

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Optimalizace GC/MS metody stanovení
silyl derivátů lignanů**

Bakalářská práce

Jan Bednář

Školitel: Prof. Ing. Jan Tříška, CSc.

České Budějovice 2016

Bednář, J., 2016: Optimalizace GC/MS metody stanovení silyl derivátů lignanů [Optimization of GC-MS method for the analysis of silyl derivatives of lignans. Bc. Thesis, in Czech] - 72 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The main goal of this work was optimization of GC-MS method for the analysis of lignans trimethylsilyl (TMSi-) derivatives of two model compounds – hydroximatairesinol (HMR) and enterolactone (ENTL). It included validation of GC-MS method for TMSi-HMR and TMSi-ENTL, comparison of chosen derivatization reagents and verification of time stability for TMSi-HMR. It was shown that TMSi-HMR and TMSi-ENTL provide a nonlinear calibration curve. Second order polynomial curve gave the best fitting and was used for method validation. N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide activated I and II (Sigma Aldrich) were selected as the best choice for simultaneous derivatization for HMR and ENTL mixture. Room temperature was confirmed to be appropriate for 3 days storage of TMSi-HMR. Also it was shown that storage at -80 °C preserve the lignan samples for at least 90 days storage.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 12. 12. 2016

Jan Bednář

Poděkování:

V této části bakalářské práce bych chtěl poděkovat zejména svému školiteli panu prof. Ing. Janu Třískovi, CSc., panu RNDr. Petru Kotasovi a paní RNDr. Naděždě Vrchotové a to nejen za množství cenných rad, kterými mi pomohli při řešení této bakalářské práce a které nepochybně využiji i při řešení dalších úkolů, ale také za jejich ochotu, která byla často nad běžný rámec jejich povinností.

OBSAH

CÍLE PRÁCE	1
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	2
1.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY A FUNKCE LIGNANŮ.....	2
1.1.1 <i>Struktura lignanů</i>	2
1.1.2 <i>Výskyt lignanů a jejich funkce</i>	3
1.1.3 <i>Lignany ve vodních ekosystémech</i>	9
1.2 STANOVENÍ LIGNANŮ GC/MS.....	10
1.2.1 <i>Plynová chromatografie</i>	10
1.2.2 <i>Hmotnostní detektory v plynové chromatografii</i>	11
1.2.2 <i>Princip a význam derivatizace</i>	13
1.2.3 <i>GC/MS analýza lignanů</i>	15
2 MATERIÁLY A METODY	18
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ČINIDLA	18
2.2 INSTRUMENTÁLNÍ VYBAVENÍ:	19
2.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ STANDARDŮ.....	20
2.4 DERIVATIZACE STANDARDŮ	21
2.5 SILANIZACE INZERTŮ	21
2.6 PODMÍNKY CHROMATOGRAFICKÉ SEPARACE A NASTAVENÍ MS DETEKTORU	22
2.7 POROVNÁNÍ ÚČINNOSTI DERIVATIZAČNÍCH ČINIDEL.....	22
2.8 MĚŘENÍ STABILITY TMSi-HMR NA IONTOVÉ PASTI	22
2.9 PODMÍNKY A ZPŮSOB PROVEDENÍ JEDNOTLIVÝCH TESTŮ	23
2.10 STATISTICKÁ VYHODNOCENÍ.....	23
2.10.1 <i>Účinnost derivatizačních činidel</i>	23
2.10.2 <i>Dlouhodobá stabilita TMSi-HMR</i>	24
2.10.3 <i>Krátkodobá stabilita TMSi-HMR</i>	24
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	25
3.1 OPTIMALIZACE MS-SIM METODY	25
3.2 POROVNÁNÍ ÚČINNOSTI DERIVATIZACE.....	27
3.3 VALIDACE GC/MS METODY	30

3.3.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	30
3.3.2 Test kalibrační křivky.....	31
3.3.3 Kalibrační křivka cholesterolu.....	32
3.3.4 Přídavek derivatizačního činidla	34
3.3.5 Derivatizační krok, silanizace inzertů.....	35
3.3.6 Typ lineru	37
3.3.7 Chromatografická kolona	39
3.3.8 Typ detektoru.....	40
3.3.10 HPLC/DAD	46
3.4 KONVEXNÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKA - VALIDACE	47
3.4.1 Linearita.....	48
3.4.2 Správnost a přesnost	50
3.4.3 Rozsah	51
3.5 STABILITA TMSi-HMR.....	51
3.5.1 Dlouhodobá stabilita TMSi-HMR	51
3.5.2 Krátkodobá stabilita TMSi-HMR.....	55
4 ZÁVĚR.....	57
5 REFERERENCE.....	59
6 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	66

CÍLE PRÁCE

V teoretické části bylo cílem shrnout dosavadní poznatky týkající se struktury, výskytu a funkcí lignanů v rostlinné říši. Dále pak sumarizovat poznatky z oblasti vlivu příjmu lignanů na lidský organizmus. S ohledem na zamýšlené využití metody optimalizované v rámci teoretické, se pak zvláště zaměřit na práce, které pojednávají o výskytu lignanů v povrchových vodách.

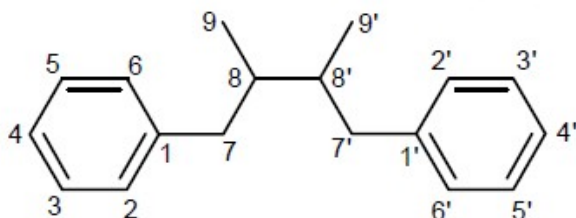
Cílem praktické části, byla optimalizace GC-MS metody pro stanovení vybraných druhů lignanů. Optimalizace se skládala z vlastní validace GC-MS metody pro stanovení hydroxymatairesinolu (HMR) a enterolaktonu (ENTL), porovnání účinnosti vybraných derivatizačních činidel a ověření stability silylovaných derivátů lignanů.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Základní charakteristiky a funkce lignanů

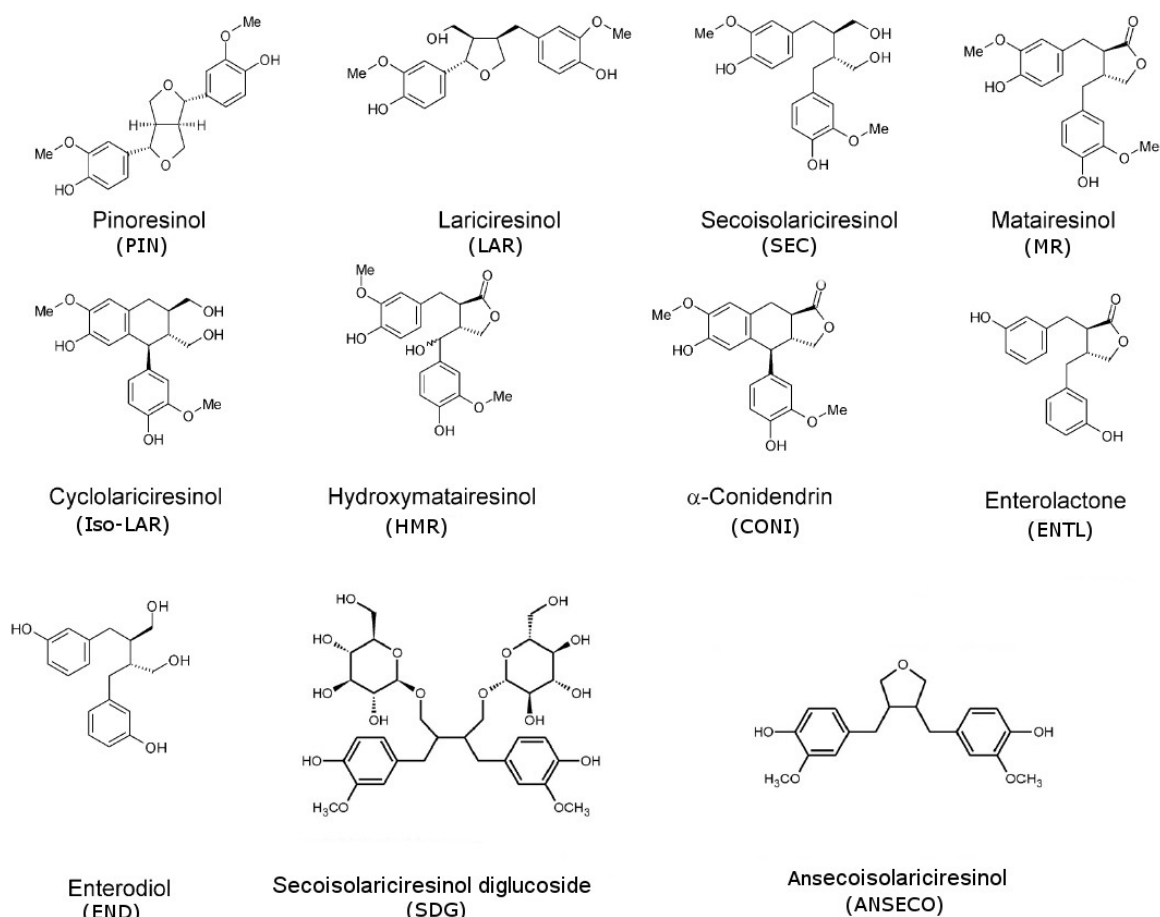
1.1.1 Struktura lignanů

Vlastní název lignany zavedl v roce 1936 Haworth a definoval je jako skupinu fenylypropanoidních dimerů [1]. Základní strukturální jednotka je uvedena na Obr. 1. Vedle této dimerní jednotky jsou známy i její trimery a tetramery, které je možné zařadit do skupiny oligolignanů [2].



Obr. 1: Základní strukturální prvek lignanů – dvě fenylypropanové jednotky spojené uhlíky v pozici 8, 8'.

Lignany jsou velice širokou skupinou rostlinných fytoestrogenů. Do dnešní doby bylo objeveno několik stovek látek řadících se do této skupiny. Strukturální vzorce hlavních lignanů objevujících se v této práci jsou znázorněny na Obr. 2.



Obr. 2: Strukturní vzorce vybraných lignanů včetně jejich názvů [3, 4].

1.1.2 Výskyt lignanů a jejich funkce

Výskyt lignanů byl do roku 2004 prokázán u více než 60 rostlinných čeledí. Zároveň byly lignany nalezeny v nejrůznějších částech rostlin: dřevnaté části, kořeny, listy, květy, plody a semena [5]. Lignany se mohou v buňkách vyskytovat jak volné, tak i glykosidicky vázané na širokou skupinu cukrů [6]. Výsledky studie srovnávající obsah volných a vázaných lignanů u lněných semínek jsou shrnuty v Tab. I.

Tab. I: Srovnání množství hydrolyticky odštěpených (pomocí HCl) a neodštěpených lignanů obsažených ve lněném semenu (slupka, embryo) s uvedenou směrodatnou odchylkou čtyřnásobně opakovaných extrakcí měřených na HPLC/TOF-MS systému [3].

Lignan	Část semene	Před hydrolýzou [ug/g]	Po hydrolýze [ug/g]
SECO	Slupka	ND	570 ± 120
	Embryo	ND	92 ± 16
ANSECO	Slupka	3,0 ± 0,1	860 ± 120
	Embryo	ND	46 ± 10
ISOLAR	Slupka	ND	32 ± 9
	Embryo	ND	11 ± 2
LAR	Slupka	ND	5 ± 3
	Embryo	ND	ND
SDG	Slupka	2,9 ± 0,3	110 ± 60
	Embryo	2,5 ± 0,5	470 ± 90
SMG	Slupka	ND	1710 ± 350
	Embryo	ND	1110 ± 180
Suma lignanů	Slupka	6,0 ± 0,3	3290 ± 500
	Embryo	2,5 ± 0,5	1730 ± 280

Z dat uvedených v Tab. I vyplývá, že drtivá většina lignanů je v semenu lnu obsažena ve vázané formě. S výjimkou SDG bylo také větší množství lignanů obsaženo ve slupce, tento rozdíl je obzvláště patrný pro SECO a ANSECO [3].

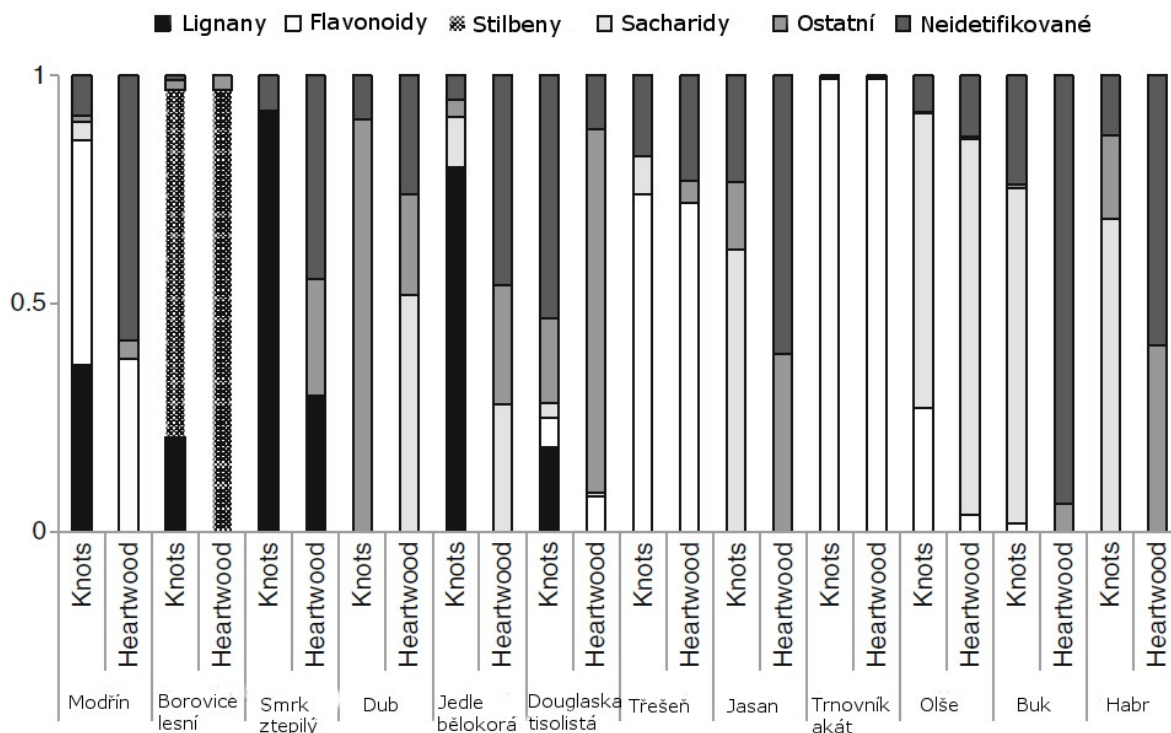
Výjimečně bohatými zdroji lignanů jsou tedy lněná semena spolu s jádrovým dřevem a suky některých druhů stromů. Obsah lignanů vybraných druhů rostlin je shrnut v Tab. II.

Tab. II: Obsah lignanů ve vybraných druzích rostlin (^a-jádrové dřevo, ^b-suk) [4].

