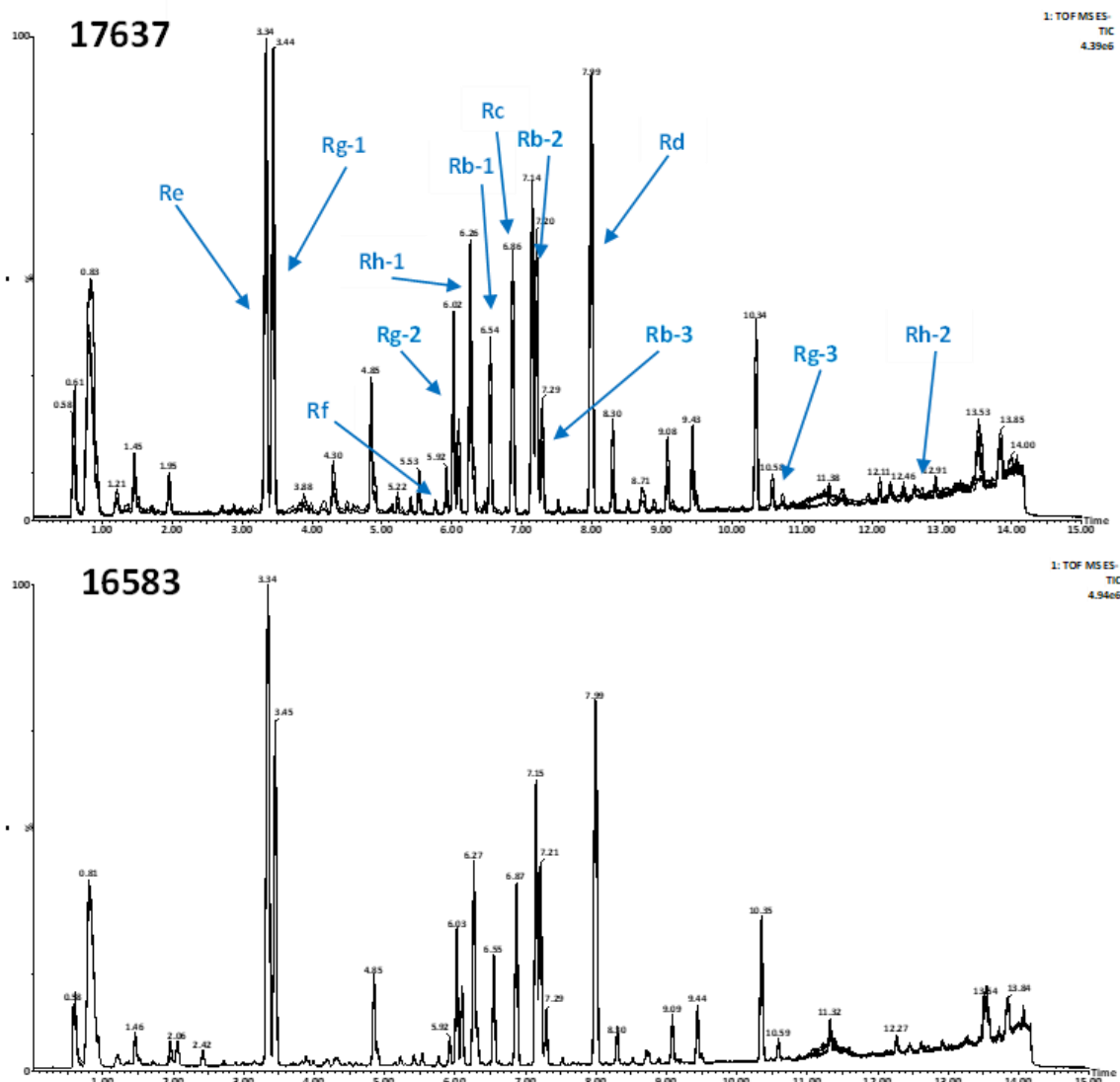
Obrázek 30: MS/MS spektra ginsenosidu Rg-2 při optimalizaci kolizní energie v negativním módu ionizace. m/z 783,4904 odpovídá $[M-H]^-$.



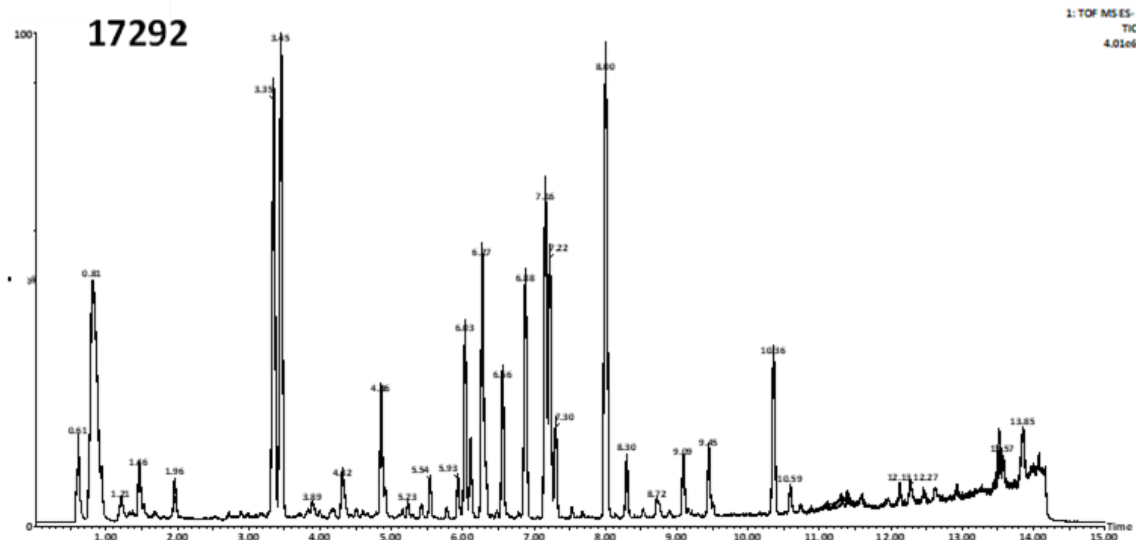
Obrázek 31: MS/MS spektra ginsenosidu Rg-2 při optimalizaci kolizní energie v negativním módu ionizace II. m/z 783,4904 odpovídá $[M-H]^-$.

5.5 HODNOCENÍ OBSAHOVÝCH LÁTEK DOPLŇKU STRAVY

Za chromatografických podmínek uvedených v kapitole 4.6.2 byly změřeny vzorky kapslí ze 3 různých šarží v negativním módu ionizace. Od každé šarže byly připraveny 3 vzorky. Všechny vzorky byly připraveny v koncentraci 200 $\mu\text{g/ml}$ (5x zředěné) a 1 mg/ml (nezředěné). Na Obrázcích 32 a 33 jsou zobrazeny pro příklad chromatogramy nezředěného vzorku kapsle v methanolu ve 3 různých šaržích. Chromatogramy jednotlivých vzorků v rámci šarže jsou přes sebe překryty pro znázornění opakovatelnosti měření. Ve vzorcích kapslí bylo identifikováno 12 ginsenosidů.



Obrázek 32: Chromatogramy nezředěného vzorku kapsle v methanolu v šaržích 17637 a 16583. Chromatogramy jednotlivých vzorků v rámci šarže jsou přes sebe překryty pro znázornění opakovatelnosti měření.



Obrázek 33: Chromatogramy nezřaděného vzorku kapsle v methanolu v šarži 17292. Chromatogramy jednotlivých vzorků v rámci šarže jsou přes sebe překryty pro znázornění opakovatelnosti měření.

Porovnáním ploch ginsenosidů v jejich standardech a v kapslích doplňku stravy byla vypočtena přibližná koncentrace ginsenosidů v kapslích ve 3 různých šaržích. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Přibližné koncentrace ginsenosidů ve vzorcích doplňku stravy.

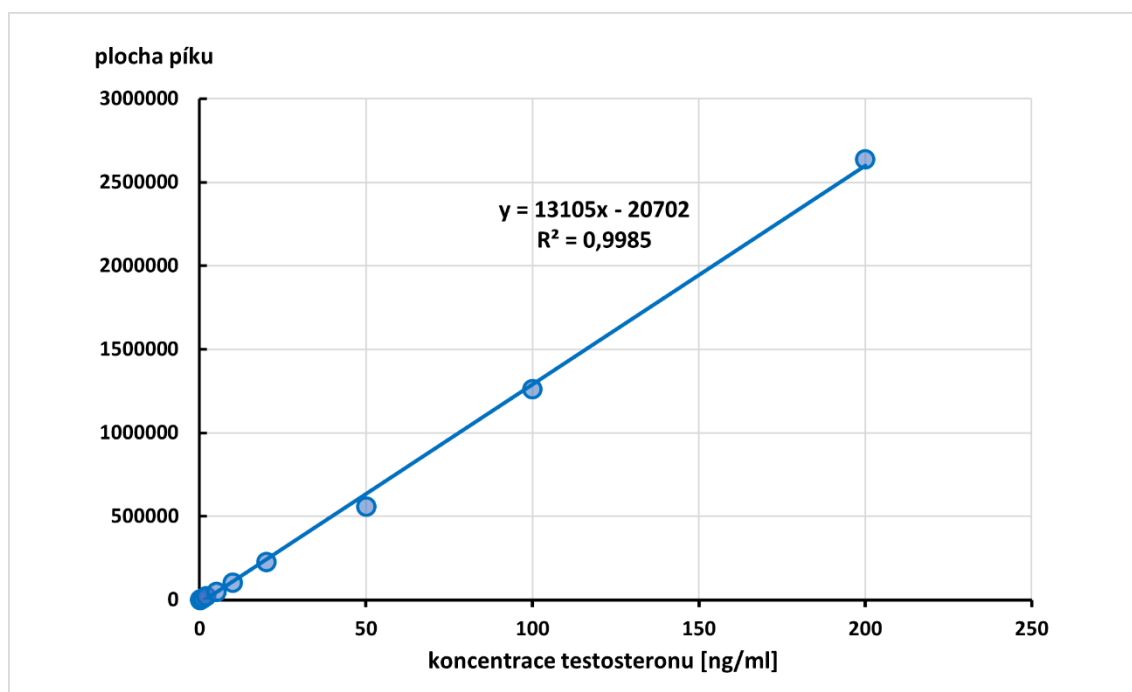
ginsenosid	koncentrace [$\mu\text{g/ml}$]		
	šarže 17637	šarže 16583	šarže 17292
Rb-1	0,96	0,84	1,23
Rb-2	2,64	2,50	3,52
Rb-3	0,26	0,36	0,21
Rc	1,89	1,78	2,43
Rd	5,41	5,57	6,36
Re	6,61	12,25	7,06
Rg-1	5,49	5,22	7,20
Rg-2	0,33	0,48	0,40
Rg-3	0,04	0,02	0,05
Rh-1	1,41	1,41	1,95
Rh-2	0,02	0,02	0,03

5.6 HODNOCENÍ ADULTERACE DOPLŇKU STRAVY

5.6.1 Kalibrační závislost testosteronu

Pro zjištění limitu detekce byla před měřením vzorků kapslí s přidaným testosteronem změřena kalibrační závislost testosteronu v rozsahu 0,1 ng/ml až 500 ng/ml. Měření probíhalo za chromatografických podmínek uvedených v kapitole 4.6.2 v pozitivním módu ionizace, ve kterém poskytoval testosteron vyšší odezvu.

Na Obrázku 34 je zobrazena kalibrační křivka spolu s rovnicí přímky a korelačním koeficientem. Limit detekce byl stanoven na 0,5 ng/ml a kalibrační rozmezí na 0,5 ng/ml – 200 ng/ml.



Obrázek 34: Kalibrační křivka testosteronu.

5.6.2 Měření vzorků kapslí s přidaným testosteronem

Vzorky kapslí s přídavkem testosteronu byly připraveny ve 3 koncentračních hladinách: 0,5; 5 a 20 ng/ml. Nejnižší hladina byla zvolena podle stanoveného limitu detekce testosteronu. Další dvě hladiny byly zvoleny uprostřed kalibračního rozmezí. Byly použity 3 kapsle od každé ze 3 různých šarží doplňku stravy. Pro každou kapsli byly připraveny 2 x 3 vzorky – s koncentrací testosteronu 0,5 ng/ml; 5 ng/ml a 20 ng/ml. Pro porovnání byl od každé šarže také použit vzorek kapsle bez přidaného testosteronu. Postup přípravy vzorků je uveden v kapitole 4.5.9.

Ze získaných průměrných ploch píků testosteronu byla vypočtena koncentrace testosteronu v měřených vzorcích s jeho přídavkem. K výpočtu byla využita rovnice kalibrační přímky testosteronu získaná při měření jeho kalibrační závislosti. Zároveň byla stanovena přesnost a správnost v rámci šarží a mezi šaržemi pro jednotlivé koncentrační hladiny. Hodnoty v rámci šarží jsou uvedeny v Tabulce 13. Tabulka 14 obsahuje výsledky mezi šaržemi, tedy pro jednotlivé koncentrační hladiny.

Vzorky kapslí obohacené testosteronem byly připraveny za účelem prokázání schopnosti metody testosteron přesně a správně stanovit nebo detekovat. Naměřené hodnoty koncentrace testosteronu byly v rámci šarže stanoveny se správností v rozmezí 95,68–116,97 % s přesností <9,50 %. Při zprůměrování všech naměřených hodnot koncentrace testosteronu pro jednotlivé koncentrační hladiny se správnost pohybovala v rozsahu 99,67–109,72 % s přesností <11,00 %. Evropská léková agentura požaduje při validaci bioanalytických metod, aby byla přesnost méně než 15 % a správnost v rozsahu 85–115 %. V koncentracích, které odpovídají spodnímu limitu kvantifikace je povolena přesnost do 20 % a správnost v rozmezí 80–120 % [96]. Všechny hodnoty tyto požadavky splňují.

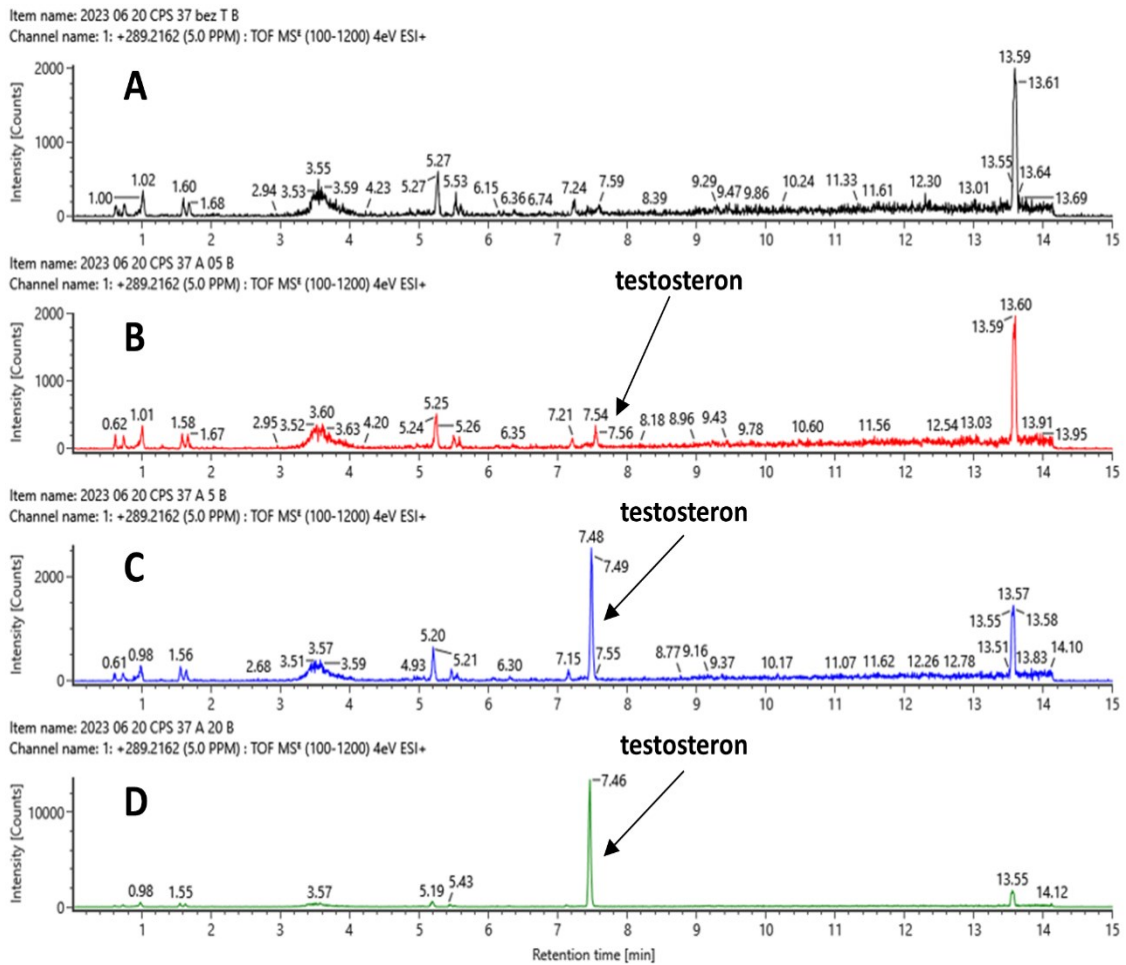
Na Obrázcích 35–37 jsou zobrazeny chromatogramy naměřených vzorků kapslí bez přídavku testosteronu a s jeho přídavky ve 3 různých koncentracích. Ve vzorcích kapslí s přídavkem testosteronu je označen pík testosteronu. V kapslích bez přidaného testosteronu nebyl testosteron identifikován.

Tabulka 13: Stanovení přesnosti a správnosti naměřených koncentrací testosteronu v rámci šarží.

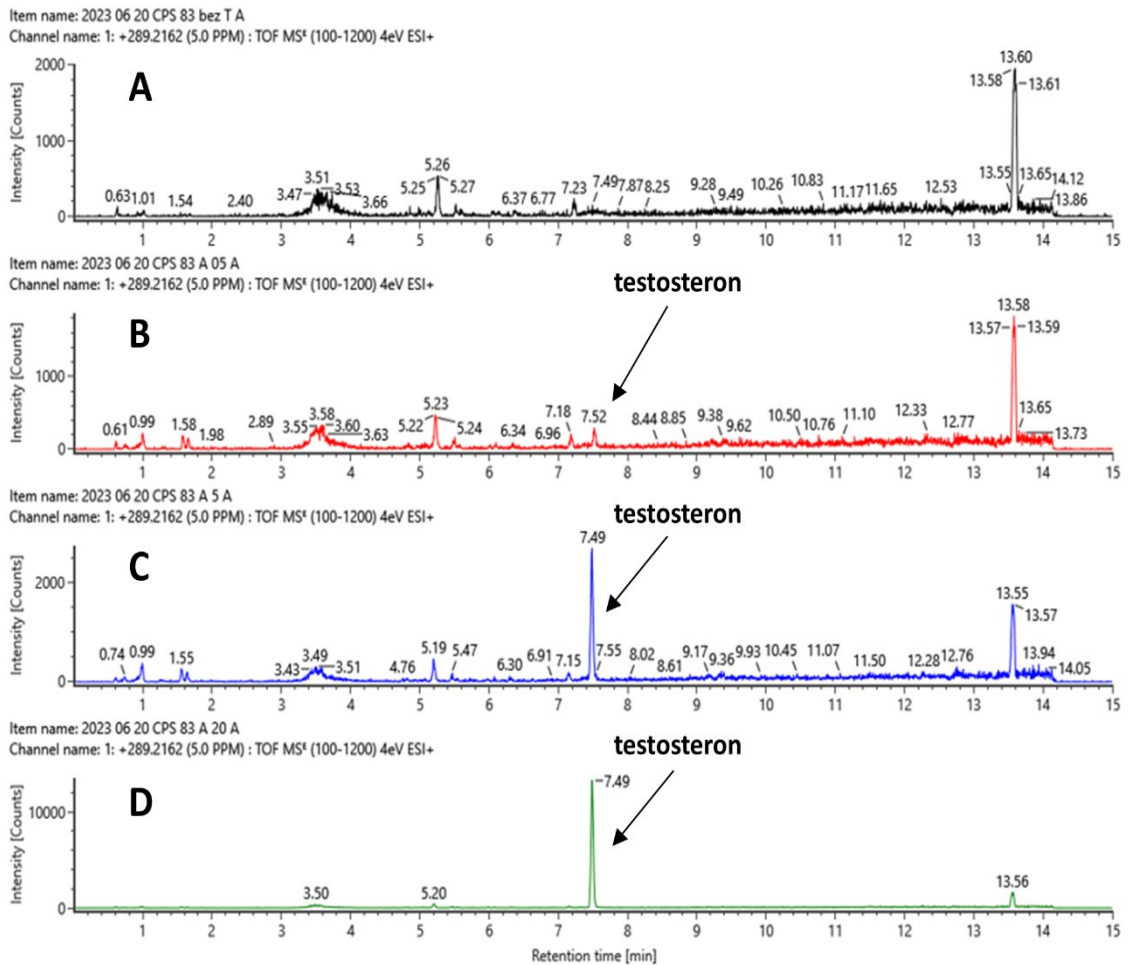
šarže	skutečná koncentrace testosteronu [ng/ml]	změřená koncentrace testosteronu [ng/ml]	směrodatná odchylka [ng/ml]	přesnost [%]	správnost [%]
37	0,5	0,48	0,03	5,16	96,92
83	0,5	0,58	0,03	4,67	116,97
92	0,5	0,58	0,05	9,42	116,36
37	5	4,78	0,18	3,82	95,68
83	5	5,06	0,17	3,40	101,22
92	5	5,11	0,07	1,41	102,12
37	20	20,22	0,58	2,85	101,08
83	20	21,45	0,27	1,25	107,26
92	20	21,10	0,30	1,40	105,50