Rostlina	SEC [ug/g]	MR [ug/g]	LAR [ug/g]	HMR [ug/g]	PIN [ug/g]	Ref.
Len (semeno)	3700	10,9	ND	NA	NA	[24]
	2900	5,5	30,4	NA	33,2	[39]
	12600	58,6	NA	NA	NA	[40]
Sezam (semeno)	293	4,8	95	NA	0,7	[39]
Žito (slupky)	1,3	1,7	NA	NA	NA	[41]
Žito (mouka)	7,2	1,7	NA	NA	NA	[40]
Žitný chléb	0,1	0,1	1,2	NA	1,7	[39]
Kapusta	0,2	0,1	6,0	NA	16,9	[39]
Brokolice	4,1	0,2	NA	NA	NA	[42]
	0,4	0	9,7	NA	3,2	[39]
Česnek	0,5	0	2,9	NA	2,0	[39]
Jahody	15,0	0,8	NA	NA	NA	[43]
	0	0	1,2	NA	2,1	[39]
Olivový olej	0	0	0	NA	2,4	[39]
Černý čaj	24,2	3,0	NA	NA	NA	[42]
Zelený čaj	28,9	2,0	NA	NA	NA	[42]
Smrk ztepilý	3-370 ^a	10-520 ^a	17-3700 ^a	NA	10-20 ^a	[44]
	1400-6800 ^b	1700-5500 ^b	1000-2500 ^b	36000-88000 ^b	D	[44]
Jedle bělokorá	140 ^a	250 ^a	180 ^a	150 ^a	20 ^a	[45]
	29000-36000 ^b	2500-2600 ^b	4600-10000 ^b	7000-7800 ^b	360-1000 ^b	[45]

Z dat uvedených v Tab. II vyplývá nejen to, že obsah lignanů se v různých studiích může i u jednoho druhu značně lišit, ale také to, že lignany jsou v jistém množství běžnou součástí lidského jídelníčku.

Zajímavé srovnání zastoupení lignanů v suchých a jádrovém dřevě při extrakci acetone m oproti dalším rostlinným metabolitům je pak zaznamenáno na Obr. 3.



Obr. 3: Poměrné zastoupení lignanů, flavonoidů, stilbenů, ostatních a neidentifikovaných látek v různých druzích stromů při extrakci acetonem (knots = suky, heartwood = jádrové dřevo) [7].

Z Obr. 3, je patrné, že lignany jsou zastoupeny výhradně u druhů jehličnatých a zároveň také, že lignany byly výrazněji zastoupeny pouze v jádrovém dřevě smrku ztepilého. Suky smrku ztepilého měly ze všech testovaných druhů nejvyšší zastoupení lignanů vůči ostatním látkám, zároveň byl v tomto extraktu hydroxymatairesinol zastoupen 64,3 % [7]. Těto skutečnosti se využívá pro extrakci čistého HMR [8].

Navzdory tomu, že o tématu lignanů byly napsány již stovky prací z nejrůznějších úhlů pohledu na tuto problematiku, bohužel o funkci lignanů v rostlinách je toho zatím známo jen málo a tato otázka je stále předmětem debaty. Předpokládá se, že lignany mohou hrát úlohou v obranyschopnosti rostlin a také působit jako faktory ovlivňující růst rostlin [4].

Zcela opačná situace panuje v oblasti studia biologické aktivity lignanů a jejich vlivu na zdravotní stav živočichů a člověka. Na toto téma již byly publikovány desítky prací. Lignanům jsou připisovány antivirové, protirakovinné (ve smyslu prevence i pozitivního

vlivu při onemocnění), protizánětlivé, antimikrobiální, antioxidantní, imunosupresivní a hepatoprotektivní účinky [9]. Dále pak byly prokázány také pozitivní účinky při prevenci osteoporózy [9], či zmírnění nežádoucích efektů spojených s menopauzou [10]. Díky všem těmto pozitivním účinkům přicházejí postupně na trh doplňky stravy s obsahem lignanů, například ve Velké Británii je možné zakoupit doplněk stravy s názvem 7-HMR, který obsahuje extrakt HMR ze smrkových suků. V České republice, stejně jako i v dalších členských státech EU, zatím nedošlo k oficiálnímu schválení lignanů jako doplňků stravy a to na rozdíl od stanoviska FDA, který v roce 2005 schválil HMR jako možný doplněk stravy [11]. Zajímavým aspektem v této souvislosti je vliv odlišných stereoizomerů HMR (HMR1 a HMR2) na savčí organizmus. Ve studii, kde byly porovnávány protizánětlivé účinky obou zmíněných stereoizomerů HMR bylo zjištěno, že majoritně se vyskytující izomer HMR1 protizánětlivé účinky má, ale minoritní izomer HMR2 nikoliv [12].

S problematikou konzumace lignanů je spojena i jejich metabolická přeměna. Během procesu trávení lignanů dochází v zažívacím traktu savců k přeměně některých rostlinných lignanů na tzv. lignany savčí (mammalian lignans). Jsou to především enterolakton a enterodiol, viz Obr. 2. Tyto savčí lignany jsou poté dále distribuovány v organismu a nakonec jsou vyloučeny z těla močí. V Tab. III jsou shrnuty výsledky studie zabývající se přeměnou vybraných rostlinných lignanů na lignany savčí in vitro [13].

Tab. III: Množství lignanu přidaného do fekální kultury, množství ENTL a END po 24 h inkubace a procentuální vyjádření přeměny prekurzoru po 24 h [13].

Lignan	Množství prekurzoru [nmol]	ENTL [nmol]	END [nmol]	Konverze za 24 h [%]
MR	3073	1973	0	62
SEC	3260	676	1643	72
PIN diglucoside	3504	664	1112	55
SYR diglucoside	2803	82	10	4,0
ARC glucoside	3745	198	0	5,5
HMR	2353	343	4	15
Iso-LAR	2722	0	0	0
LAR	2778	1290	1524	101

Výsledky uvedené v Tab. W3 ukazují, že naměřená konverze z rostlinných na savčí lignany je pro různé lignany značně odlišná a to v rozmezí 4,0 – 101 % [13].

S tématem metabolismu lignanů také úzce souvisí jejich vylučování. Ve studii, kde bylo testováno 234 nezávislých vzorků ženské moči na přítomnost isoflavonů a lignanů byla zjištěna průměrná koncentrace ENTL 1104 $\mu\text{g/l}$ se směrodatnou odchylkou 4370 $\mu\text{g/l}$, průměrná koncentrace END dosahovala 82 $\mu\text{g/l}$ se směrodatnou odchylkou 219 $\mu\text{g/l}$. Jak je patrné z hodnot směrodatných odchylek, variabilita mezi vzorky byla obrovská, což patrně souvisí s rozdílným obsahem lignanů ve stravě. Z uvedených dat byla dále vypočtena průměrná hodnota vylučování lignanů močí během 24 h a to na hodnotu 1,5 mg pro ENTL a 0,1 mg pro END [14].

1.1.3 Lignany ve vodních ekosystémech

Přítomností lignanů v povrchových a splaškových vodách se zabývá jen nemnoho studií. Jako o potenciálních zdrojích většího množství lignanů v povrchových vodách je možné uvažovat o vodách splaškových a odpadních vodách ze dřevozpracujícího průmyslu [15]. Výsledky studií zabývajících se obsahem lignanů v povrchových a splaškových vodách jsou shrnuty v Tab. IV.

Tab. IV: Koncentrace vybraných lignanů v povrchových a splaškových vodách.

Vodní zdroj	HMR [μg/l]	MR [μg/l]	SEC [μg/l]	LAR [μg/l]	Iso-LAR [μg/l]	HEL [μg/l]	ED [μg/l]	EL [μg/l]	CONI [μg/l]	Ref.
Ultračistá voda	ND	0,0059	ND	ND	ND	ND	ND	0,011	NA	[15]
Pitná voda	0,157	0,034	ND	0,0026	0,028	ND	ND	0,013	NA	[15]
Huminová voda	0,071	0,035	0,028	0,072	0,105	ND	0,0066	0,012	NA	[15]
Mořská voda	0,00048	ND	ND	ND	ND	ND	0,0018	0,026	NA	[15]
Nátok na ČOV	0,018	ND	ND	ND	ND	ND	0,019	1,223	NA	[15]
Odtok z ČOV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,018	0,659	NA	[15]
A	27,1	NA	D	NA	NA	NA	NA	NA	D	[16]
B	206,6	NA	D	NA	NA	NA	NA	NA	D	[16]
C	64,9	NA	D	NA	NA	NA	NA	NA	D	[16]
Potok	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,0002	0,005	NA	[17]
Nátok na ČOV	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,07	0,6	NA	[17]]

Z hodnot uvedených v Tab. IV je překvapivý zejména výskyt MR v ultračisté vodě. Tato skutečnost je autory diskutována jako důkaz, že ani dosavadní způsoby čištění vody nemohou lignany zcela odstranit. Stejným způsobem je hodnocena i přítomnost lignanů v pitné vodě. Autory je také nastiňována možnost přeměny rostlinných lignanů na lignany savčí a opačně působením bakterií a dalších mikroorganismů žijících ve vodě. Otázkou

možné kontaminace vzorků v průběhu jejich přípravy a měření se autoři nezabývají [15]. Rovněž překvapivá je vysoká koncentrace HMR naměřená na lokalitách A, B, C (pod tímto označením se ukrývají 3 odlišné zdroje povrchových vod v ČR). Zde autoři konstatují, že koncentrace lignanů v odpadních vodách z papíren mohou řádově dosahovat koncentrací až jednotek mg/l [16]. Avšak vzhledem k pozdějším měřením, které byly provedeny na typově podobných lokalitách a které dosud nebyly publikovány, se lze domnívat, že zmíněné vysoké koncentrace mohly být způsobeny kontaminací v průběhu přípravy vzorků. Obě studie sledující koncentraci ENTL a END v nátoku na ČOV pak dosáhly přibližně stejných hodnot [15, 17].

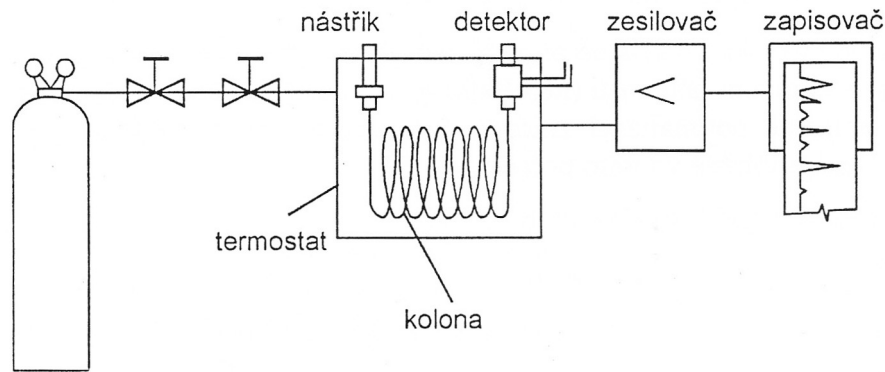
Bohužel, dosud žádná z publikovaných prací se nevěnovala vlivu lignanů na společenství organismů vyskytujících se v povrchových vodách. Nepochybně by však bylo vhodné, aby takové studii předcházela detailní screening obsahu lignanů v povrchových vodách, protože dosud bylo na toto téma publikováno jen málo údajů a navíc si ještě v některých ohledech odporují.

1.2 Stanovení lignanů GC/MS

1.2.1 Plynová chromatografie

Chromatografické metody jsou obecně využívány k separaci jednotlivých složek směsi látek mezi dvě fáze, stacionární a mobilní, a to na základě interakce přítomných analytů s prostředím, kterým prochází. V případě plynové chromatografie pak jde o interakci (afinitu) analytů v plynné fázi s fází stacionární (pevná látka nebo kapalina ukotvená na nosiči, eventuálně na stěně kapiláry). Z toho vyplývají i nutné předpoklady pro použití plynové chromatografie. Analyzované látky by měly být těkavé a termostabilní. Tyto předpoklady v praxi splňuje celá řada organických sloučenin, a proto nachází plynová chromatografie v analytických laboratořích velice široké uplatnění [18].

Plynový chromatograf se obvykle skládá z: zdroje nosného plynu, regulátoru průtoku nosného plynu, termostatované nástřikové komůrky, chromatografické kolony uložené v termostatovaném prostoru, detektoru, zesilovače signálu a záznamového zařízení. Schematické zapojení viz Obr. 4 [18].



Obr. 4: Schematické uspořádání jednotlivých částí plynového chromatografu [18].

Klíčovou úlohu pro separaci látek pak má výběr chromatografické kolony. Kolony pro plynovou chromatografii můžeme rozdělit na náplňové a kapilární. Délky náplňových kolon se obvykle pohybují v řádech desetin až jednotek metrů při vnitřním průměru v rozsahu 3 – 8 mm. Délka kapilárních kolon se pak pohybuje v řádech desítek metrů při vnitřním průměru 0,1 – 0,53 mm. Výhodou kapilárních kolon je obecně lepší dělicí schopnost (počet teoretických pater). V současné době jsou využívány především křemenné (fused silica) kapilární kolony, na jejichž vnitřním povrchu je nanášena vrstva stacionární fáze, tloušťka této fáze se pohybuje od desetiny mikrometru po jednotky mikrometrů. Tyto fáze se pak odlišují svojí polaritou. Obecně je možné uvést, že chromatografická kolona nejlépe dělí právě ty látky, které mají podobnou polaritu jako její stacionární fáze [18].

Dalšími faktory ovlivňujícími separaci látek při použití plynového chromatografu jsou: druh nosného plynu (He , N_2 , H_2), průtok nosného plynu, objem nastříkovaného vzorku, teplota nástřiku, nastavení teplotního programu... [19]

Problematika plynové chromatografie a s ní spojených jevů je velice obsáhlou vědní disciplínou a její detailnější popis je zcela mimo rozsah této práce.

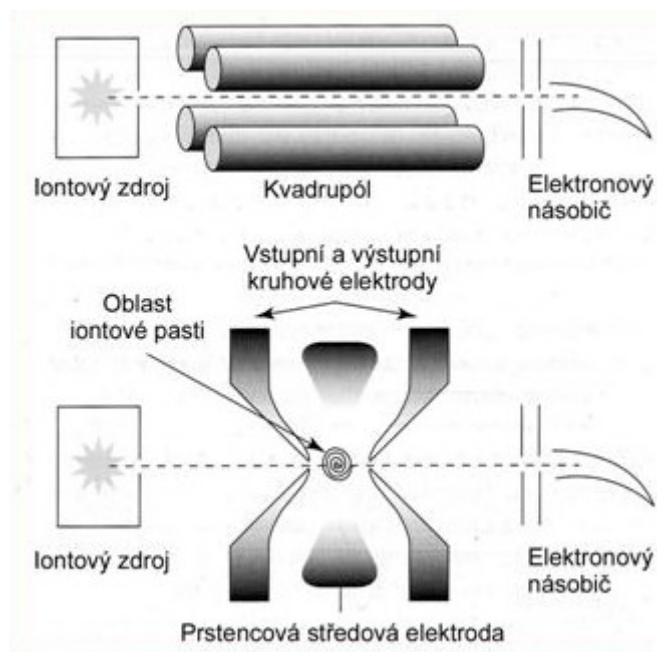
1.2.2 Hmotnostní detektory v plynové chromatografii

Ve spojení s plynovým chromatogramem je možné použít celou řadu detektorů: tepelně vodivostní detektor (TCD), plamenově ionizační detektor (FID), detektor

elektronového záchytu (ECD), analyzátor iontové mobility (IMS), hmotnostní spektrometr (MS) a celou řadu dalších. A právě hmotnostní detektory patří v současné době k velice využívaným způsobům detekce a to díky jejich vysoké univerzálnosti, dobré citlivosti a možnosti získat údaje o struktuře molekul. Hmotnostní detektory využívají principu, že nabitě částice (ionty) lze při průchodu elektromagnetickým polem ve vakuu rozlišit dle poměru jejich hmotnosti k velikosti neseného náboje (m/z). Obecně tak lze říci, že hmotnostní detektor se skládá z iontového zdroje, separátoru iontů a vlastního detekčního zařízení. Nutnou součástí je i vývěva evakuující prostor hmotnostního detektoru [18, 19].

Nejčastěji používaným způsobem ionizace v plynové chromatografii pak je ionizace nárazem elektronu (EI). Při této technice jsou molekuly ionizovány proudem elektronů s energií typicky 70 eV emitovaných žhaveným vláknem. Při nárazu takového elektronu do neutrální molekuly dojde k vytržení jednoho z elektronů v elektronovém obalu molekuly a vznikne tak kladně nabitý molekulární ion – M^+ . Pokud je takto vzniklý ion nestabilní v důsledku nadbytku vnitřní energie, dojde k jeho rozpadu na neutrální a ionizovaný fragment. Jednotlivých ionizovaných fragmentů vzniká celá řada, dohromady pak tyto fragmenty tvoří fragmentační spektrum, které je pro každou molekulu typické. Této vlastnosti využívají takzvané knihovny spekter, což jsou databáze umožňující porovnání fragmentačního spektra hledané molekuly s fragmentačními spektry naměřených standardů. Existuje také řada pravidel umožňujících na základě velikosti a zastoupení fragmentů určit jejich atomové složení, typy vazeb v molekule a posléze tak určit o jakou látku se jedná. Takové určení je však u složitějších molekul velice komplikované a nemusí být ani možné. Proto se v praxi využívají již zmíněné knihovny spekter [18, 19].

V praxi jsou momentálně nejčastěji využívány tři typy iontových separátorů a jejich vzájemných kombinací. Jsou to analyzátor doby letu (TOF), kvadrupólový analyzátor (ISQ) a iontová past (IT). Schematické znázornění analyzátorů využitých v praktické části viz Obr. 5.



Obr. 5: Schematické znázornění kvadrupólového analyzátoru a iontové pasti [20].

Podrobnější popis dějů probíhajících v hmotnostních detektorech, výhody či nevýhody spojené s použitím konkrétních detektorů a možností jejich kombinací, jsou zcela mimo rozsah této práce.

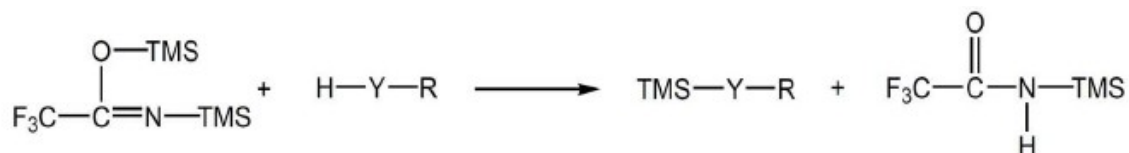
1.2.2 Princip a význam derivatizace

Jak už bylo zmíněno v kapitole zabývající se plynovou chromatografií, je tato technika vhodná zejména pro látky těkavé a termostabilní. Podmínku těkavosti obvykle splňují zejména látky nepolární a málo polární. U organických látek obsahujících funkční skupiny zvyšující polaritu molekuly (-OH, -COOH, -SH, -NH₃, =O...) je vhodné tyto skupiny modifikovat navázáním méně polárních skupin. Tato technika je označována jako derivatizace. [21] A právě řada lignanů patří mezi látky jenž je vhodné derivatizovat. U lignanů měřených v této práci šlo o derivatizaci volných -OH skupin vysoce zvyšujících polaritu molekuly.

V současné době je nejvíce využívána derivatizace pomocí silylace polárních skupin. Při této technice je nejčastěji vodík nahrazen křemíkem s navázanými methylovými skupinami [21]. Pro derivatizaci -OH skupin lignanů je typicky využívána skupina -Si(CH₃)₃ [3, 7, 14, 15, 16, 21, 22, 23]. Pouze ve dvou pracích bylo popsáno měření lignanů pomocí GC-MS bez derivatizace. V první z nich však 3 z pěti lignanů

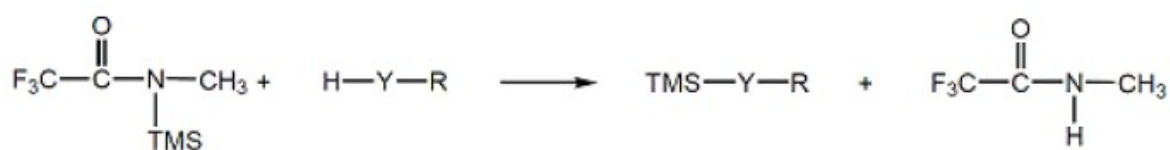
sledovaných v této práci neměly žádnou -OH ani =O skupinu, zbylé 2 lignany pak měly po jedné -OH skupině [25]. Ve druhé práci pak byly nederivatizované lignany použity pro určení jejich fragmentačních spekter. Pro kvantifikaci pak ale byly využity TMSi deriváty lignanů, nebo HPLC s detekcí v UV oblasti [26].

V drtivě většině prací bylo k derivatizaci lignanů použito BSTFA s 1 % TMCS, kdy jako prostředí pro reakci byl využíván bezvodý pyridin nebo acetonitril [7, 14, 16, 22, 23]. Přídavek 1 % TMCS k BSTFA má za cíl katalyzovat reakci u stericky bráněných funkčních skupin [21]. Reakční mechanismus BSTFA s -OH skupinou viz Obr. 6. Ve dvou studiích byla použita derivatizační směs pyridinu, HMDS a TMCS v poměru 9:3:1 (v/v/v) [24, 27].



Obr. 6: Schéma reakce BSTFA (TMS = -Si(CH₃)₃) s uhlovodíkem s polární -YH skupinou (Y= O, S, NH, NR', COO...) [21].

Obdobným mechanismem, jako u BSTFA probíhá derivatizace i v případě MSTFA, které bylo často používáno v praktické části této práce. Reakční mechanismus viz Obr. 7.



Obr. 7: Schéma reakce MSTFA (TMS = -Si(CH₃)₃) s uhlovodíkem s polární -YH skupinou (Y= O, S, NH, NR', COO...) [21].

MSTFA může být dále obohaceno o katalyzující látky, které vylepšují derivatizační účinnost pro různé skupiny látek. Takovým příkladem může být přídavek jodidu amonného, které se přeměňuje na trimethyljodosilan. V takovém případě je k MSTFA přidán i ethanthiol, aby nedocházelo k tvorbě jodovaných derivátů. Tomu je zabráněno tím, že vodík z ethanthiolu se naváže na jodidový ion a ethanthiol dimerizuje na diethyl

disulfid [28]. Takto aktivované MSTFA je v katalogu Sigma Aldrich označeno jako MSTFA activated I. Dalšími možnými způsoby aktivace je například přídavek 2-(Trimethylsilyl)ethanliolu (MSTFA activated II u Sigma Aldrich) či přídavek imidazolu (MSTFA activated III u Sigma Aldrich). Derivatizační účinnost takto upraveného MSTFA se může pro různé skupiny látek dramaticky lišit [29].

1.2.3 GC/MS analýza lignanů

Při analýzách obsahu lignanů v nejrůznějších matricích je obvyklým postupem extrakce lignanů pomocí SPE či LLE, v některých případech doplněná o odštěpení vázaných lignanů. Analytickou koncovkou je pak obvykle kapalinová či plynová chromatografie ve spojení s nejrůznějším typem detektorů. V literatuře je uváděna i možnost separace lignanů pomocí chromatografie na tenké vrstvě, která se dnes již příliš nevyužívá [26, 30]. Pokud jde o volbu mezi kapalinovou a plynovou chromatografií, tak ve většině prací je využívána chromatografie kapalinová, ale i plynová chromatografie je užívána nezdřídka.

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, při využití plynové chromatografie pro separaci lignanů předchází analýze téměř vždy derivatizační krok. V takovém případě jsou používány nepolární až mírně polární kolony – od 100 % dimethylpolysiloxanu po kolony s 5% obsahem fenylmethylpolysiloxanu. Konkrétní příklady použitých stacionárních fází: ZB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, Phenomenex) [16], HP-1 (25 m x 0,20 mm x 0,11 μ m, Agilent Technologies) [15], DB-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, J&W Scientific) [3], GC-1 (15 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, GC2 Chromatography) [14] a HP5-ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, J&W Scientific) [22].

Teplotní gradient pak měl obvykle podobu rychlého nárůstu teploty na více než 200 °C a pozvolnějšího nárůstu k 300 °C. Konkrétní teplotní gradienty pak byly velice variabilní co do počáteční teploty, rychlosti nárůstu teplot, či isothermických prodlev [3, 7, 14, 16, 21, 22, 23].

Pokud jde o způsob detekce lignanů v plynové chromatografii, tak nejpoužívanější metodou je v současnosti MS [3, 7, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 26]. Možné je použít i další typy detektorů vhodných pro GC jako například IMS [31], nebo FID [30].

Bohužel pouze některé práce uvádějí alespoň základní validační charakteristiky pro GC-MS analýzu lignanů a to ještě v různém rozsahu a nalezené/vypočtené různými metodami. Tato údaje jsou tak jen velice těžko porovnatelné. Nalezené validační charakteristiky jsou shrnuty v Tab. V.

Tab. V: Základní validační charakteristiky pro GC-MS systém při analýze lignanů.

Typ MS detektoru	Koncentrace kalibračních bodů [µg/ml]	LOD [µg/ml]	R ²	Reference
IT	0; 0,1; 1; 5; 10; 20	1,32	0,9975	[16]
ISQ-SIM	0,025 - 5	0,0038 – 0,00802	0,9977-0,9991	[27]
ISQ-SIM	NR	0,00002 – 0,003	0,989-1,000	[3]
ISQ-TIC	NR	0,00005 – 0,0096	0,983-0,999	[3]
ISQ-SIM	pro R ² : 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,5; 1; 2 pro LOD: 0; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,025	0,0012 – 0,0053	>0,999	[14]

Z Tab. V je patrné, že hodnoty LOD se liší a to až o 5 řádů v rámci různých studií, lignanů a přístrojů. Avšak i hodnoty pro různé lignany měřené v rámci jedné studie se mohou lišit až o 2 řády. Obdobně variabilní jsou pak i koeficienty determinace. Hodnoty správnosti a přesnosti pro jednotlivé koncentrační hladiny pak nebyly uvedeny ani u jedné z prací.

Zajímavé srovnání LOD mezi GC a HPLC systémy pro 9 různých lignanů provedené v rámci jedné studie je uvedeno v Tab. VI.

Tab. VI: Limity detekce pro 9 vybraných lignanů měřených s využitím různých HPLC-MS a GC-MS systémů [3].

Systém	ANSECO [μg/ml]	END [μg/ml]	ENTL [μg/ml]	Iso-LAR [μg/ml]	LAR [μg/ml]	MR [μg/ml]	PIN [μg/ml]	SDG [μg/ml]	SEC [μg/ml]
HPLC TOF-MS	0,000008	0,000007	0,000002	0,000006	0,000043	0,000006	0,000006	0,000008	0,000008
HPLC MS/MS	0,000001	0,00001	0,000003	0,000004	0,00001	0,000002	0,000009	0,000005	0,000005
GC MS-SIM	0,0001	0,00002	0,00012	0,0021	0,003	0,0023	0,0026	ND	0,00011
GC MS-TIC	0,00021	0,00005	0,00033	0,0096	0,0039	0,0065	0,0045	ND	0,00028

Z výsledků studie uvedených v Tab. VI jednoznačně vyplývá, že pro velice nízké koncentrace lignanů je výhodnější použít HPLC. Zajímavé také je, že u jednoho HPLC systému je maximální rozdíl mezi různými hodnotami LOD přibližně řádový. Naproti tomu u GC systému je tento rozdíl přibližně v rozsahu dvou řádů. Avšak významnou roli v tomto srovnání může hrát i fakt, že ve spojení s HPLC byl použit ISQ-TOF a TSQ, zatímco ve spojení s GC byl použit pouze ISQ [3]. Pro praktické využití pak také nelze opomenout značný cenový rozdíl mezi jednotlivými systémy.

2 MATERIÁLY A METODY

2.1 Použité chemikálie a činidla

Standardy:

HMR extrahovaný v laboratoři [32]

ENTL, ArboNova (Turku, Finsko)

PIN, ArboNova (Turku, Finsko)

Iso-LAR, ArboNova (Turku, Finsko)

LAR, ArboNova (Turku, Finsko)

MR, ArboNova (Turku, Finsko)

CONI, ArboNova (Turku, Finsko)

SEC, ArboNova (Turku, Finsko)

Derivatizační činidla:

BSTFA-staré, Fluka Chemie AG, č. šarže: 273899

BSTFA-nové, Aldrich, č. šarže: SHBF5856V

BSTFA + 1 % TMCS, Aldrich, č. šarže: BCBL6267V

MSTFA, Aldrich, č. šarže: BCBL4248V

MSTFA-I, Aldrich, č. šarže: BCBL6267V

MSTFA-II, Aldrich, č. šarže: BCBK3091V

MSTFA-II, Aldrich, č. šarže: BCBN0324V

MSTFA-III, Aldrich, č. šarže: BCB65587V

MSTFA-II, Aldrich, č. šarže: BCBN0324V + jodid amonný *

MSTFA-II, Aldrich, č. šarže: BCBN0324V + jodid amonný a ethanthiol *

* připravené Bc. Lýdií Plačkovou

Ostatní:

Dimethyldichlorsilan, Restek

Methanol, Merck

Toluen, Merck

Hexan, Merck

Dusík z generátoru

Helium 5.0; Messer

2.2 Instrumentální vybavení:

MS detektor: ITQ 1100, Thermo Fischer Scientific

MS detektor: ISQ, Thermo Fischer Scientific

MS detektor: TSQ 8000 Evo Triple Quadrupole, Thermo Fischer Scientific

FID detektor pro Trace 1300 GC series, Thermo Fischer Scientific

Plynový chromatograf: Trace GC Ultra, Thermo Fischer Scientific

Plynový chromatograf: Trace 1310, Thermo Fischer Scientific

Chromatografická kapilární kolona: Rxi-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Restek

Chromatografická kapilární kolona: Rxi-1ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Restek

Chromatografická kapilární kolona: TR-5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Thermo Fischer Scientific

Generátor dusíku: Peak Scientific NM32LA

Analytické váhy: Sartorius 1712

Dry block: Pierce Reacti-Therm, Thermo Fischer Scientific

Software:

Sada nástrojů MS Office

Statistica 13

Xcalibur 2.2 SP1.48

Chromeleone 7

2.3 Příprava roztoků standardů

Zásobní roztoky standardů lignanů byly připraveny dle Tab. VII. Výjimkou byl zásobní roztok cholesterolu, který byl naředěn toluenem.

Tab. VII: Způsob přípravy zásobních roztoků.

Látka	Navážka [mg]	Objem Me-OH (*Toluen) [ml]	Koncentrace zásobního roztoku [mg/ml]
HMR I+II	15,97	3	5,323
ENTL	10,950	2	5,475
Iso-LAR	2,42	2	1,210
SEC	2,34	2	1,170
MR	2,47	2	1,235
LAR	2,34	2	1,170
CONI	2,04	2	1,020
PIN	2,41	2	1,205
CHOL	6,20	3*	2,067

Ze zásobních roztoků byly dále připraveny roztoky pracovní, viz Tab. VIII.

Tab. VIII: Způsob přípravy zásobních roztoků.

Látka	Koncentrace pracovního roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Objem zásobního roztoku [μl]	Finální objem [μl]
HMR I+II*	30; 500	56,4; 187,7	10000; 2000
ENTL*	30; 500	54,8; 182,6	10000; 2000
Iso-LAR	20; 500	66,1; 826,4	4000; 2000
SEC	20; 500	68,4; 854,7	4000; 2000
MR	20; 500	64,8; 809,7	4000; 2000
LAR	20; 500	68,4; 854,7	4000; 2000
CONI	20; 500	78,4; 980,4	4000; 2000
PIN	20; 500	66,4; 829,9	4000; 2000
CHOL	10; 500	19,4; 483,8	4000; 2000

*HMR a ENTL byly připraveny jako směsný standard do jedné vialky.