Tabulka 14: Stanovení přesnosti a správnosti naměřených koncentrací testosteronu mezi šaržemi pro jednotlivé koncentrační hladiny.

skutečná koncentrace testosteronu [ng/ml]	naměřená koncentrace testosteronu [ng/ml]	směrodatná odchylka [ng/ml]	přesnost [%]	správnost [%]
0,5	0,55	0,06	10,94	109,72
5	4,98	0,21	4,16	99,67
20	20,92	0,66	3,15	104,61

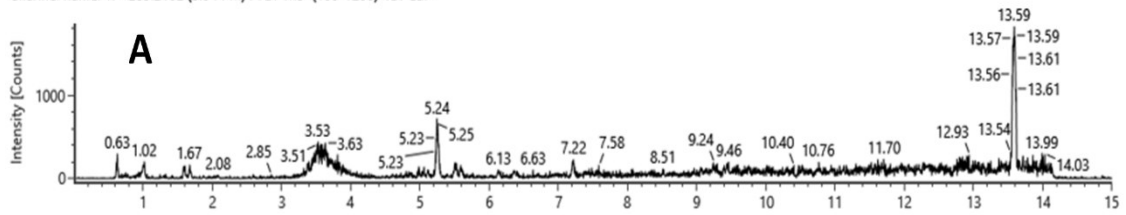


Obrázek 35: MS chromatogramy vzorků kapslí šarže 17637 bez přídavku testosteronu a s jeho přídavky ve 3 různých koncentracích. **A** – vzorky kapslí bez přídavku testosteronu, **B** – vzorky kapslí s testosteronem v koncentraci 0,5 ng/ml, **C** – vzorky kapslí s testosteronem v koncentraci 5 ng/ml, **D** – vzorky kapslí s testosteronem v koncentraci 20 ng/ml.

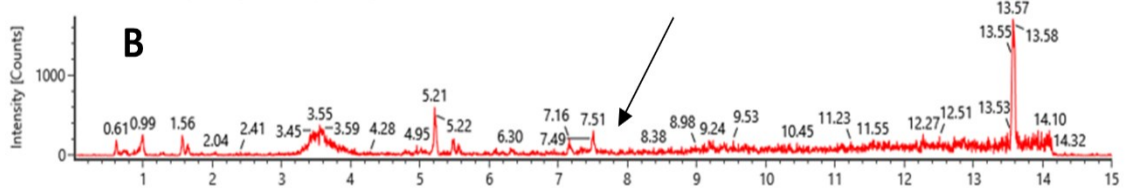


Obrázek 36: MS chromatogramy vzorků kapslí šarže 16583 bez přídavku testosteronu a s jeho přídavky ve 3 různých koncentracích. **A** – vzorky kapslí bez přídavku testosteronu, **B** – vzorky kapslí s testosteronem v koncentraci 0,5 ng/ml, **C** – vzorky kapslí s testosteronem v koncentraci 5 ng/ml, **D** – vzorky kapslí s testosteronem v koncentraci 20 ng/ml.

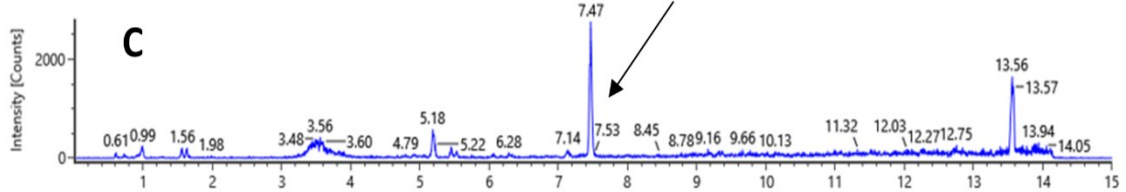
Item name: 2023 06 20 CPS 92 bez T B
Channel name: 1: +289.2162 (5.0 PPM) : TOF MS⁴ (100-1200) 4eV ESI+



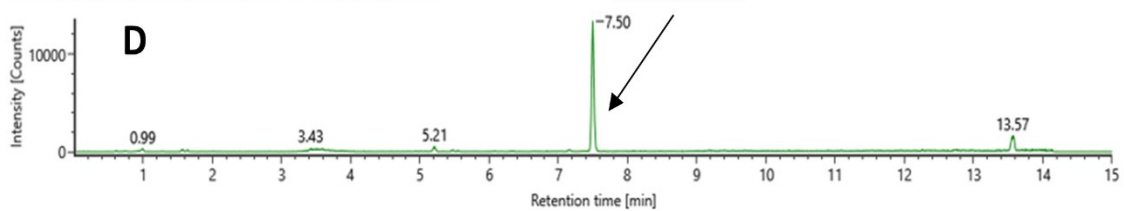
Item name: 2023 06 20 CPS 92 A 05 B
Channel name: 1: +289.2162 (5.0 PPM) : TOF MS⁴ (100-1200) 4eV ESI+



Item name: 2023 06 20 CPS 92 A 5 B
Channel name: 1: +289.2162 (5.0 PPM) : TOF MS⁴ (100-1200) 4eV ESI+



Item name: 2023 06 20 CPS 92 A 20 B
Channel name: 1: +289.2162 (5.0 PPM) : TOF MS⁴ (100-1200) 4eV ESI+



Obrázek 37: MS chromatogramy vzorků kapslí šarže 17292 bez přídavku testosteronu a s jeho přídavky ve 3 různých koncentracích. **A** – vzorky kapslí bez přídavku testosteronu, **B** – vzorky kapslí s testosteronem v koncentraci 0,5 ng/ml, **C** – vzorky kapslí s testosteronem v koncentraci 5 ng/ml, **D** – vzorky kapslí s testosteronem v koncentraci 20 ng/ml.

6. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byla optimalizace UHPLC-HRMS metody pro analýzu obsahových látek doplňku stravy, ve kterém jsou zastoupeny extrakty ze 4 rostlinných drog. Kromě toho bylo třeba ověřit, zda není v doplňku stravy přítomen nedeklarovaný testosteron.

Nejprve byla vytvořena knihovna MS spekter potenciálně předpokládaných látek s jejich strukturami a monoizotopickými hmotnostmi. Knihovna byla aplikována na naměřené vzorky doplňku stravy a jako majoritní látky byly identifikovány ginsenosidy, na nichž probíhala optimalizace metody.

Hlavní úkol v optimalizaci přípravy vzorku představovala volba rozpouštědla. Nejvyšší odezva byla získána při použití ethanolu a methanolu, mezi kterými nebyly v rámci měření vzorků kapslí různých šarží pozorovány významné rozdíly. Mezi méně vhodná rozpouštědla patřila voda, acetonitril a ethylacetát. Při jejich použití bylo extrahováno menší množství látek.

V rámci optimalizace chromatografických podmínek bylo nejdříve otestováno různé nastavení gradientové eluce na koloně Acquity UPLC BEH C18, která byla zvolena jako výchozí. Změny v profilu gradientu nebyly pro separaci směsi ginsenosidů dostatečné, proto bylo provedeno porovnání dalších 3 chromatografických kolon. Na problematiku separace strukturně podobných ginsenosidů byl zaměřen samostatný projekt. V rámci něho byl proveden screening 14 chromatografických kolon. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na koloně Atlantis Premier BEH C18 AX.

Pro hmotnostní spektrometr byly zvoleny tyto optimalizované parametry: desolvatační teplota 550 °C, napětí na kapiláře 2,5 kV, rychlost průtoku desolvatačního plynu 1000 l/hod, napětí na vstupním kuželu 40 V a kolizní energie 35–65 eV.

Limit detekce testosteronu byl stanoven na 0,5 ng/ml. Ve vzorcích kapslí s přidaným testosteronem byla stanovena koncentrace testosteronu pro jednotlivé koncentrační hladiny se správností 99,67–109,72 % a s přesností <11,00 %. Ve vzorcích kapslí nebyl testosteron identifikován, adulterace tedy nebyla potvrzena.

Metodu UHPLC-HRMS by bylo třeba ještě vylepšit, zejména z pohledu chromatografické separace. Další optimalizace separačních podmínek by mohla vést ke kompletnímu rozdělení ginsenosidů Rb-2 a Rb-3. Po validaci by mohla být metoda využita pro analýzu dalších doplňků stravy s obsahem ginsenosidů. Kompletní validace metody pro ginsenosidy nebyla provedena vzhledem k vysoké ceně standardů.

7. POUŽITÉ LITERÁRNÍ ZDROJE

- [1] N. Wu, A.M. Clausen, Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations, *Journal of Separation Science*. 30 (2007) 1167-1182. doi:10.1002/jssc.200700026.
- [2] Y. Kazakevich, R. LoBrutto, ed., HPLC for pharmaceutical scientists, *Wiley-Interscience*, Hoboken, N.J, 2007.
- [3] J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski, A. Jelińska, P. Garbacki, UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography, *Chromatographia*. 76 (2013) 1429-1437. doi:10.1007/s10337-013-2434-6.
- [4] D.T.-T. Nguyen, D. Guillarme, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *Journal of Separation Science*. 29 (2006) 1836-1848. doi:10.1002/jssc.200600189.
- [5] Jeffrey R. Mazzeo, Uwe D. Neue, Marianna Kele, Robert S. Plumb, A new separation technique takes advantage of sub-2- μm porous particles, (2005). https://www.researchgate.net/profile/Robert_Plumb/publication/231187784_Advancing_LC_Performance_with_Smaller_Particles_and_Higher_Pressure/links/5a5d12e7aca272d4a3dd8dc9/Advancing-LC-Performance-with-Smaller-Particles-and-Higher-Pressure.pdf.
- [6] S.M. Chesnut, J.J. Salisbury, The role of UHPLC in pharmaceutical development, *Journal of Separation Science*. 30 (2007) 1183-1190. doi:10.1002/jssc.200600505.
- [7] R. Verplaetse, J. Tytgat, LC-MS/MS in forensic toxicology: what about matrix effects?, *TIAFT Bulletin*, 41 (2011) 8-16.
- [8] J.P.C. Vissers, A.H. De Ru, M. Ursem, J.-P. Chervet, Optimised injection techniques for micro and capillary liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 746 (1996) 1-7. doi:10.1016/0021-9673(96)00322-6.
- [9] D. Guillarme, J.-L. Veuthey, ed., UHPLC in Life Sciences, 16. bs, *RSC Publ., Royal Soc. of Chemistry*, Cambridge, 2012.
- [10] K.D. Wyndham, J.E. O'Gara, T.H. Walter, K.H. Glose, N.L. Lawrence, B.A. Alden, G.S. Izzo, C.J. Hudalla, P.C. Iraneta, Characterization and Evaluation of C₁₈ HPLC Stationary Phases Based on Ethyl-Bridged Hybrid Organic/Inorganic Particles, *Analytical Chemistry*. 75 (2003) 6781-6788. doi:10.1021/ac034767w.
- [11] M. W. Dong, D. Guillarme, Newer Developments in HPLC Impacting Pharmaceutical Analysis: A Brief Review, *American Pharmaceutical Review.*, 16 (2013) 36-43.
- [12] H. Jin, Y. Liu, Z. Guo, J. Wang, X. Zhang, C. Wang, X. Liang, Recent development in liquid chromatography stationary phases for separation of Traditional Chinese Medicine components, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 130 (2016) 336-346. doi:10.1016/j.jpba.2016.06.008.
- [13] Y. Yang, X. Geng, Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 8813-8825. doi:10.1016/j.chroma.2011.10.009.
- [14] T. H. Walter, B. A. Alden, M. Blaze, Ch. Boissel, D. Osterman, A. V. Patel, P. Rainville, K. M. Smith, J. Yang, Evaluation of new MS-compatible mixed-mode RP/AX HPLC columns [online], (2020). https://lcms.cz/labrulez-bucket-strap-h3hsga3/2020htc_walter_atl_prem_c18_ax_cea0094be0/2020htc_walter_atl_prem_c18_ax.pdf [cit. 2023-08-13].

- [15] D. S. Bell, *New Chromatography Columns and Accessories 2020*, LCGC Europe., 33 (2020) 185-192.
- [16] K. Zhang, X. Liu, Reprint of "Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 130 (2016) 19-34. doi:10.1016/j.jpba.2016.09.013.
- [17] L. Nováková, H. Vlčková, S. Petr, Evaluation of new mixed-mode UHPLC stationary phases and the importance of stationary phase choice when using low ionic-strength mobile phase additives, *Talanta*. 93 (2012) 99-105. doi:10.1016/j.talanta.2012.01.054.
- [18] Waters, ACQUITY UPLC Columns [online], (2008). https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/acquity_uplc_columns_brochure_72001140en.pdf [cit. 2023-08-13].
- [19] Keyon, Core-Shell structure using blender?, *Stack Exchange Inc. [online]*. (2016). <https://blender.stackexchange.com/questions/58240/core-shell-structure-using-blender> [cit. 2023-30-07].
- [20] S. Fekete, J. Schappler, J.-L. Veuthey, D. Guillarme, Current and future trends in UHPLC, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 63 (2014) 2-13. doi:10.1016/j.trac.2014.08.007.
- [21] T.H. Walter, R.W. Andrews, Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 63 (2014) 14-20. doi:10.1016/j.trac.2014.07.016.
- [22] V. González-Ruiz, A.I. Olives, M.A. Martín, Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 64 (2015) 17-28. doi:10.1016/j.trac.2014.08.008.
- [23] B. Hillel, Tips for Maximizing the Performance of Core-Shell Columns, *LCGC [online]*. (2021). <https://www.chromatographyonline.com/view/tips-for-maximizing-the-performance-of-core-shell-columns> [cit. 2023-03-06].
- [24] J.H. Gross, *Mass Spectrometry: A Textbook*, Softcover reprint of the hardcover 3rd edition 2017, *Springer*, Cham, 2018.
- [25] C. Dass, *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*, *Wiley-Interscience*, Hoboken, N.J, 2007.
- [26] D. Friedecký, K. Lemr, Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Klinická biochemie a metabolismus.*, 3 (2012) 152-157.
- [27] H. Awad, M.M. Khamis, A. El-Aneed, Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization, *Applied Spectroscopy Reviews*. 50 (2015) 158-175. doi:10.1080/05704928.2014.954046.
- [28] A.E. Ashcroft, Ionization methods in organic mass spectrometry, *Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK, 1997.
- [29] L. Hejazi, M. Guilhaus, D.B. Hibbert, D. Ebrahimi, Gas chromatography with parallel hard and soft ionization mass spectrometry: GC/MS with parallel EI and FI detection, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 29 (2015) 91-99. doi:10.1002/rcm.7091.
- [30] J. Wei, L. Xiang, Z. Cai, Emerging environmental pollutants hydroxylated polybrominated diphenyl ethers: From analytical methods to toxicology research, *Mass Spectrometry Reviews*. 40 (2021) 255-279. doi:10.1002/mas.21640.
- [31] S. Banerjee, Empowering Clinical Diagnostics with Mass Spectrometry, *ACS Omega*. 5 (2020) 2041-2048. doi:10.1021/acsomega.9b03764.

- [32] R. Ekman, ed., *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications*, *John Wiley & Sons*, Hoboken, N.J., 2009.
- [33] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd ed, *J. Wiley*, Chichester, West Sussex, England ; Hoboken, NJ, 2007.
- [34] H. Mirzaei, M. Carrasco, ed., *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*, *Springer International Publishing*, Cham, 2016. doi:10.1007/978-3-319-41448-5.
- [35] M. Holčapek, Hmotnostní analyzátoř [online], (2023). https://holcapek.upce.cz/teaching/MS/04_05_MS_analyzatory_RJ.pdf [cit. 2023-03-10].
- [36] M. Holčapek, Hmotnostní spektrometrie (v organické analýze) [online], (2023). https://holcapek.upce.cz/teaching/MS/01_Uvod_RJ.pdf [cit. 2023-03-10].
- [37] A. El-Aneed, A. Cohen, J. Banoub, *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers*, *Applied Spectroscopy Reviews*. 44 (2009) 210-230. doi:10.1080/05704920902717872.
- [38] T.R. Covey, E.D. Lee, A.P. Bruins, J.D. Henion, *Liquid chromatography/mass spectrometry*, *Analytical Chemistry*. 58 (1986) 1451A-1461A. doi:10.1021/ac00127a001.
- [39] F.W. McLafferty, *Tandem Mass Spectrometry*, *Science*. 214 (1981) 280-287. doi:10.1126/science.7280693.
- [40] F. Xian, C.L. Hendrickson, A.G. Marshall, *High Resolution Mass Spectrometry*, *Analytical Chemistry*. 84 (2012) 708-719. doi:10.1021/ac203191t.
- [41] F. Hernández, J.V. Sancho, M. Ibáñez, E. Abad, T. Portolés, L. Mattioli, *Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 403 (2012) 1251-1264. doi:10.1007/s00216-012-5844-7.
- [42] E.A. Bridgewater Br, *High Resolution Mass Spectrometry Improves Data Quantity and Quality as Compared to Unit Mass Resolution Mass Spectrometry in High-Throughput Profiling Metabolomics*, *Journal of Postgenomics Drug & Biomarker Development*. 04 (2014). doi:10.4172/2153-0769.1000132.
- [43] A.H.B. Wu, J. Colby, *High-Resolution Mass Spectrometry for Untargeted Drug Screening*, içinde: U. Garg (Ed.), *Clinical Applications of Mass Spectrometry in Drug Analysis*, *Springer New York*, New York, NY, 2016: ss. 153-166. doi:10.1007/978-1-4939-3252-8_17.
- [44] N. Beeton-Kempen, *Data-dependent vs. Data-independent Proteomic Analysis* [online], (2021). <https://www.technologynetworks.com/proteomics/lists/data-dependent-vs-data-independent-proteomic-analysis-331712> [cit. 2023-08-14].
- [45] P. Barbier Saint Hilaire, K. Rousseau, A. Seyer, S. Dechaumet, A. Damont, C. Junot, F. Fenaille, *Comparative Evaluation of Data Dependent and Data Independent Acquisition Workflows Implemented on an Orbitrap Fusion for Untargeted Metabolomics*, *Metabolites*. 10 (2020) 158. doi:10.3390/metabo10040158.
- [46] L. Nováková, *Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis*, *Journal of Chromatography A*. 1292 (2013) 25-37. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.087.
- [47] R.E. Ardrey, *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*, *J. Wiley*, New York, 2003.

- [48] W.M.A. Niessen, A.P. Tinke, Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation, *Journal of Chromatography A*. 703 (1995) 37-57. doi:10.1016/0021-9673(94)01198-N.
- [49] L. Couchman, P.E. Morgan, LC-MS in analytical toxicology: some practical considerations, *Biomedical Chromatography*. 25 (2011) 100-123. doi:10.1002/bmc.1566.
- [50] M. Holčapek, Spojení hmotnostní spektrometrie a separačních technik [online], (2023). https://holcapek.upce.cz/teaching/MS/07_Spojzeni_MS_separaceRJ.pdf [cit. 2023-03-10].
- [51] K. Leung, A. Wong, Pharmacology of ginsenosides: a literature review, *Chinese Medicine*. 5 (2010). doi:10.1186/1749-8546-5-20.
- [52] L.P. Christensen, Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects., *Advances in Food and Nutrition Research*. 55 (2009) 1-99. doi:10.1016/S1043-4526(08)00401-4.
- [53] D.-H. Kim, Chemical Diversity of Panax ginseng, Panax quinquefolium, and Panax notoginseng, *Journal of Ginseng Research*. 36 (2012) 1-15. doi:10.5142/jgr.2012.36.1.1.
- [54] E.M. Schlag, M.S. McIntosh, Ginsenoside content and variation among and within American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) populations, *Phytochemistry*. 67 (2006) 1510-1519. doi:10.1016/j.phytochem.2006.05.028.
- [55] H. Wang, Y. Zheng, Q. Sun, Z. Zhang, M. Zhao, C. Peng, S. Shi, Ginsenosides emerging as both bifunctional drugs and nanocarriers for enhanced antitumor therapies, *Journal of Nanobiotechnology*. 19 (2021). doi:10.1186/s12951-021-01062-5.
- [56] American Chemical Society, SciFinder [online], <https://scifinder.cas.org> [cit. 2023-03-27].
- [57] S. Jia, J. Li, N. Yunusova, J.H. Park, S.W. Kwon, J. Lee, A New Application of Charged Aerosol Detection in Liquid Chromatography for the Simultaneous Determination of Polar and Less Polar Ginsenosides in Ginseng Products: LC-CAD Analysis of 14 Ginsenosides, *Phytochemical Analysis*. 24 (2013) 374-380. doi:10.1002/pca.2419.
- [58] P.N. Brown, Determination of Ginsenoside Content in Asian and North American Ginseng Raw Materials and Finished Products by High-Performance Liquid Chromatography: Single-Laboratory Validation, *Journal of AOAC International*. 94 (2011) 1391-1399. doi:10.5740/jaoacint.9-543.
- [59] A.N. Stavrianidi, I.A. Rodin, A.V. Braun, E.A. Stekolshchikova, O.A. Shpigun, HPLC-MS/MS determination of biomarkers of *P. quinquefolius* in plant materials and commercial products, *Journal of Analytical Chemistry*. 69 (2014) 1323-1329. doi:10.1134/S1061934814140111.
- [60] J. Cui, Identification and quantification of ginsenosides in various commercial ginseng preparations, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3 (1995) 77-85. doi:10.1016/0928-0987(94)00077-D.
- [61] P.N. Brown, R. Yu, Collaborators:, T. Cain, G. Huie, C.D. Jin, J.N. Kababick, G. Leong, K. LeVanseler, S. Lunetta, Y.C. Ma, K. Reif, B. Schaneberg, C. Shevchuk, R. Smith, D. Sullivan, N. Wijewickreme, A. Windust, Determination of Ginsenoside Content in Panax ginseng C.A. Meyer and Panax quinquefolius L. Root Materials and Finished Products by High-Performance Liquid Chromatography with