Z pracovního roztoku HMR, CHOL a ENTL byl poté připraven desetinasobným ředěním pracovní roztok o koncentraci 3 µg/ml a 1 µg/ml. V některých případech byly rozředěny ještě další pracovní roztoky o jiných koncentracích, což je vždy v textu uvedeno. Jako interní standard byl také využíván roztok Me-C19 v hexanu. Jeho zásobní roztok o koncentraci 250 µg/ml byl připraven laborantkou. Z něj byly dále připravovány pracovní roztoky o koncentraci 1 a 10 µg/ml.

Pro velkou variabilitu v přípravách kalibračních křivek a dalších měřených roztoků, jsou konkrétní způsoby přípravy vždy uvedeny v příslušné podkapitole. Veškeré roztoky byly uchovávány v mrazničce při -18 °C.

2.4 Derivatizace standardů

Příslušný objem methanolického roztoku lignanu byl převeden do insertu o objemu 250 µl. V případě dávkování méně než 100 µl roztoku lignanu bylo do insertu předtím nadávkováno 100 µl čistého methanolu, aby nemohlo docházet k nereprodukovatelným odchylkám během dávkování. V případě použití CHOL jako ISTD byl v tuto chvíli nadávkován i příslušný objem roztoku CHOL. Obsah insertu byl poté odpařen do sucha proudem dusíku, poté bylo přidáno 40 µl derivatizačního činidla (v případě BSTFA a BSTFA s 1 % TMCS spolu s 40 µl pyridinu), roztok byl důkladně vortexován. Derivatizace probíhala po dobu 30 minut při teplotě 70 °C. Poté byly vzorky opět odpařeny do sucha proudem dusíku a naředěny čistým hexanem (nebo roztokem Me-C19), roztok byl důkladně protřepán. V případě odchylky od tohoto postupu je tento fakt vždy zaznamenán v příslušné podkapitole. Pokud není v textu uvedeno jinak, bylo k derivatizaci použito MSTFA-II.

2.5 Silanizace insertů

Deaktivace insertů byla provedena technikou silanizace a to pomocí DMDCS. K vlastní silanizaci byl použit 5 % roztok DMDCS v toluenu (v/v). Tímto roztokem byly naplněny inserty. Po 15 minutách byl roztok DMDCS odstraněn a inserty dvakrát propláchnuty toluenem. Poté byly inserty naplněny methanolem. Po 15 minutách byl

odstraněn methanol a inzerty ještě jednou propláchnuty methanolem. Na závěr byly inzerty vysušeny proudem dusíku.

2.6 Podmínky chromatografické separace a nastavení MS detektoru

Pokud v textu příslušné podkapitoly není uvedeno jinak, byl použit ISQ detektor a plynový chromatograf Trace GC Ultra, vybavený chromatografickou kapilární kolonou Rxi-5ms, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m a linerem Sky 3.0 mm ID Single Taper.

Jako nosný plyn bylo použito helium. Nastříkovan byl objem 1 μ l v splitless modu při teplotě 250 °C, split po 1 minutě, 50 ml/min. Konstantní průtok helia byl nastaven na 1 ml/min. Teplotní program byl následující: počáteční teplota 140 °C, poté nárůst na 250 °C rychlostí 40 °C/min, další nárůst na 283 °C při 5 °C/min, poté další zvýšení teploty na 300 °C rychlostí 2 °C/min a na závěr nárůst na 310 °C rychlostí 20 °C/min, tato teplota byla následně držena po dobu 1 min. Teplota transfer line byla 250 °C, iontový zdroj byl nastaven na teplotu 200 °C a ionizační energie na 70 eV. Počátek skenování iontů byl v čase 7,00 min.

2.7 Porovnání účinnosti derivatizačních činidel

Srovnání účinnosti derivatizace bylo provedeno na dvou koncentračních úrovních a to 0,05 μ g/ml a 4,5 μ g/ml. Všechny vzorky byly připraveny ve třech opakováních. Pro eliminaci možné fluktuace odezvy ISQ byl v každém vzorku přítomen Me-C19 o koncentraci 1 μ g/ml. Výsledky byly poté statisticky vyhodnoceny.

2.8 Měření stability TMSi-HMR na iontové pasti

Z provozních důvodů laboratoře musel být test dlouhodobé stability TMSi-HMR měřen na iontové pasti (ITQ 1100; Thermo). Pro měření kalibrační křivky na iontové pasti byl vzhledem k nižší citlivosti iontové pasti upraven i rozsah kalibrační křivky na 10 – 50 μ g/ml. Z toho důvodu byla zvolena koncentrace HMR na 30 μ g/ml. Metoda nebyla s tímto typem detektoru plně validována, ale byla ověřena přesnost a správnost této

metody na koncentrační hladině 30 µg/ml. Pro tento test bylo připraveno 10 samostatných vzorků. Vzorky byly připraveny převedením 200 µl pracovního roztoku o koncentraci 30 µg/ml do inzertu. Kvůli velké fluktuaci odezvy iontové pasti byl jako interní standard použit roztok cholesterolu o koncentraci 100 µg/ml, kterého bylo přidáno ke vzorku 20 µl. Po finálním naředění na 200 µl tak byla výsledná koncentrace cholesterolu 10 µg/ml. Při přípravě kalibračních křivek bylo přidáno 15 µl roztoku cholesterolu o koncentraci 100 µg/ml. Po finálním naředění na 150 µl tak byla výsledná koncentrace cholesterolu opět 10 µg/ml. Naměřená data byla statisticky vyhodnocena.

2.9 Podmínky a způsob provedení jednotlivých testů

Kvůli velkým odlišnostem v průběhu příprav jednotlivých měření a velkému počtu dílčích testů bylo rozhodnuto, že kvůli lepší přehlednosti budou některé informace, které jsou obvykle uváděny právě v kapitole Materiály a metody, uvedeny vždy až na začátku příslušné podkapitoly v oddíle Výsledky a diskuze. Jedná se zejména o informace související s koncentrací, množstvím a způsobem přípravy kalibračních bodů. Uvedení těchto informací pro všechna provedená měření v tomto oddíle by bylo velice nepřehledné a pro čtenáře při hodnocení výsledků v oddíle Výsledky a diskuze matoucí.

2.10 Statistická vyhodnocení

Výsledky měření porovnání účinnosti derivatizačních činidel a stability TMSi HMR byly vyhodnoceny v programu Statistika 13.

2.10.1 Účinnost derivatizačních činidel

Získaná data byla analyzována metodou jednocestné ANOVY a to pro každý analyt a koncentrační úroveň zvlášť – celkem tedy 4 analýzy. Homogenita variance byla v každé skupině otestována pomocí Bartlet, Cochran C a Hartley testu, kdy při neprůkaznosti tohoto testu můžeme předpokládat, že variance jsou homogenní a tudíž je možné použít ANOVA testy. Dále byl proveden Tukeyho post hoc test k rozřídění jednotlivých

derivatizačních činidel do statisticky významně odlišných skupin dle účinnosti derivatizace.

2.10.2 Dlouhodobá stabilita TMSi-HMR

Získaná data byla analyzována metodou jednostranné ANOVY pro opakovaná měření. Kvůli vyšší variabilitě uvnitř triplikátů v důsledku měření na ITQ, byly naměřené hodnoty koncentrací před statistickým vyhodnocením logaritmovány. Pomocí testu Bartlet, Corchan C a Hartley byla otestována homogenita variancí. Dále byl proveden Tukeyho post hoc test k rozlišení vlivu jednotlivých teplot uskladnění a doby uskladnění.

2.10.3 Krátkodobá stabilita TMSi-HMR

Neměřená data byla analyzována metodou jednostranné, jednocestné ANOVY. Pomocí testu Bartlet, Corchan C a Hartley byla ověřena homogenita variancí.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace MS-SIM metody

Optimalizace MS-SIM metody zahrnovala určení retenčních časů vybraných TMSi derivátů lignanů a Me-C19 pro určení jednotlivých časových SIM oken a výběr nejvhodnějších specifických iontů. Hlavním kritériem pro výběr iontů byl poměr signálu k šumu a jednoznačná identifikace dané látky. Pro měření byly použity roztoky lignanů a Me-C19 o koncentraci 10 µg/ml. Způsob ředění jednotlivých roztoků je uveden v Tab. IX.

Tab. IX: Ředění pracovních roztoků lignanů pro stanovení jejich RT a fragmentačních spekter.

Látka	Koncentrace pracovního roztoku [µg/ml]	Objem pracovního roztoku [µl]	Finální objem po derivatizaci [µl]
Me-C19	250	8	200
ENTL	30	67,7	200
Iso-LAR	20	100	200
SEC	20	100	200
HMR I+II	30	67,7	200
MR	20	100	200
LAR	20	100	200
CONI	20	100	200
PIN	20	100	200
CHOL	10	200	200

Lignany byly před měřením derivatizovány MSTFA-II dle postupu uvedeného v oddíle Materiály a metody. Podmínky chromatografické separace byly nastaveny dle popisu uvedeného v oddíle Materiály a metody. Pro zjištění fragmentačních spekter byl hmotnostní spektrometr nastaven na skenování v rozsahu 50-700 m/z. Naměřené retenční časy, časová okna a vybrané ionty jsou uvedeny v Tab. X.

Tab. X: Retenční časy TMSi derivátů lignanů, časová okna a ionty vybrané pro SIM metodu naměřené na chromatografické koloně s fází Rxi-5ms.

Látka	Retenční čas [min]	Časové okno [min]	Ionty [m/z]
Me-C19	5,11	4,00-8,00	312; 269
ENTL	9,28	8,00-10,30	442; 180; 263
Iso-LAR	10,98	10,30-11,30	558; 437; 455; 527
SEC	11,49	11,30-13,00	560; 261; 439; 470
HMR-II	13,36	13,00-14,10	590; 297; 500
HMR-I	13,51	13,00-14,10	590; 297; 500
MR	13,51	13,00-14,10	502; 209
LAR	14,37	14,10-14,50	576; 324; 455; 486
CONI	14,66	14,50-15,30	500; 385; 470; 485
PIN	16,35	15,30-17,30	502; 223; 235
CHOL	13,34	13,00-13,42	458, 368; 336

Jak je z Tab. X patrné, používaný standard HMR obsahoval oba jeho izomery [12] a tyto izomery byly separovány. Dále se ukázalo, že na použité chromatografické koloně se stacionární fází Rxi-5ms dochází ke koeluci mezi TMSi-HMR-II a TMSi-CHOL. Tento fakt nebyl překážkou při testech, neboť v používaném standardu HMR byl izomer HMR-II zastoupen pouze minoritně. Pro měření přírodních vzorků by ovšem bylo nutné používat jiný ISTD, či vyzkoušet jinou chromatografickou kolonu. Dále také nebylo možné oddělit HMR-I od MR a to i přes to, že mají značně odlišnou molekulovou hmotnost: TMSi-HMR= 590 g/mol; TMSi-MR= 502 g/mol. Protože cílem bylo připravit metodu pro stanovení lignanů v povrchových vodách, kde může být přítomen HMR i MR [15], byla otestována chromatografická kolona Rxi-1ms. Všechny ostatní chromatografické podmínky byly nezměněny. Výsledky měření na této koloně jsou shrnuty v Tab. XI.

Tab. XI: Retenční časy TMSi derivátů lignanů na chromatografické koloně s fází Rxi-1ms.

Látka	Retenční čas [min]
Me-C19	4,81
ENTL	9,09
Iso-LAR	10,71
SEC	11,30
MR	12,55
HMR-II	12,72
HMR-I	12,88
CONI	13,25
LAR	13,55
PIN	14,86

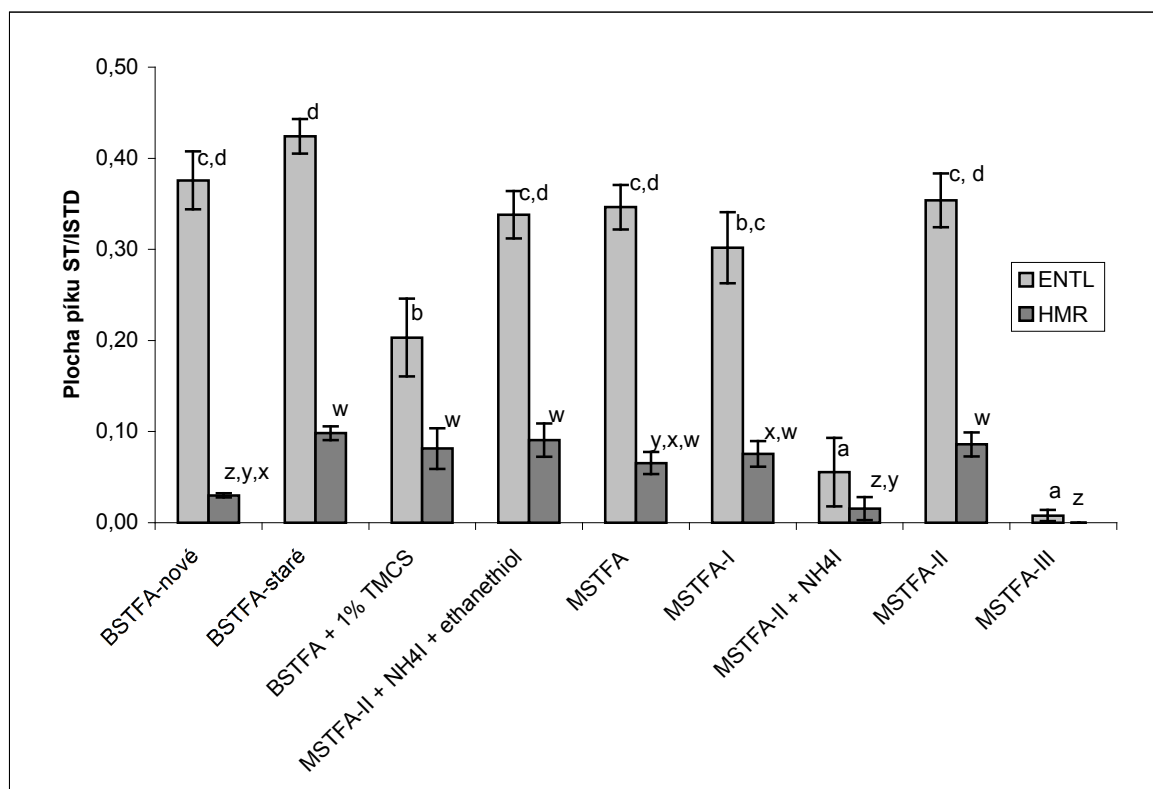
Naměřené retenční časy uvedené v Tab. XI ukazují, že na chromatografické koloně s fází Rxi-1ms dochází k rozdělení TMSi derivátů HMR-I a MR. Zároveň s touto změnou však nedošlo k žádnému překrytí retenčních časů ostatních měřených látek. Na základě tohoto měření je tak možné doporučit chromatografickou kolonu s fází Rxi-1ms pro měření vzorků s předpokládaným obsahem lignanů uvedených v Tab. XI. Z provozních důvodů laboratoře však nebylo možné, aby byla v plynovém chromatografu dlouhodobě nainstalována kolona s fází Rxi-1ms a proto byla veškerá další měření prováděna na kolonách s fází Rxi-5ms. Během dalších optimalizačních kroků již byly měřeny pouze ENTL a HMR, tudíž tato skutečnost neměla na práci žádný vliv. Dle hodnot uvedených v Tab. X bylo provedeno nastavení hmotnostního spektrometru pro detekci TMSi derivátů HMR-I; HMR-II; ENTL a Me-C19.

3.2 Porovnání účinnosti derivatizace

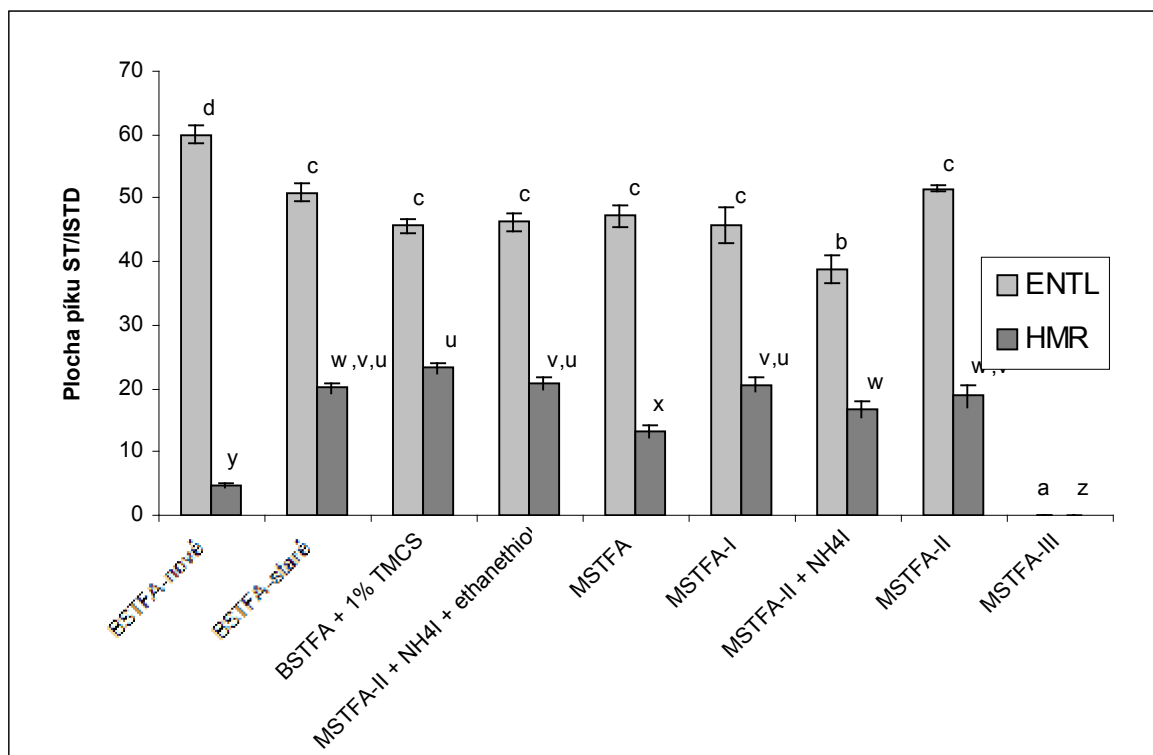
Při plánování tohoto pokusu došlo k problémům s dodanou šarží MSTFA-II, kdy toto činidlo přestalo derivatizovat keto skupiny steroidních látek, které v té době v laboratoři stanovovány. Tento problém byl vyřešen přidavkem jodidu amonného a ethanthiolu k derivatizačnímu činidlu (dosud nepublikovaná data Bc. Lýdie Plačková). Bylo proto rozhodnuto, že bude otestováno i vliv přidavku těchto látek k MSTFA-II na derivatizaci -OH skupin lignanů.

Test homogenity variance (Bartlet, Corchan C a Hartley) vyšel na obou koncentračních úrovních u všech skupin neprůkazně na hladině významnosti 5 %.

Jednocestnou analýzou variance otestovaný předpoklad, že žádné derivatizační činidlo se svou derivatizační účinností neliší, byl zamítnut na nižší ($p < 0,0001$; $df = 8;18$) i na vyšší ($p < 0,0001$; $df = 8;17$) koncentrační úrovni. Celkové výsledky spolu s výsledky Tukey post hoc testu jsou graficky znázorněny na Obr. 8 a 9.



Obr. 8: Graf poměrů ploch píků Me-C19 a příslušného lignanu o koncentraci 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Odlišná písmena označují statisticky významně odlišné skupiny.



Obr. 9: Graf poměrů ploch píků Me-C19 a příslušného lignanu o koncentraci 4,5 µg/ml. Odlišná písmena označují statisticky významně odlišné skupiny.

Chybové úsečky označují směrodatnou odchylku mezi opakováními. Stejnými písmeny jsou pak v grafu označeny skupiny derivatizačních činidel, která se od sebe na základě Tukeyho post hoc testu neodlišují. U ENTL byla skupina s nejnižším výtěžkem označena písmenem *a*. U HMR byla skupina s nejnižším výtěžkem označena písmenem *z*.

Z naměřených dat vyplývá, že na nižší koncentrační hladině je mezi jednotlivými derivatizačními činidly větší variabilita. Také absolutní rozdíly jsou v této skupině větší. To potvrzuje předpoklad, že při koncentracích blízkých limitu detekce může být volba derivatizačního činidla klíčová. Dále můžeme konstatovat, že přidavek ethanethiolu a jodidu amonného k MSTFA-II nevedl k vyšší účinnosti derivatizace. Naopak přidavek samotného jodidu amonného vedl k významnému snížení účinnosti derivatizace u obou testovaných lignanů při koncentraci 0,05 µg/ml. Přidavek 1% TMCS k BSTFA měl významný vliv na snížení účinnosti derivatizace pro ENTL na nižší koncentrační úrovni. Významný byl také rozdíl mezi šaržemi BSTFA, kdy BSTFA-staré mělo významně lepší derivatizační účinek pro HMR a to na obou koncentračních úrovních. Naopak pro ENTL na vyšší koncentrační úrovni mělo BSTFA-nové statisticky významně nejlepší

derivatizační účinnost ze všech testovaných derivatizačních činidel. MSTFA-III pak pravděpodobně nederivatizovalo vůbec [29] a naměřené hodnoty jsou jen výsledkem možné kontaminace v průběhu přípravy. Obecně lze k derivatizaci lignanů doporučit MSTFA-I a MSTFA-II které měly stabilně dobrou derivatizační účinnost pro oba testované lignany na obou koncentračních úrovních. Na základě výsledků by bylo možné doporučit i BSTFA-staré a však vzhledem ke značnému stáří této šarže, již nepochybně nebude možné jej v budoucnu opakovaně používat.

3.3 Validace GC/MS metody

3.3.1 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce byla stanovena měřením postupně zředovaných roztoků. Koncentrace jednotlivých roztoků a způsob ředění jsou uvedeny v Tab. XII. Za mez detekce byla považována taková koncentrace, kdy výška píku odpovídala přibližně trojnásobku výšky šumu základní linie v okolí píku. Mez stanovitelnosti pak byla stanovena jako přibližně desetinásobek výšky šumu základní linie v okolí píku. Vyhodnocení poměru signálu k šumu bylo provedeno manuálně v softwaru Excalibur (Thermo Fischer Scientific).

Tab. XII: Způsob ředění roztoků pro stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti.

Koncentrace roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Koncentrace pracovního roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Objem pracovního roztoku [μl]	Finální objem [μl]
3	3	200	200
0,3	3	20	200
0,1	0,1	200	200
0,05	0,1	100	200
0,01	0,1	20	200
0,005	0,1	10	200
0,001	0,1	2	200
0,0005	0,1	1	200

Směsný pracovní roztok HMR a ENTL o koncentraci 0,1 $\mu\text{g/ml}$ byl připraven smícháním 50 μl pracovního roztoku o koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ s 1450 μl čistého methanolu.

Tímto způsobem byla stanovena mez detekce TMSi-HMR na 0,005 µg/ml s poměrem signálu k šumu rovným čtyřem a mez stanovitelnosti na 0,01 µg/ml s poměrem signálu k šumu rovným deseti. Pro TMSi-ENTL byla mez detekce stanovena na 0,001 µg/ml s poměrem signálu k šumu rovným třem a mez stanovitelnosti na 0,005 µg/ml s poměrem signálu k šumu rovným dvanácti. Porovnání dosažených hodnot s publikovanými studiemi, není možné, protože hodnota LOD pro TMSi-HMR byla uvedena pouze v jedné práci a to při detekci pomocí IT. Výpočet LOD pak byl ještě proveden odlišným způsobem [16]. Pro TMSi-ENTL je pak možné provést srovnání se dvěma pracemi, kde byly pro GC/MS-SIM dosaženy následující hodnoty LOD: 0,00012 µg/ml [3] a 0,0053 µg/ml [14]. Hodnota LOD dosažená v této práci tak leží přibližně uprostřed mezi těmito dříve publikovanými údaji.

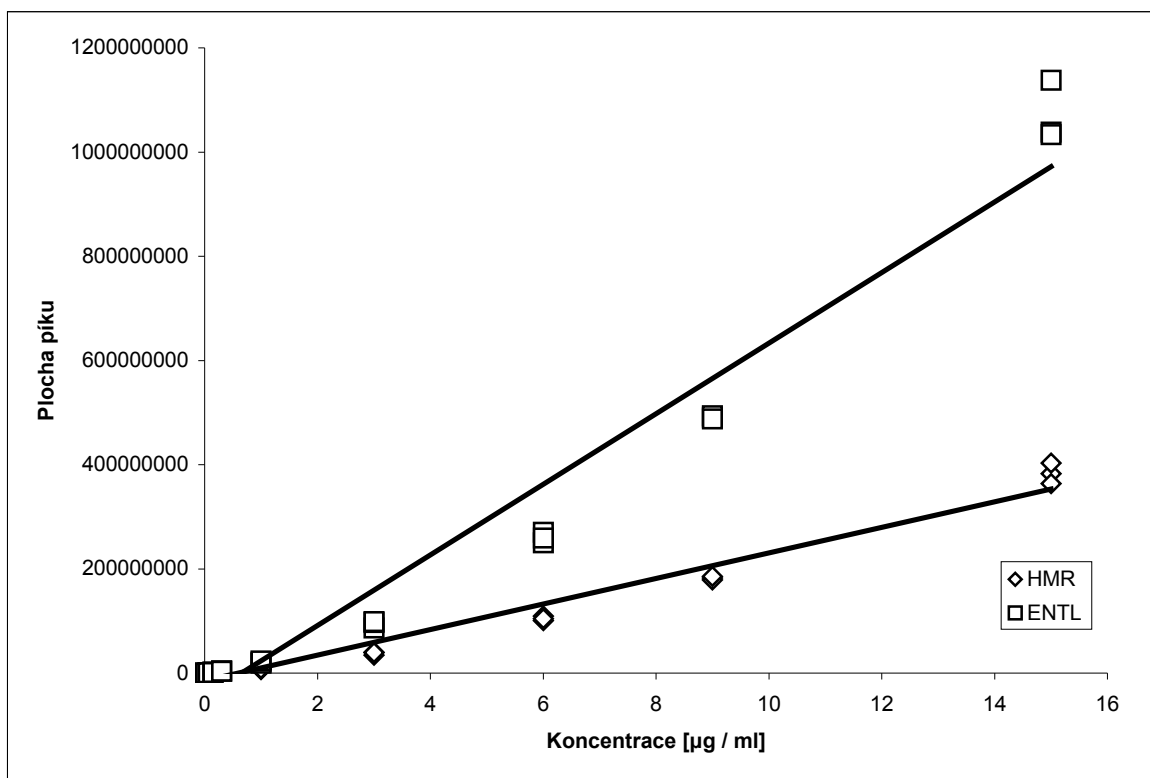
3.3.2 Test kalibrační křivky

Na základě měření meze stanovitelnosti byla testována kalibrační křivka v rozsahu 0,015 µg/ml až 15 µg/ml. Jednotlivé kalibrační body a způsob jejich ředění je uveden Tab. XIII.

Tab. XIII: Způsob ředění jednotlivých bodů kalibrační křivky.

Koncentrace roztoku [µg/ml]	Koncentrace pracovního roztoku [µg/ml]	Objem pracovního roztoku [µl]	Finální objem [µl]
15	30	100	200
9	30	60	200
6	30	40	200
3	30	20	200
1	1	200	200
0,3	1	60	200
0,15	1	30	200
0,06	1	12	200
0,015	1	3	200

Průběh kalibrační křivky z bodů připravených dle Tab. XIII, je zaznamenán na Obr. 10.



Obr. 10: Kalibrační křivky pro TMSi deriváty HMR a ENTL s proloženými přímkami.

Jak je z Obr. 10 patrné, v celém testovaném rozsahu nebylo možné nalézt úsek, který by mohl být proložen přímkou. Protože u GC/MS systému by odezva měla být v jistém koncentračním rozsahu lineární, byla provedena řada testů k odhalení příčiny nelineární odezvy.

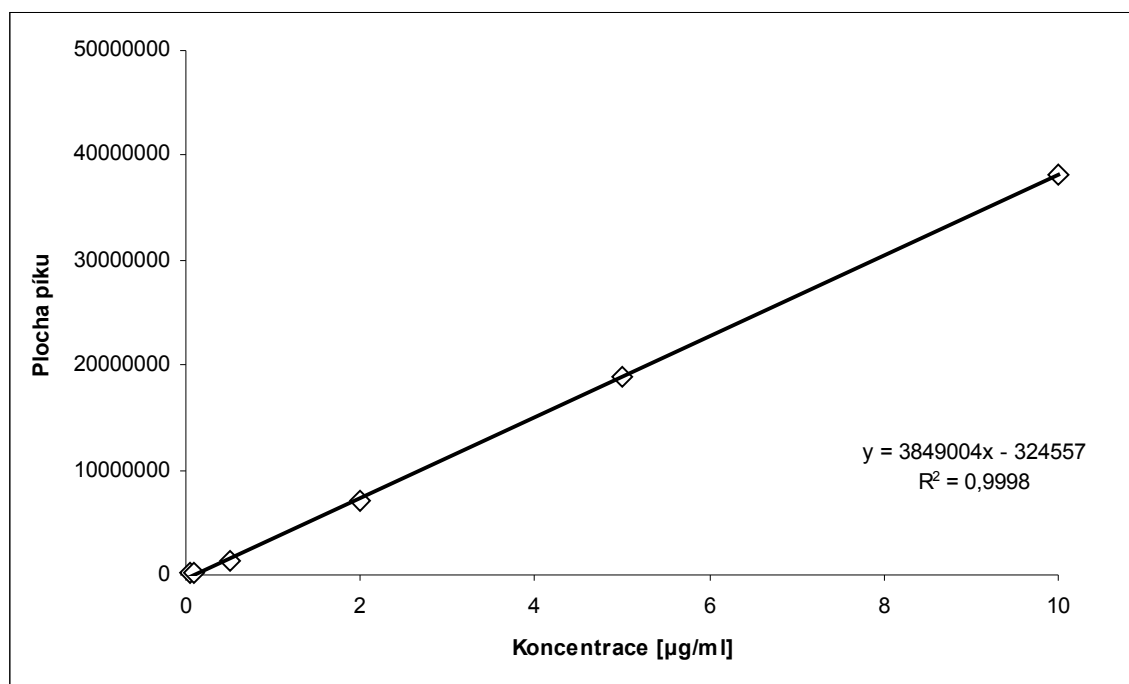
3.3.3 Kalibrační křivka cholesterolu

Nejdříve byl otestován systém jako celek a to kalibrační křivkou cholesterolu, který byl před měřením derivatizován pomocí MSTFA-II stejným postupem jako lignany. Cholesterol byl vybrán právě kvůli tomu, že je nutné ho před měřením na GC také derivatizovat. Každý bod byl připraven a měřen pouze jednou. Způsob ředění jednotlivých kalibračních bodů je uveden v Tab. XIV.

Tab. XIV: Způsob ředění jednotlivých bodů kalibrační křivky cholesterolu.

Koncentrace roztoku [µg/ml]	Koncentrace pracovního roztoku [µg/ml]	Objem pracovního roztoku [µl]	Finální objem [µl]
10	10	200	200
5	10	100	200
2	10	40	200
0,5	10	10	200
0,1	10	2	200
0,05	10	1	200

Průběh kalibrační křivky připravené dle Tab. XIV, je zaznamenán na Obr. 11.



Obr. 11: Kalibrační křivka TMSi derivátu cholesterolu

Kalibrační křivka TMSi-CHOL na Obr. 11 je dle očekávání lineární o čemž svědčí její lineární proložení s koeficientem determinace rovným 0,9998. Z tohoto měření vyplynulo, že nelinearita kalibrační křivky není společnou vlastností pro všechny TMSi deriváty.