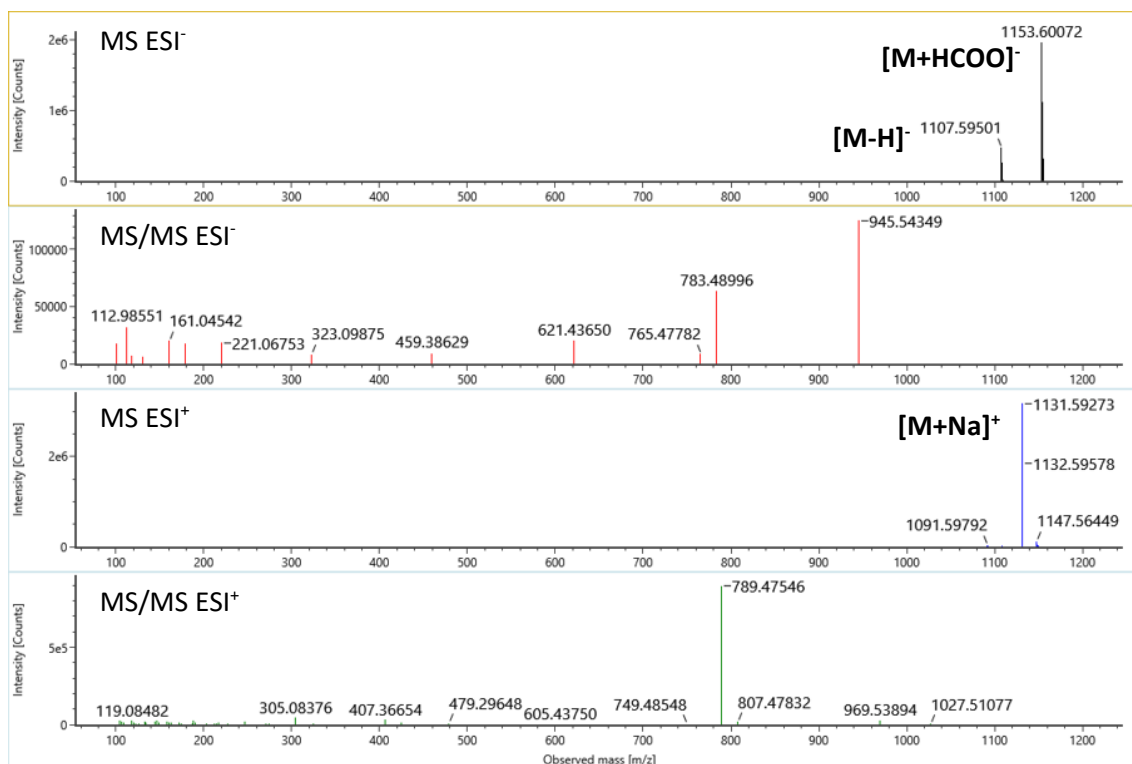
- Ultraviolet Absorbance Detection: Interlaboratory Study, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 96 (2013) 12-19. doi:10.5740/jaoacint.12-153.
- [62] W. Li, J.F. Fitzloff, HPLC DETERMINATION OF GINSENOSES CONTENT IN GINSENG DIETARY SUPPLEMENTS USING ULTRAVIOLET DETECTION, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 25 (2002) 2485-2500. doi:10.1081/JLC-120014269.
- [63] E.B. Asafu-Adjaye, S.K. Wong, Collaborators:, J. Arnason, J. Betz, K. Breakell, J.X. Chen, J. Fitzloff, H.H.S. Fong, C.S. Kim, S.Y. Kwan, H.W. Leung, G.Q. Li, R.C. Lin, G.A. Luo, H. Nicolidakis, H. Park, E. Suen, X.R. Wang, Z.T. Wang, K.C. Wen, H.W. Yeung, Determination of Ginsenosides (Ginseng Saponins) in Dry Root Powder from *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and Selected Commercial Products by Liquid Chromatography: Interlaboratory Study, *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 86 (2003) 1112-1123. doi:10.1093/jaoac/86.6.1112.
- [64] Y.-Y. Cheng, T.-H. Tsai, Analysis of Sheng-Mai-San, a Ginseng-Containing Multiple Components Traditional Chinese Herbal Medicine Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry and Physical Examination by Electron and Light Microscopies, *Molecules*. 21 (2016) 1159. doi:10.3390/molecules21091159.
- [65] P. Liu, H.-S. Yu, L.-J. Zhang, X.-B. Song, L.-P. Kang, J.-Y. Liu, J. Zhang, M. Cao, K. Yu, T.-G. Kang, B.-P. Ma, A rapid method for chemical fingerprint analysis of *Panax notoginseng* powders by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Chinese Journal of Natural Medicines*. 13 (2015) 471-480. doi:10.1016/S1875-5364(15)30042-X.
- [66] N.S. Quiming, N.L. Denola, A.B. Soliev, Y. Saito, K. Jinno, High Performance Liquid Chromatographic Separation and Quantitative Analysis of Ginsenosides Using a Polyvinyl Alcohol-Bonded Stationary Phase, *Chromatographia*. 66 (2007) 5-11. doi:10.1365/s10337-007-0258-y.
- [67] Q.C. Ji, M.R. Harkey, G.L. Henderson, M. Eric Gershwin, J.S. Stern, R.M. Hackman, Quantitative determination of ginsenosides by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Phytochemical Analysis*. 12 (2001) 320-326. doi:10.1002/pca.593.
- [68] M.R. Harkey, G.L. Henderson, M.E. Gershwin, J.S. Stern, R.M. Hackman, Variability in commercial ginseng products: an analysis of 25 preparations, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (2001) 1101-1106. doi:10.1093/ajcn/73.6.1101.
- [69] L. Uhr, Y. Chen, D. Sit, P.C.H. Li, Ginsenosides in Commercial Ginseng Products Analyzed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *ISRN Analytical Chemistry*. 2014 (2014) 1-8. doi:10.1155/2014/486842.
- [70] G.J. Lee, B. Shin, Y.-H. Yu, J. Ahn, S.W. Kwon, J.H. Park, Systematic development of a group quantification method using evaporative light scattering detector for relative quantification of ginsenosides in ginseng products, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 128 (2016) 158-165. doi:10.1016/j.jpba.2016.05.030.
- [71] T.W.D. Chan, P.P.H. But, S.W. Cheng, I.M.Y. Kwok, F.W. Lau, H.X. Xu, Differentiation and Authentication of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and Ginseng Products by Using HPLC/MS, *Analytical Chemistry*. 72 (2000) 1281-1287. doi:10.1021/ac990819z.
- [72] C. Zhang, S. Chen, L. Dong, Analysis and assessment of four commercial products of Asian ginseng by ultra-performance liquid chromatography and chemometric

- analysis, *Chinese Journal of Chromatography*. 33 (2015) 514.
doi:10.3724/SP.J.1123.2015.01018.
- [73] A. Stavrianidi, E. Stekolshchikova, A. Porotova, I. Rodin, O. Shpigun, Combination of HPLC–MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 132 (2017) 87-92. doi:10.1016/j.jpba.2016.09.041.
- [74] A. Stavrianidi, I. Rodin, A. Braun, E. Stekolshchikova, O. Shpigun, Single-run HPLC/ESI-LITMS profiling of ginsenosides in plant extracts and ginseng based products: Single-run HPLC/ESI-LITMS classification and profiling of ginsenosides, *Biomedical Chromatography*. 29 (2015) 853-859. doi:10.1002/bmc.3364.
- [75] H. Yang, L. Liu, W. Gao, K. Liu, L.-W. Qi, P. Li, Direct and comprehensive analysis of ginsenosides and diterpene alkaloids in Shenfu injection by combinatory liquid chromatography–mass spectrometric techniques, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 92 (2014) 13-21. doi:10.1016/j.jpba.2013.12.041.
- [76] J. Ha, Y.-S. Shim, D. Seo, K. Kim, M. Ito, H. Nakagawa, Determination of 22 Ginsenosides in Ginseng Products using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatographic Science*. 51 (2013) 355-360. doi:10.1093/chromsci/bms148.
- [77] Zákon č. 110/1997 Sb., AION CS, Zákony pro lidi [online], <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110/zneni-20220101> [cit. 2023-08-09].
- [78] Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Právní předpisy vztahující se k doplňkům stravy a obecné informace o doplňcích stravy [online], (2019). <https://www.szpi.gov.cz/clanek/pravni-predpisy-vztahujici-se-k-doplncum-stravy-a-obecne-informace-o-doplncich-stravy.aspx?q=Y2hudW09Mg%3D%3D> [cit. 2023-07-29].
- [79] Ministerstvo zdravotnictví ČR a Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Doplňky stravy, Národní zdravotnický informační portál [online], (2023). <https://www.nzip.cz>. ISSN 2695-0340 [cit. 2023-08-09].
- [80] Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Doplňky stravy [online], (2022). <https://www.szpi.gov.cz/clanek/doplanky-stravy.aspx> [cit. 2023-07-29].
- [81] Státní zdravotní ústav, Uvádění doplňků stravy do oběhu [online], <https://szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/doplanky-stravy-zdravotni-tvrzeni/uvadeni-doplunku-stravy-do-obehu/> [cit. 2023-07-29].
- [82] Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Inspekce doporučuje obezřetnost při nákupu doplňků stravy [online], (2008). <https://www.szpi.gov.cz/clanek/inspekce-doporucuje-obezretnost-pri-nakupu-doplunku-stravy.aspx> [cit. 2023-07-29].
- [83] Státní zemědělská a potravinářská inspekce, Potravinářská inspekce zjistila doplněk stravy škodlivý pro lidské zdraví s množstvím anabolických steroidů a dalších nepovolených látek [online], (2020). <https://www.szpi.gov.cz/clanek/potravinarska-inspekce-zjistila-doplnek-stravy-skodlivy-pro-lidske-zdravi-s-mnozstvimi-anabolickyh-steroidu-a-dalsich-nepovolenyh-latek.aspx> [cit. 2023-08-09].
- [84] B.G. Katzung, Základní & klinická farmakologie, Vyd. v ČR 2., v nakl. H&H 1, H & H, Jinočany, 1994.
- [85] H. Lullmann, K. Mohr, L. Hein, Color Atlas of Pharmacology, překlad 5. přepracovaného a rozšířeného vydání, *Grada Publishing*, Praha, 2007.