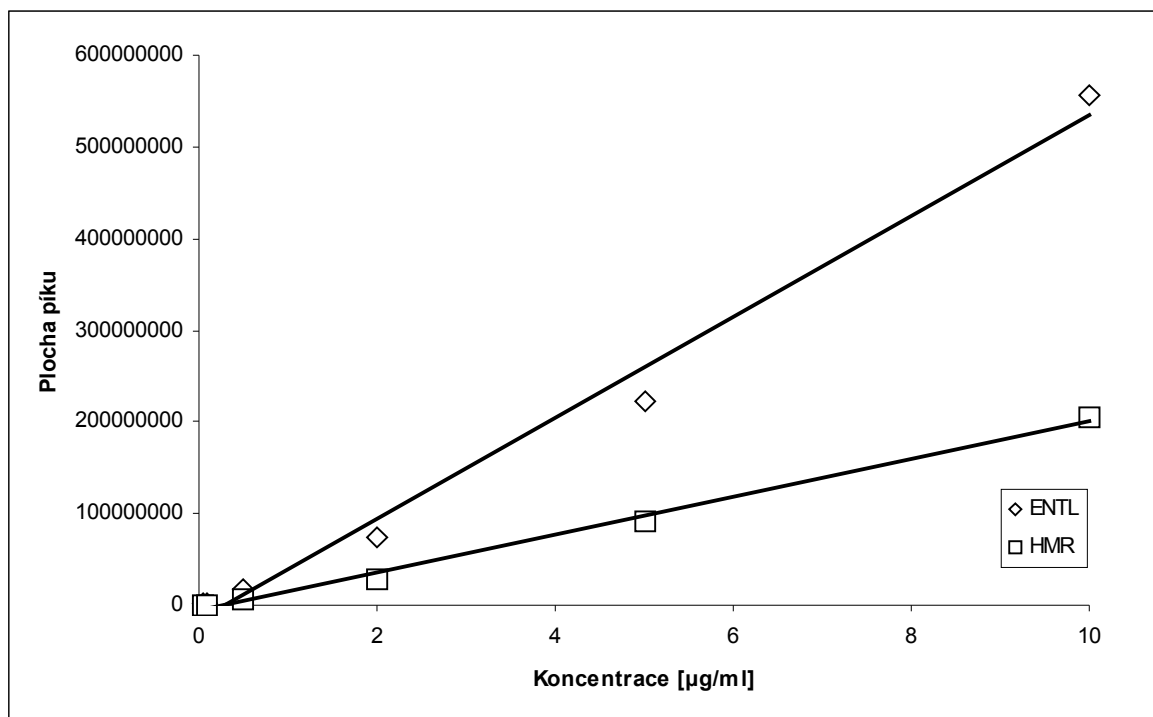
3.3.4 Přídavek derivatizačního činidla

Dále byla testována hypotéza, že by v roztoku po naředění hexanem bez derivatizačního činidla mohlo docházet k samovolnému rozpadu TMSi derivátů, i když v literatuře je uváděno, že např. TMSi-deriváty steroidních látek obsahující -OH skupinu, jsou minimálně během prvních 48 hodin stabilní [33]. Byl proto připraven kalibrační roztok HMR a ENTL, který byly derivatizován dle obvyklého postupu MSTFA-II. Ovšem s tím rozdílem, že po odfoukání derivatizačního činidla dusíkem, nebyly deriváty ředěny na finální objem 200 μl čistým hexanem, ale hexanem s 1 % MSTFA-II. Každý bod kalibrační křivky byl připraven a měřen pouze jednou. Způsob ředění jednotlivých kalibračních bodů je uveden v Tab. XV.

Tab. XV: Způsob ředění jednotlivých bodů kalibračních křivek HMR a ENTL.

Koncentrace roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Koncentrace pracovního roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Objem pracovního roztoku [μl]	Finální objem [μl]
10	10	200	200
5	10	100	200
2	10	40	200
0,5	10	10	200
0,1	10	2	200
0,05	10	1	200

Směsný pracovní roztok HMR a ENTL o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ byl připraven smícháním 500 μl pracovního roztoku o koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$ s 1000 μl čistého methanolu. Průběh kalibračních křivek připravených dle Tab. XV a měřených na GC/MS, je zaznamenán na Obr. 12.



Obr. 12: Kalibrační křivky TMSi-HMR a TMSi-ENTL s přidavkem 1% MSTFA-II v nástřiku

Dle výsledků na Obr. 12 je patrné, že přidavek derivatizačního činidla k roztoku TMSi derivátů lignanů nevedl k linearizaci kalibračních křivek.

3.3.5 Derivatizační krok, silanizace inzertů

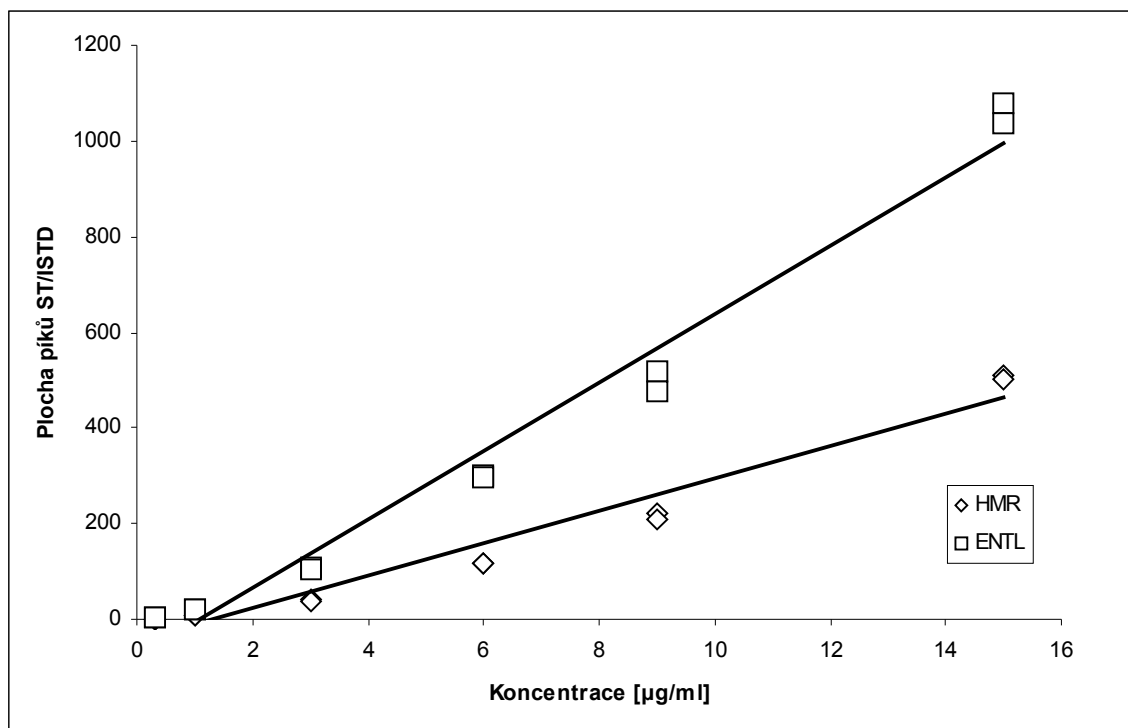
Jako možná příčina nelinearity kalibrační křivky byla vyhodnocena různá koncentrace analytu v derivatizačním kroku a to navzdory tomu, že derivatizační činidlo je záměrně přidáváno v takovém nadbytku oproti analytu, aby při ustavování rovnováhy neměla koncentrace analytu vliv na výtěžnost reakce. Tato hypotéza byla ověřena tím, že do inzertu bylo převedeno 200 µl pracovního roztoku HMR a ENTL o koncentraci 30 µg/ml, tento roztok byl poté standardním postupem derivatizován pomocí MSTFA-II. Po odfoukání derivatizačního činidla bylo do inzertu přidáno 200 µl roztoku Me-C19 v hexanu o koncentraci 0,5 µg/ml. Tento roztok Me-C19, TMSi-HMR a TMSi-ENTL byl dále použit jako pracovní roztok pro přípravu kalibračních křivek.

V tomto experimentu byl také testován vliv silanizace insertů na konvexnost kalibračních křivek. Hypotéza byla taková, že by mohlo docházet k adsorpci TMSi derivátů lignanů na neinaktivovaný povrch skleněných insertů [34]. Inaktivace insertů silanizací byla provedena postupem popsáním v oddíle Materiály a metody. Do takto inaktivovaných insertů byl teprve rozředován směsný kalibrační roztok TMSi-HMR a TMSi-ENTL. Příslušné objemy pracovního roztoku byly následně naředěny na 100 μ l roztokem Me-C19 v hexanu o koncentraci 0,5 μ g/ml. Způsob, jakým byly kalibrační křivky připraveny, shrnuje Tab. XVI. Celkem pak byly kalibrační křivky připraveny čtyřmi různými způsoby: kalibrační křivka rozředěná ze směsného roztoku TMSi-HMR a TMSi-ENTL do silanizovaných insertů, kalibrační křivka rozředěná z roztoku TMSi-HMR a TMSi-ENTL do nesilanizovaných insertů, kalibrační křivka rozředěná ze směsného roztoku HMR a ENTL derivatizovaná v silanizovaných insertech a kalibrační křivka rozředěná z roztoku HMR a ENTL derivatizovaná v nesilanizovaných insertech. Každý způsob přípravy kalibrační křivky byl proveden ve dvou opakováních.

Tab. XVI: Způsob ředění jednotlivých bodů kalibračních křivek.

Koncentrace roztoku [μg/ml]	Koncentrace pracovního roztoku [μg/ml]	Objem pracovního roztoku [μl]	Finální objem [μl]
15	30	50	100
9	30	30	100
6	30	20	100
3	30	10	100
1	30	3,4	100
0,3	30	1	100

Způsob ředění kalibračních bodů uvedený v Tab. XVI byl shodný pro derivatizovaný i nederivatizovaný pracovní roztok. Průběh kalibračních křivek TMSi-HMR a TMSi-ENTL připravených dle Tab. XVI, které byly rozředěny z již derivatizovaného pracovního roztoku do silanizovaných insertů je zaznamenán na Obr. 13.



Obr. 13: Kalibrační křivky TMSi-HMR a TMSi-ENTL rozředěné po derivatizaci do silanizovaných inzertů.

Průběh kalibračních křivek připravených zbylými třemi postupy byl prakticky totožný s průběhem kalibračních křivek na Obr. 13. Jak je z Obr. 13 patrné, ani rozředění již derivatizovaných analytů ani inaktivace povrchu inzertů silanizací nevedlo k linearizaci kalibračních křivek.

Po testech souvisejících s přípravou TMSi derivátů a jejich vlastností byly testovány jednotlivé komponenty GC/MS systému.

3.3.6 Typ lineru

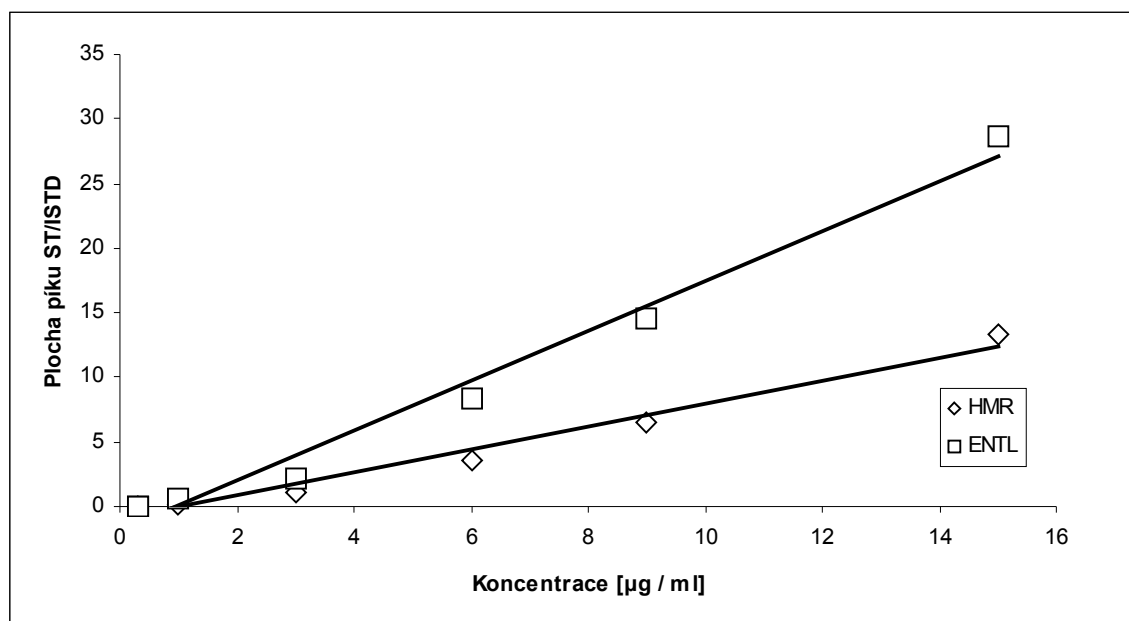
Jako první člen chromatografického systému byl testován vliv typu lineru. Pro tento test byla připravena kalibrační křivka standardním způsobem derivatizace pomocí MSTFA-II popsáným v oddíle Materiály a metody. Ředění jednotlivých kalibračních bodů je shrnuto v Tab. XVII.

Tab .XVII: Způsob ředění jednotlivých bodů kalibračních křivek HMR a ENTL.

Koncentrace roztoku [µg/ml]	Koncentrace pracovního roztoku [µg/ml]	Objem pracovního roztoku [µl]	Finální objem [µl]
15	30	100	200
9	30	60	200
6	30	40	200
3	30	20	200
1	30	6,7	200
0,3	30	2	200

Kalibrační křivka byla dle Tab. XVII připravena pouze v jednom opakování a tato kalibrační křivka byla měřena za použití čtyř různých typů linerů. Testovány byly tyto typy linerů od firmy Restek: Sky 3.0 mm ID Straight; Sky 3.0 mm ID Single Taper; Sky 5.0 mm ID Straight; Sky 5.0 mm ID Single Taper.

Neboť průběhy kalibračních křivek naměřených za použití různých typů linerů, se od sebe neodlišovaly, je pro ukázkou uvedena pouze jedna dvojice kalibračních křivek. Výsledky měření kalibračních křivek s použitím lineru Sky 3.0 mm ID Straight jsou znázorněny na Obr. 14.



Obr. 14: Kalibrační křivky TMSi HMR a TMSi ENTL naměřené s použitím lineru Sky 3.0 mm ID Straight.

Jak je z Obr. 13 patrné, použití lineru Sky 3.0 mm ID Straight nevedlo k linearizaci kalibrační křivky a vzhledem k tomu, že průběh kalibračních křivek testovaných za použití ostatních typů linerů byl shodný s průběhem na Obr. 13, je možné konstatovat, že výměna za žádný z testovaných typů linerů nevedla k linearizaci kalibrační křivky.

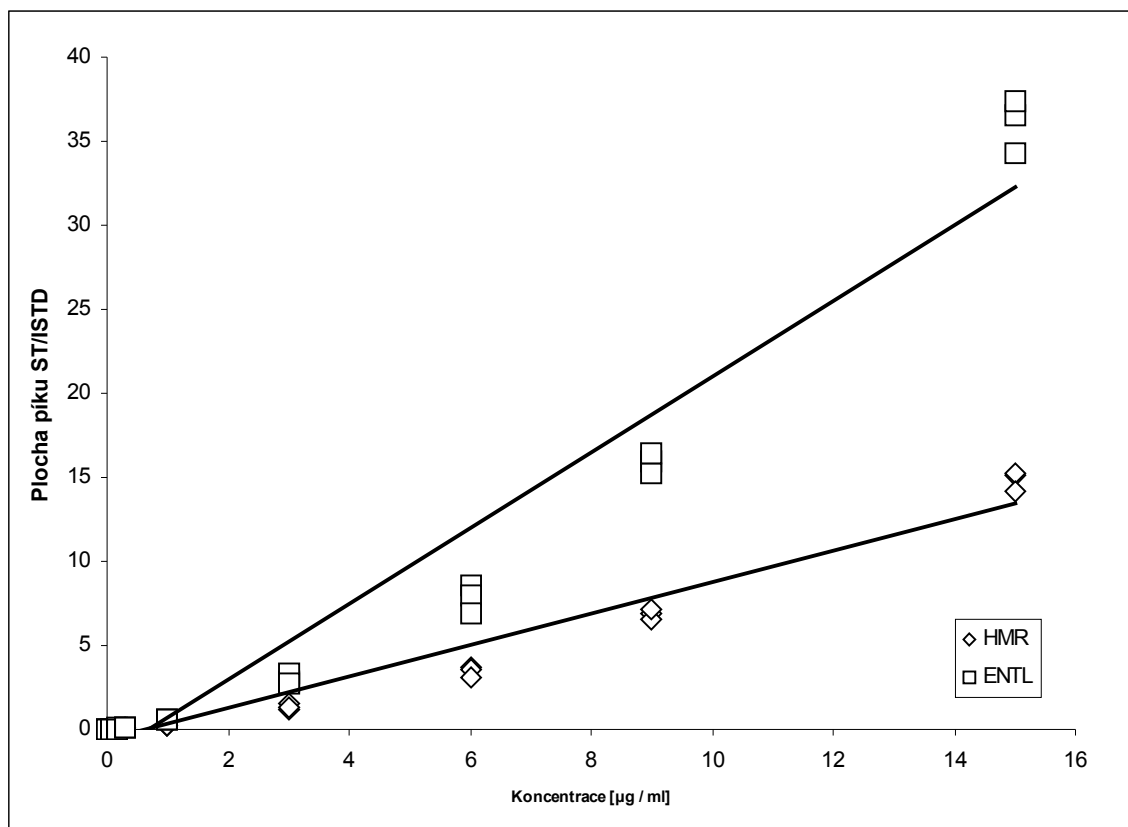
3.3.7 Chromatografická kolona

Jako další součást chromatografického systému byl otestován vliv polaritě stacionární fáze chromatografické kolony. Pro tento test byla standardně používaná kolona se stacionární fází Rxi-5ms nahrazena kolonou, která se lišila pouze v polaritě stacionární fáze. Testována byla kolona se stacionární fází Rxi-1ms. Ředění jednotlivých kalibračních bodů je shrnuto v Tab. XVIII.

Tab. XVIII: Způsob ředění jednotlivých bodů kalibrační křivky.

Koncentrace roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Koncentrace pracovního roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Objem pracovního roztoku [μl]	Finální objem [μl]
15	30	100	200
9	30	60	200
6	30	40	200
3	30	20	200
1	1	200	200
0,3	1	60	200
0,15	1	30	200
0,06	1	12	200
0,015	1	3	200

Kalibrační křivka byla dle Tab. XVIII připravena ve třech opakováních. Průběh kalibračních křivek je zaznamenán na Obr. 14.



Obr. 14: Kalibrační křivky TMSi HMR a TMSi ENTL na chromatografické koloně s polaritou Rxi-1ms.

Jak je z Obr. 14 patrné, změna polarity stacionární fáze chromatografické kolny nevedla k linearizaci kalibračních křivek.

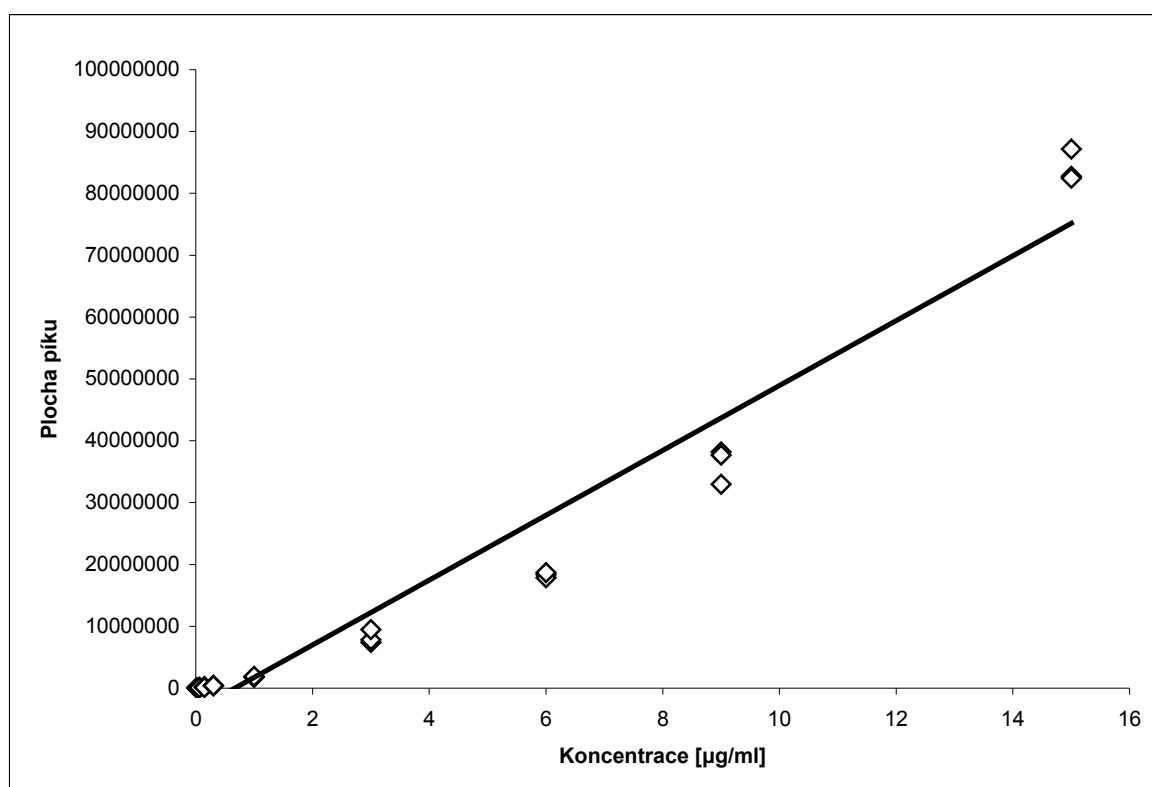
3.3.8 Typ detektoru

Poslední testovanou součástí systému byl vlastní detektor. K porovnání odezvy jednoduchého kvadrupólu byla použit trojitý kvadrupól (TSQ 8000 Evo Triple Quadrupole; Thermo Fisher Scientific) a iontová past (ITQ 1100; Thermo Fisher Scientific). Pro srovnání byl zařazen také test s plamenově ionizačním detektorem - FID. U všech systémů byla použita chromatografická kolona délky 30 m s vnitřním průměrem 0,25 mm, tloušťkou filmu 0,25 µm a polaritě stacionární fáze odpovídající Rxi-5ms od firmy Restek. Všechny kalibrační křivky byly připraveny a měřeny v souladu s popisem uvedeným v kapitole Materiály a metody. Jako derivatizační činidlo bylo použito MSTFA-II. Způsob přípravy kalibrační křivky pro test na trojitém kvadrupólu je uveden v Tab. XIX.

Tab. XIX. Způsob ředění jednotlivých bodů kalibrační křivky.

Koncentrace roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Koncentrace pracovního roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Objem pracovního roztoku [μl]	Finální objem [μl]
15	30	100	200
9	30	60	200
6	30	40	200
3	30	20	200
1	1	200	200
0,3	1	60	200
0,15	1	30	200
0,06	1	12	200
0,015	1	3	200

Kalibrační křivka byla dle Tab. XIX připravena ve třech opakováních. Průběh kalibrační křivky TMSi-HMR je zaznamenán na Obr. 15.



Obr. 15: Kalibrační křivka TMSi-HMR naměřená s využitím trojitého kvadrupólu jako detektoru.

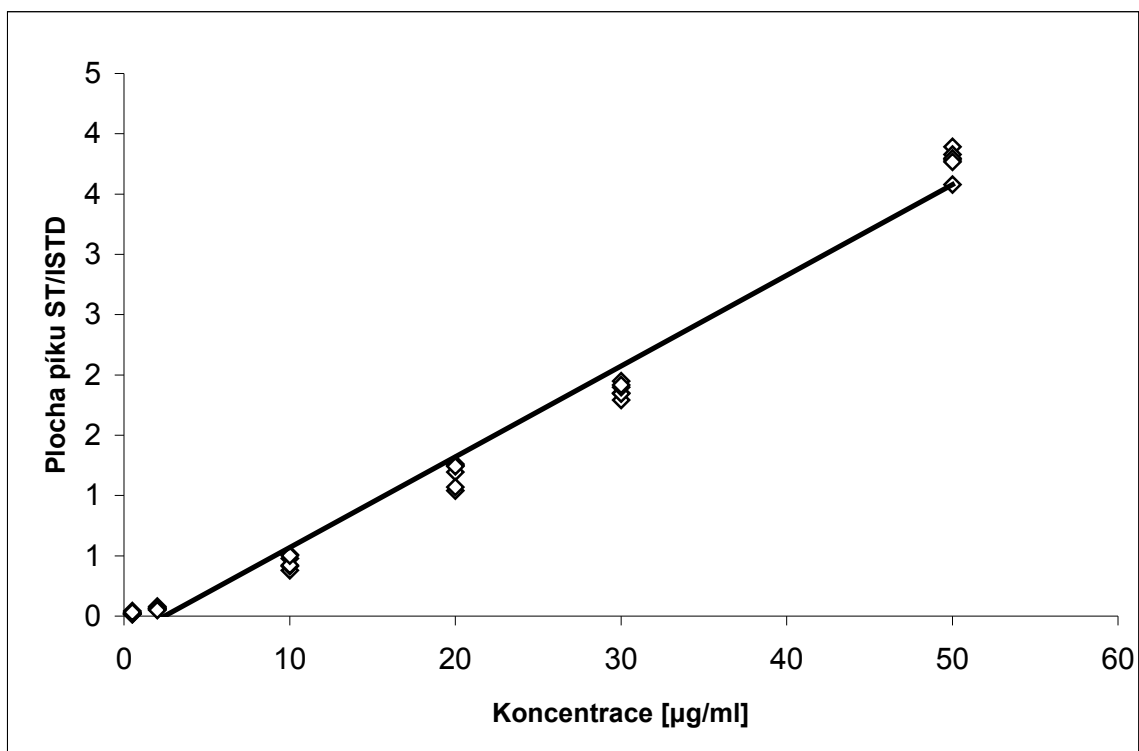
Jak je z Obr. 15 patrné, změna typu MS detektoru nevedla k linearizaci kalibrační křivky TMSi-HMR. Kalibrační křivka TMSi-ENTL nebyla měřena.

Způsob přípravy kalibrační křivky pro test na iontové pasti je uveden v Tab. XX.

Tab. XX. Způsob ředění jednotlivých bodů kalibrační křivky.

Koncentrace roztoku [µg/ml]	Koncentrace pracovního roztoku [µg/ml]	Objem pracovního roztoku [µl]	Finální objem [µl]
50	30	166,7	200
30	30	100	200
20	30	66,7	200
10	30	33,4	200
2	3	66,7	200
0,5	3	16,7	200

Každý bod kalibrační křivky byl připraven ve třech opakováních a z důvodu velké fluktuace odezvy iontové pasti byl také každý bod měřen dvakrát. Hmotnostní spektrum bylo snímáno v rozsahu 50-600 m/z a teprve po naměření byly ze spektra filtrovány ionty s hmotami 590; 500; 297 m/z pro TMSi-HMR a 458, 368 a 336 m/z pro TMSi-CHOL. Průběh kalibrační křivky TMSi-HMR je zaznamenán na Obr. 16.



Obr. 16: Kalibrační křivka TMSi-HMR naměřená s využitím iontové pasti jako detektoru.

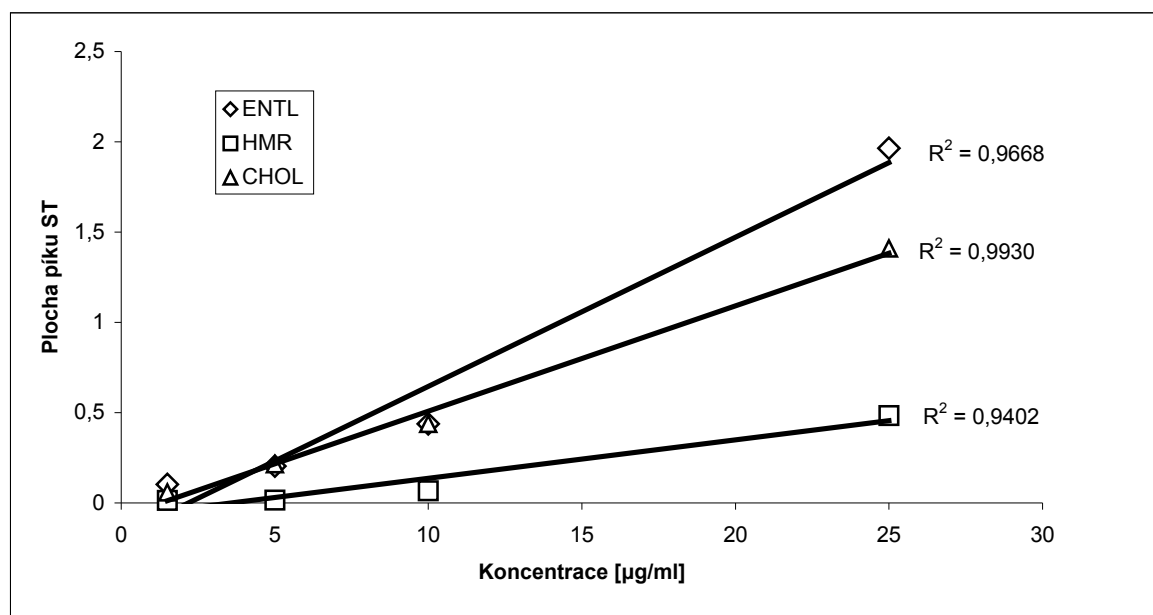
Jak je z Obr. 16 patrné, použití iontové pasti jako detektoru nevedlo k linearizaci kalibrační křivky TMSi-HMR. Kalibrační křivka TMSi-ENTL nebyla měřena.

Jako alternativa k hmotnostním spektrometrům byl zvolen FID. Pro měření kalibrační křivky na FID byl vzhledem k nižší citlivosti upraven i rozsah kalibrační křivky. Způsob přípravy kalibračních křivek pro test na FID je uveden v Tab. XXI.