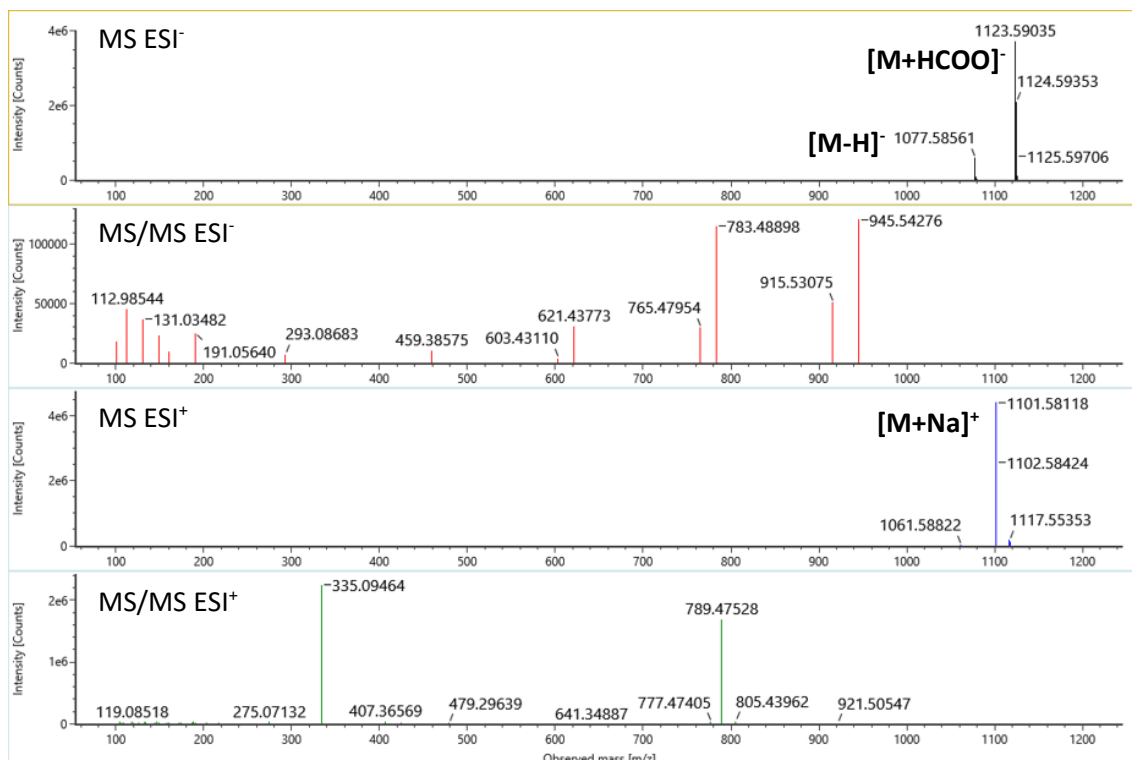
- [86] F. Perlík, Základy farmakologie - Klinická a speciální farmakologie, *Galén*, Praha, 2005.
- [87] V. A. Loyd, Testosterone 1 mg Troches, *U.S.Pharmacist* [online], 37 (2012) 45-46. <https://www.uspharmacist.com/article/testosterone-1-mg-troches> [cit. 2023-03-27].
- [88] EMA, Committee for Veterinary Medicinal Products, Summary report Turnera diffusa, (1999). https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/turnera-diffusa-summary-report-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf [cit. 2022-07-09].
- [89] Drugsite Limited, *Drugs.com* [online], <https://www.drugs.com/> [cit. 2022-05-07].
- [90] Medicines Complete [online], Royal Pharmaceutical Society, <https://www.medicinescomplete.com/log-in/> [cit. 2022-05-07].
- [91] Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases [online], U.S. Department of Agriculture, <https://phytochem.nal.usda.gov/> [cit. 2022-05-07].
- [92] EMA, Committee on Herbal Medicinal Products, Assessment report on Trigonella foenum-graecum L., semen [online], (2010). https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/draft-assessment-report-trigonella-foenum-graecum-l-semen_en.pdf [cit. 2022-05-09].
- [93] EMA, Committee on Herbal Medicinal Products, Assessment report on Rhodiola rosea L, rhizoma et radix [online], (2011). https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/draft-assessment-report-rhodiola-rosea-first-version_en.pdf [cit. 2022-05-09].
- [94] EMA, Committee on Herbal Medicinal Products, Assessment report on Panax ginseng C.A. Meyer, radix [online], (2014). https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-panax-ginseng-ca-meyer-radix_en.pdf [cit. 2022-05-09].
- [95] National Centre for Biotechnology Information, PubChem [online], <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [cit. 2023-03-27].
- [96] EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on bioanalytical method validation [online], (2011). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf [cit. 2023-08-14].

8. PŘÍLOHY

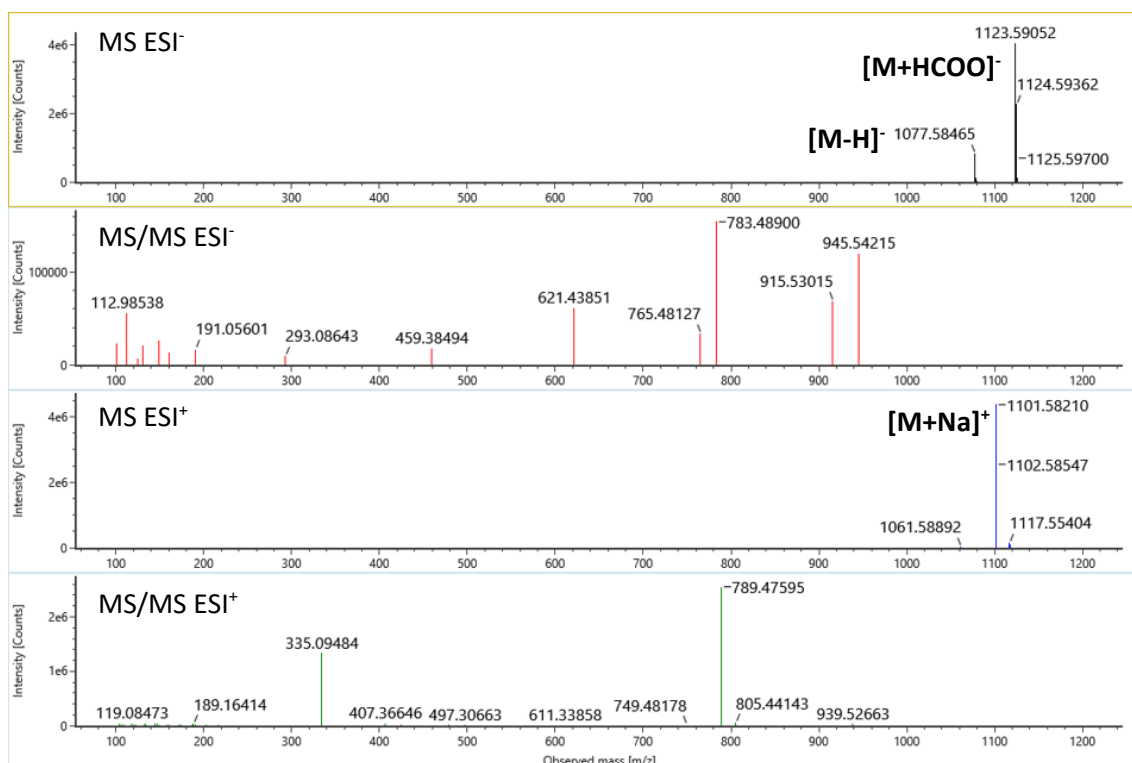
8.1 NAMĚŘENÁ MS A MS/MS SPEKTRA GINSENOSEDŮ



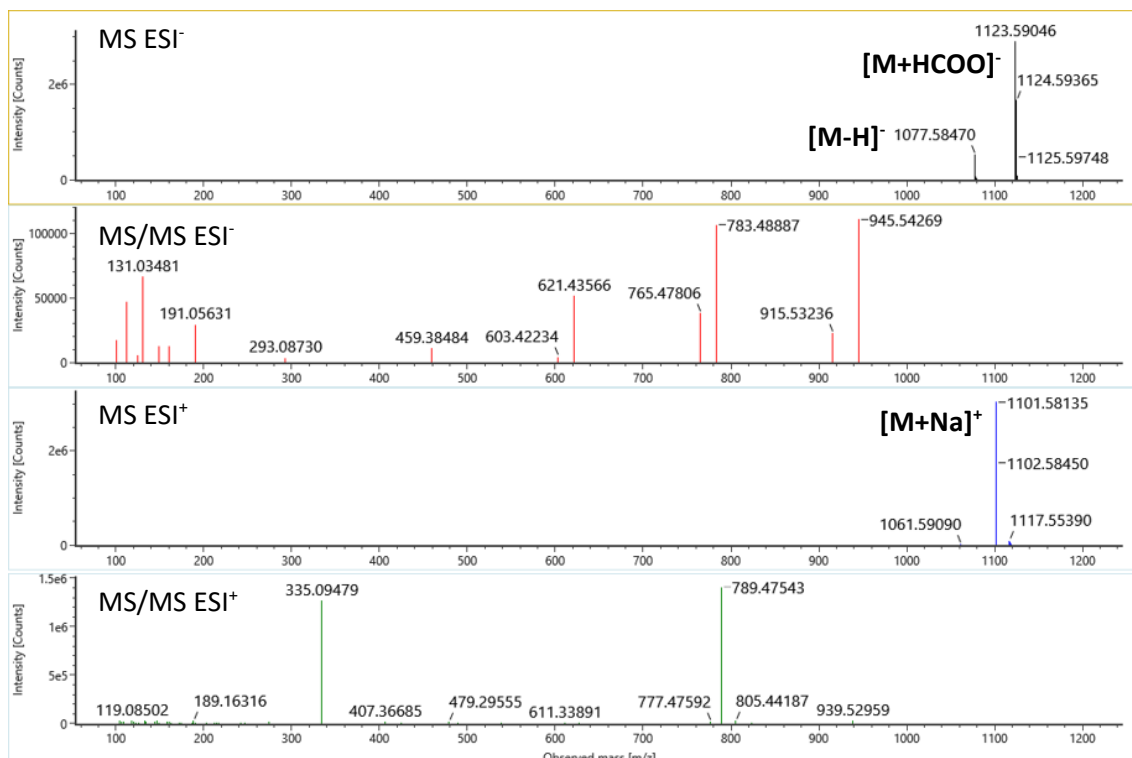
Obrázek 38: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rb-1 v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: $[M+H]^+$ 1109,6102 a $[M-H]^-$ 1107,5957.



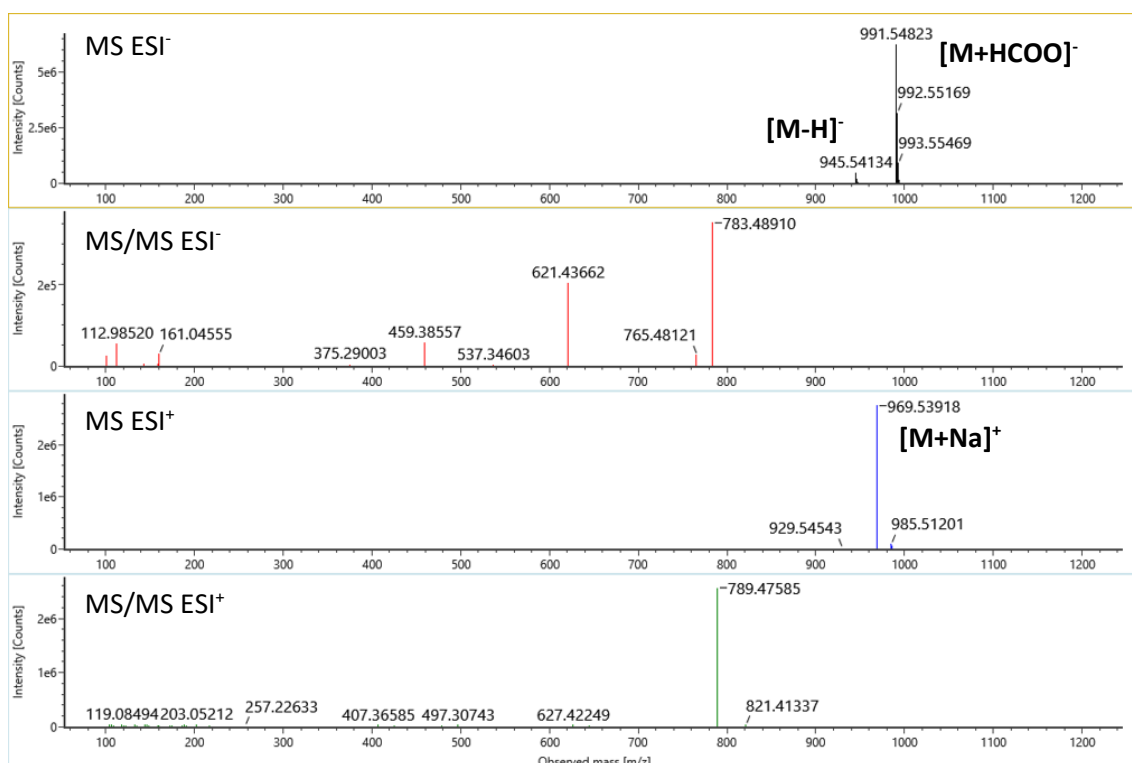
Obrázek 39: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rb-2 v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: [M+H]⁺ 1079,5997 a [M-H]⁻ 1077,5851.



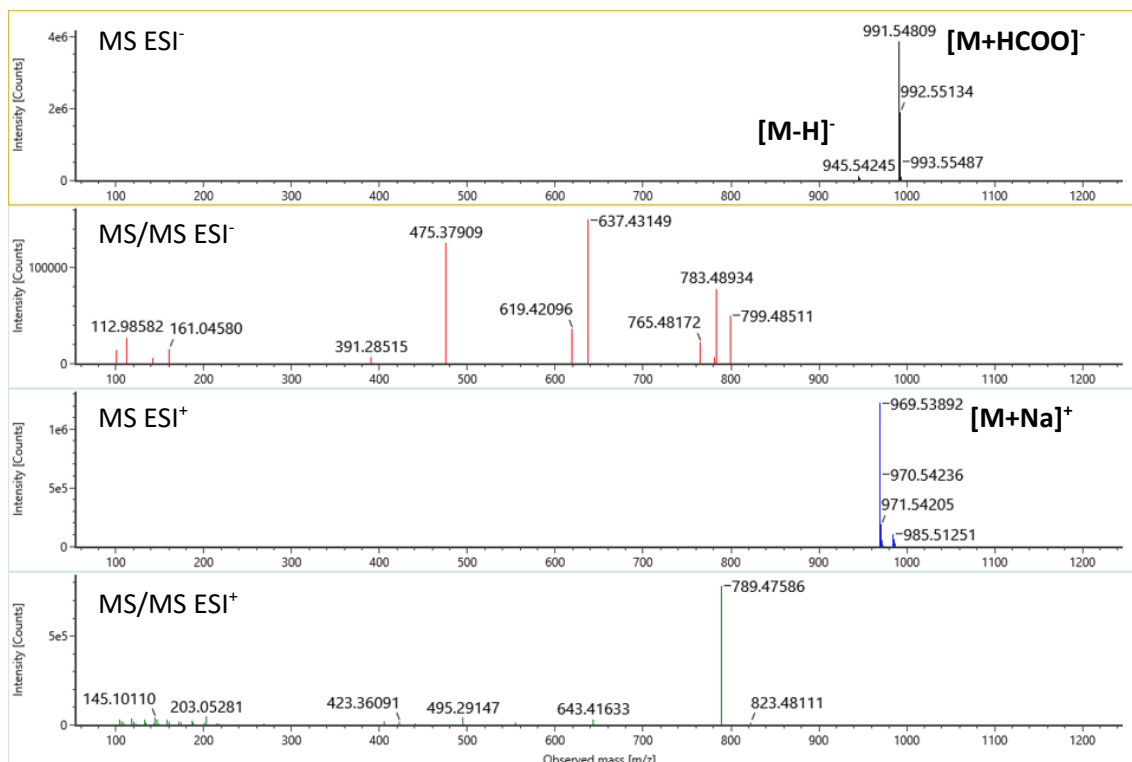
Obrázek 40: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rb-3 v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: [M+H]⁺ 1079,5997 a [M-H]⁻ 1077,5851.



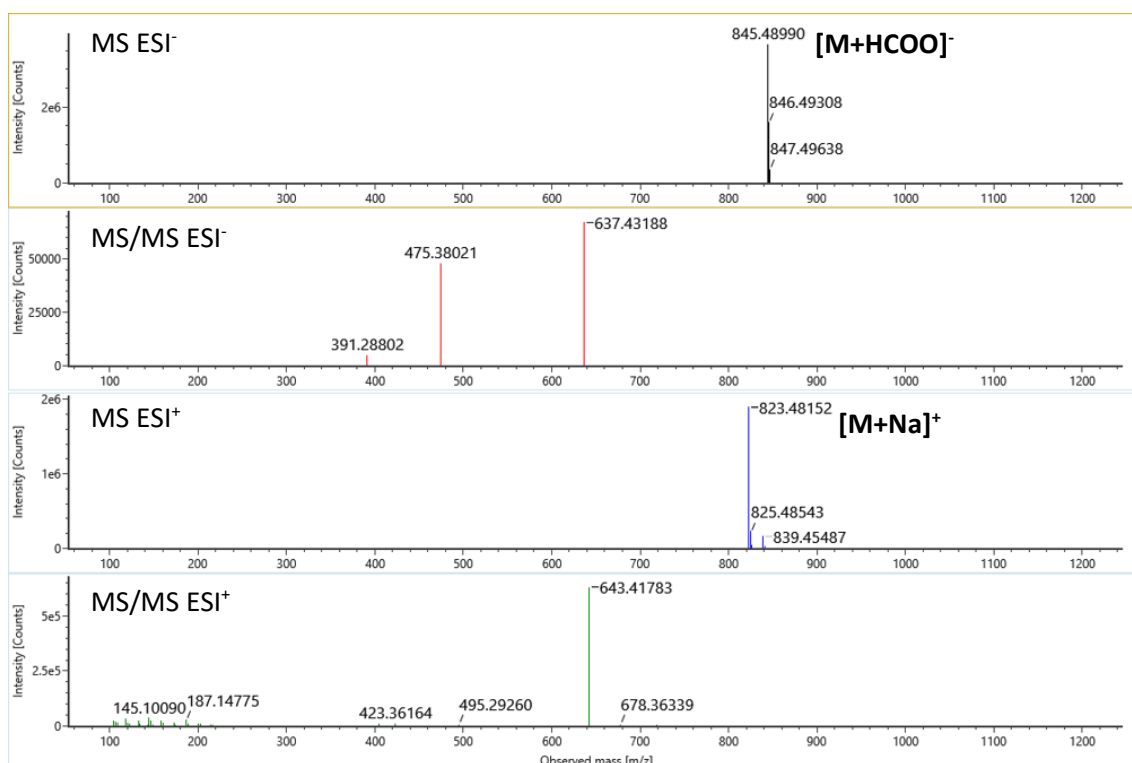
Obrázek 41: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rc v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: [M+H]⁺ 1079,5997 a [M-H]⁻ 1077,5851.



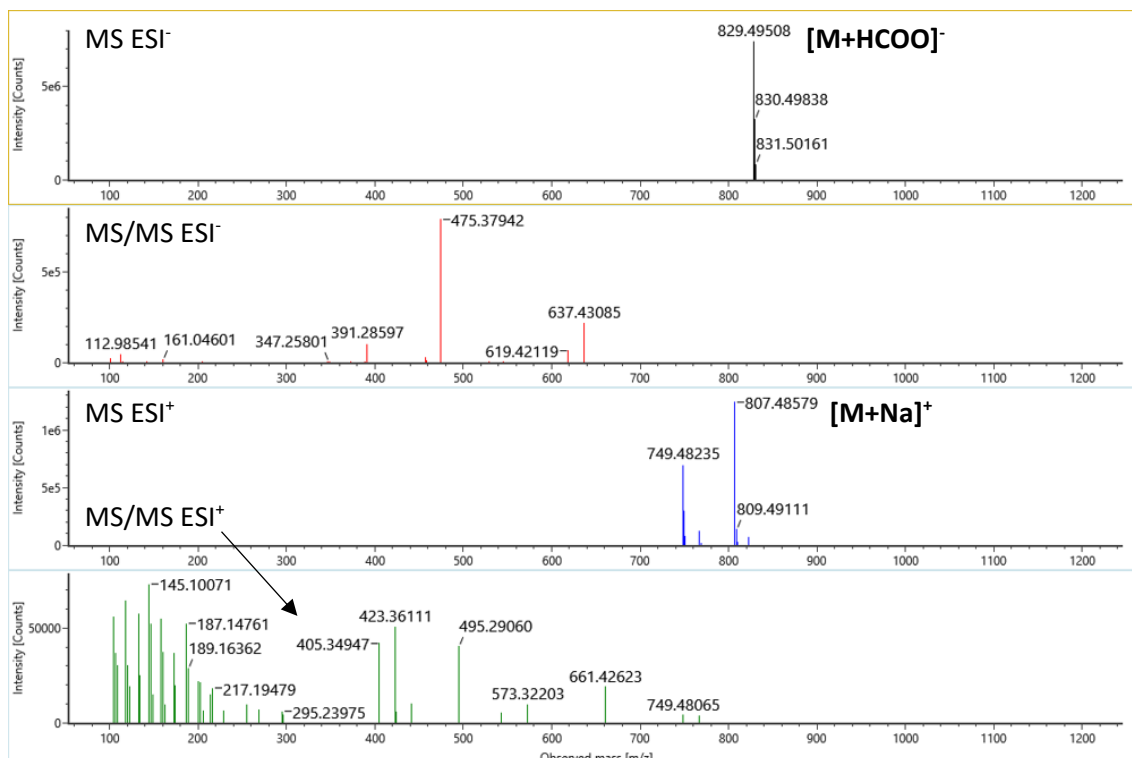
Obrázek 42: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rd v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: [M+H]⁺ 947,5574 a [M-H]⁻ 945,5428.



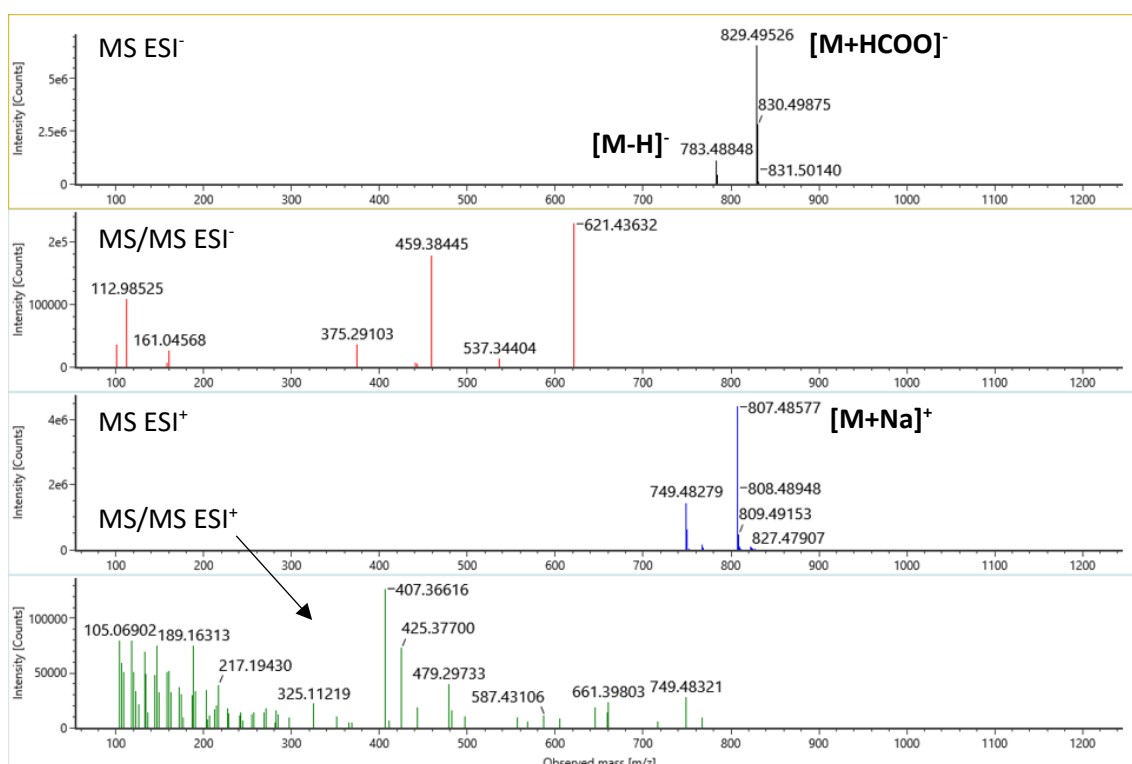
Obrázek 43: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Re v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: $[M+H]^+$ 947,5574 a $[M-H]^-$ 945,5428.



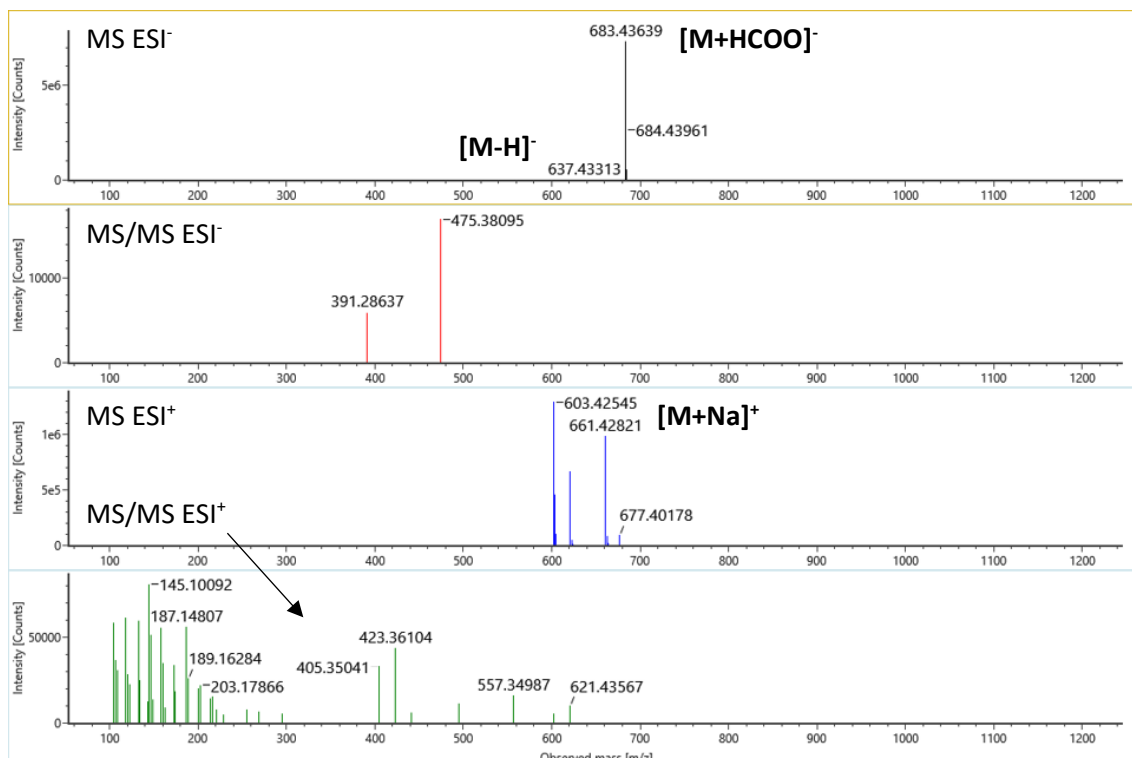
Obrázek 44: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rg-1 v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: $[M+H]^+$ 801,4955 a $[M-H]^-$ 799,4849.



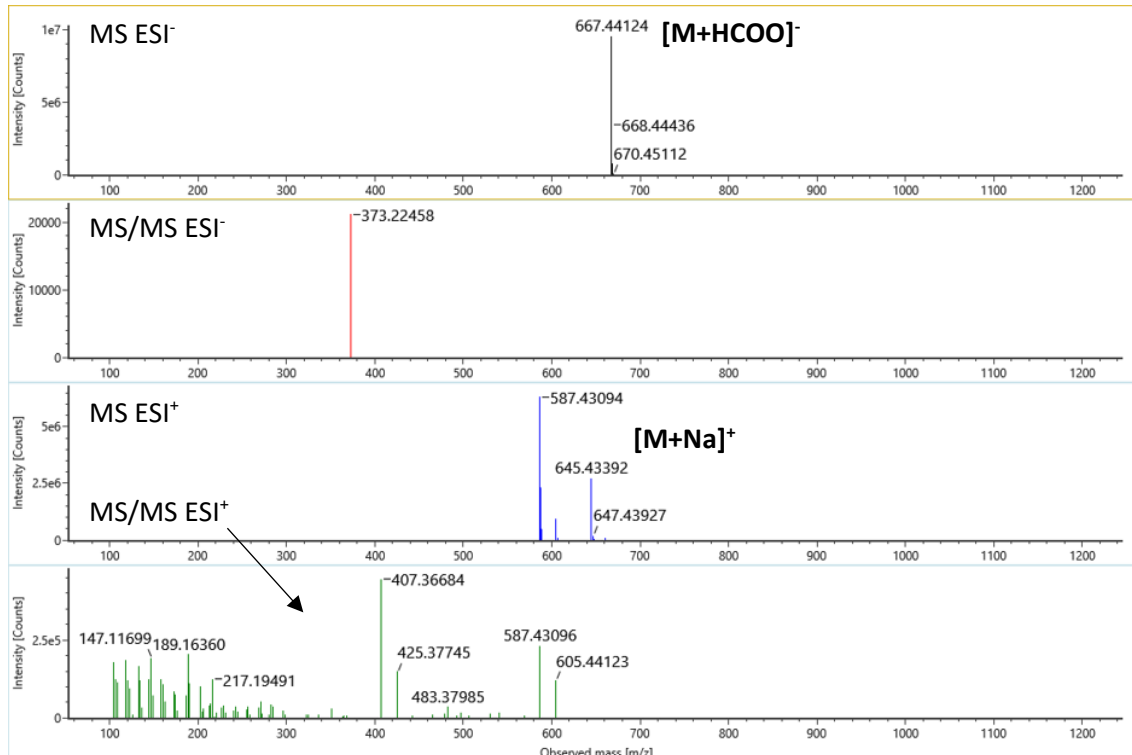
Obrázek 45: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rg-2 v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: $[M+H]^+$ 785,5046 a $[M-H]^-$ 783,4900.



Obrázek 46: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rg-3 v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: $[M+H]^+$ 785,5046 a $[M-H]^-$ 783,4900.



Obrázek 47: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rh-1 v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: $[M+H]^+$ 639,4467 a $[M-H]^-$ 637,4321.



Obrázek 48: MS a MS/MS spektra ginsenosidu Rh-2 v negativním a pozitivním módu. Hodnoty m/z pro protonovanou a deprotonovanou molekulu: $[M+H]^+$ 623,4157 a $[M-H]^-$ 621,4372.