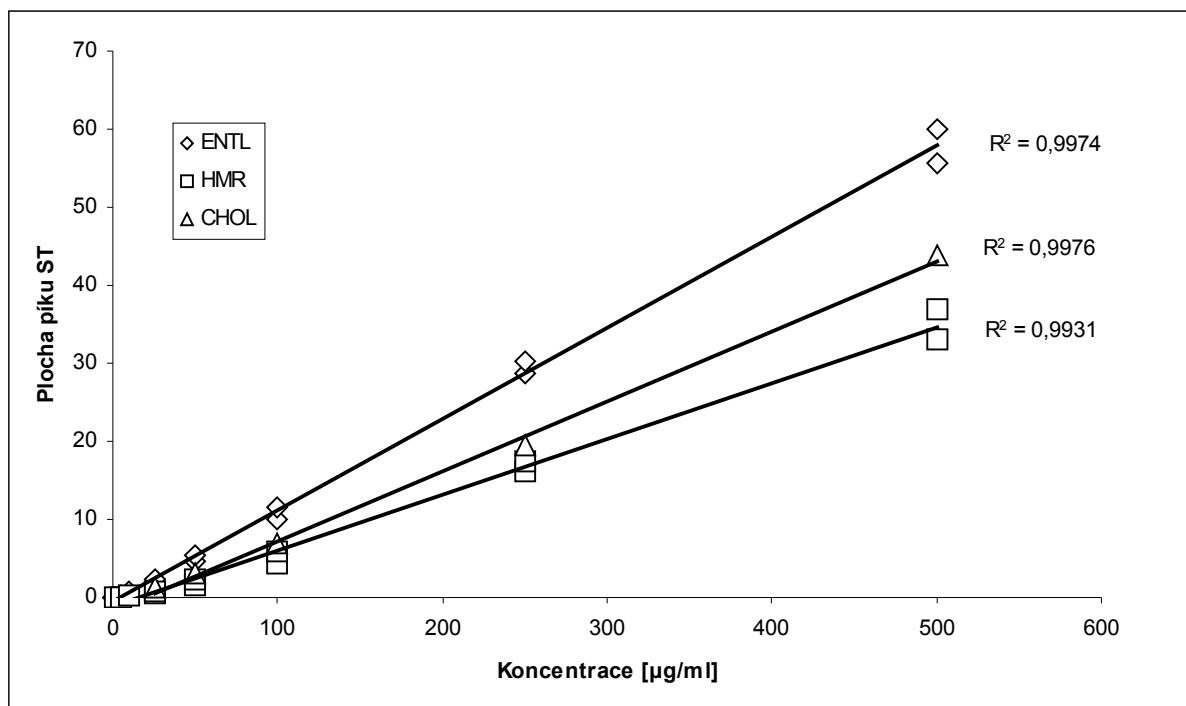
Tab. XXI. Způsob ředění jednotlivých bodů kalibračních křivek.

Koncentrace roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Koncentrace pracovního roztoku [$\mu\text{g/ml}$]	Objem pracovního roztoku [μl]	Finální objem [μl]
500	500	100	100
250	500	50	100
100	500	20	100
50	500	10	100
25	500	5	100
10	10	100	100
5	10	50	100
1,5	10	15	100
0,5	10	5	100

Každý z bodů kalibrační křivky byl dle Tab. XXI připraven dvakrát. Stejným způsobem byla v jednom opakování naředěna i kalibrační křivka cholesterolu. Pro velký rozsah kalibračních křivek a lepší názornost byly kalibrační křivky rozděleny do dvou grafů. Průběh kalibračních křivek TMSi-HMR, TMSi-ENTL a TMSi-CHOL je zaznamenán na Obr. 17 a 18.



Obr. 17: Kalibrační křivky TMSi-HMR, TMSi-ENTL a TMSi-CHOL v rozsahu 1,5 - 25 $\mu\text{g/ml}$ naměřené s využitím plamenově ionizačního detektoru.



Obr. 18: Kalibrační křivky TMSi-HMR, TMSi-ENTL a TMSi-CHOL v rozsahu 25 - 500 µg/ml naměřené s využitím plamenově ionizačního detektoru.

Jak je z Obr. 17 patrné, v rozsahu 1,5 - 25 µg/ml (kalibrační bod o koncentraci 0,5 µg/ml nebyl do kalibračních křivek zařazen, protože pro TMSi-HMR neposkytoval integrovatelný pík) jsou kalibrační křivky TMSi-HMR a TMSi-ENTL nelineární (o čemž svědčí nízké hodnoty koeficientu determinace (0,9402 a 0,9668) při proložení kalibračních křivek přímkou). Naproti tomu TMSi-CHOL má v daném rozsahu koeficient determinace rovný 0,9930. Kalibrační křivky v rozsahu 25 - 500 µg/ml uvedené na Obr. 18 naopak již lineární jsou, o čemž svědčí poměrně vysoké koeficienty determinace.

Z naměřených dat vyplývá, že v koncentračním rozsahu, který je vhodný pro GC/MS systém, jsou kalibrační křivky TMSi-HMR a TMSi-CHOL nelineární při použití MS i FID detektoru. Naproti tomu kalibrační křivka TMSi-CHOL je ve stejném rozsahu lineární. Nelinearita kalibračních křivek TMSi-HMR a TMSi-ENTL je tak v přímém rozporu s publikovanými daty, kdy v žádné ze studií nebyla zmíněna aproximace kalibrační křivky TMSi derivátů lignanů pomocí jiné funkce než přímkou [3, 7, 14, 15, 16, 21, 22, 23, 24]. V koncentračním rozsahu 25 - 500 µg/ml pak byly kalibrační křivky všech tří testovaných analytů lineární. Toto zjištění vede k domněnce, že buď v procesu přípravy

vzorků anebo v plynovém chromatografu dochází u TMSi-derivátů HMR a ENTL ke ztrátám, které by mohly být způsobeny například adsorpčními jevy. Takové ztráty by pak mohly být procentuálně vyšší u nízkých koncentrací. U vyšších koncentrací se pak tento efekt postupně stává málo výrazným, což vede k linearizaci kalibračních křivek. Zároveň žádná z testovaných změn nebyla schopná tento efekt potlačit.

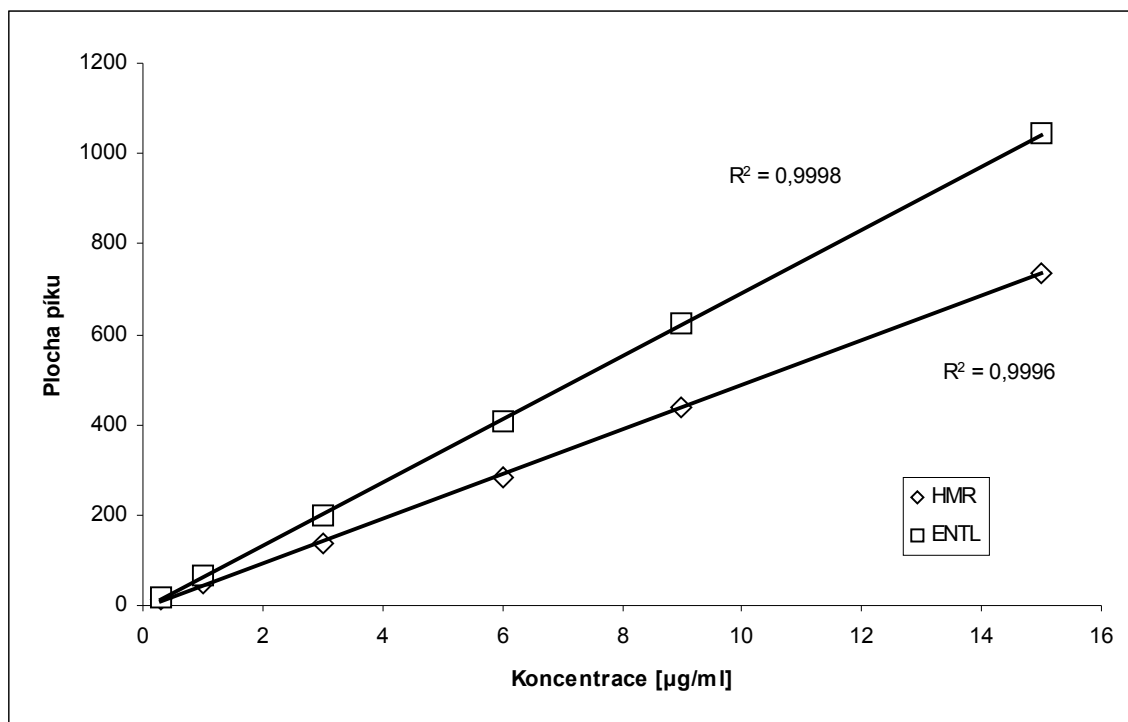
3.3.10 HPLC/DAD

Pro ověření zásobních a pracovních roztoků lignanů, pro ověření správnosti ředění kalibrační křivky a pro ověření chování nederivatizovaných lignanů byla kalibrační křivka HMR a ENTL naměřena doktorkou Vrchotovou na HPLC/DAD systému. Kvůli rozsahu, ve kterém byl daný HPLC/DAD systém schopen měřit, došlo k uzpůsobení kalibrační křivky. Každý bod byl připraven a měřen pouze jednou. Způsob ředění jednotlivých kalibračních bodů je uveden v Tab. XXII.

Tab. XXII: Způsob ředění jednotlivých bodů kalibračních křivek TMSi-HMR a TMSi-ENTL.

Koncentrace roztoku [µg/ml]	Koncentrace pracovního roztoku [µg/ml]	Objem pracovního roztoku [µl]	Finální objem [µl]
15	30	50	100
9	30	30	100
6	30	20	100
3	30	10	100
1	30	3,4	100
0,3	30	1	100

Výsledky naměřené doktorkou Vrchotovou na systému HPLC/DAD jsou zaznamenány na Obr. 19.



Obr. 19: Kalibrační křivka HMR a ENTL naměřená na HPLC/DAD systému.

Jak je z Obr. 19 patrné, je kalibrační křivka nederivatizovaných lignanů měřených na HPLC/DAD lineární, o čemž vypovídá koeficient determinace rovný 0,9998 pro ENTL a 0,9996 pro HMR. Toto měření tak potvrdilo, že pracovní roztoky i příprava roztoků kalibračních nejsou zodpovědné za konvexnost kalibračních křivek derivátů lignanů měřených na GC/MS.

3.4 Konvexní kalibrační křivka - validace

Vzhledem k tomu, že žádným z testů se nepodařilo odhalit příčinu konvexnosti kalibrační křivky TMSi derivátů HMR a ENTL, bylo rozhodnuto o proložení kalibrační křivky nelineární funkcí. V případech, kdy není možné dosáhnout v požadovaném rozsahu lineární odezvy, umožňuje takové proložení i US Food and Drug Administration (FDA): *Some analytical procedures, such as immunoassays, do not demonstrate linearity after any transformation. In this case, the analytical response should be described by an appropriate function of the concentration (amount) of an analyte in a sample* [35]. Tento přístup může být v praxi uplatněn i pro metody obvykle poskytující lineární odezvu [36]. Metoda byla validována v souladu s doporučeními FDA [35]. Všechny kalibrační

křivky byly připraveny a měřeny v souladu s popisem uvedeným v kapitole Materiály a metody. Jako derivatizační činidlo bylo použito MSTFA-II. Jako interní standard byl použit cholesterol o finální koncentraci 1 µg/ml.

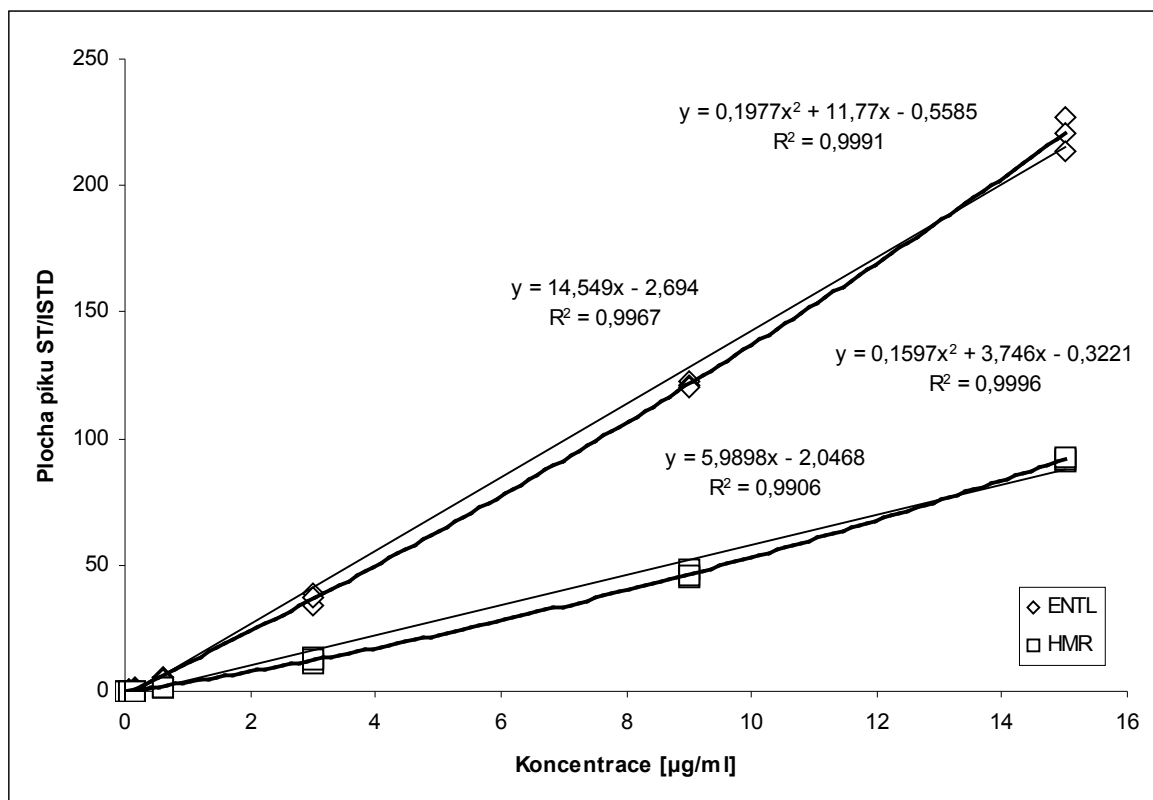
3.4.1 Linearita

V kontextu validace kalibrační křivky je míněna pojmem linearita míra těsnosti vztahu mezi naměřenými hodnotami a kalibrační křivkou. Z toho důvodu je zcela legitimní stanovení linearity i pro nelineární kalibrační křivku. Způsob přípravy kalibrační křivky pro test na trojitém kvadrupólu je uveden v Tab. XXIII.

Tab. XXIII. Způsob ředění jednotlivých bodů kalibrační křivky.

Koncentrace roztoku [µg/ml]	Koncentrace pracovního roztoku [µg/ml]	Objem pracovního roztoku [µl]	Finální objem [µl]
15	30	100	200
9	30	60	200
3	30	20	200
0,6	1	120	200
0,15	1	30	200
0,06	1	12	200
0,015	1	3	200

Kalibrační křivky byly dle Tab. P připraveny ve třech nezávislých opakováních. Průběh kalibrační křivky TMSi-HMR a TMSi-ENTL je zaznamenán na Obr. 20.



Obr. 20: Kalibrační křivky TMSi-HMR a TMSi-ENTL aproximované pomocí polynomu prvního a druhého řádu s vyobrazenými regresními rovnicemi.

Vhodnost použití aproximace kalibrační křivky polynomem druhého stupně byla otestována pomocí F-testu, který porovnával sumu čtverců odchylek jednotlivých modelů se zohledněním menšího počtu stupňů volnosti pro složitější model [36].

$$F = \frac{\frac{SS1 - SS2}{DF1 - DF2}}{\frac{SS2}{DF2}}$$

SS1- suma čtverců odchylek jednoduššího modelu
SS2- suma čtverců odchylek složitějšího modelu
DF1- počet stupňů volnosti jednoduššího modelu
DF2- počet stupňů volnosti složitějšího modelu

Takto vypočtená hodnota testového kritéria byla rovna 59,84 pro HMR a 46,58 pro ENT, to odpovídá $p < 0,0001$ při $df = 19; 18$ pro oba analyty. Tento výsledek umožňuje zamítnutí hypotézy, že mezi použitými aproximacemi není statisticky významný rozdíl. Z hodnot koeficientů determinace pak vychází, že polynomický model je vhodnější.

Linearita kalibračních křivek byla ověřena pomocí koeficientů determinace a QC koeficientu. Kritéria přijatelnosti byla nastavena na $R^2 \geq 0,9990$ a $QC \leq 5\%$ [37]. Dosažené hodnoty těchto kritérií jsou uvedeny v Tab. XXIV.

Tab. XXIV: Dosažené hodnoty koeficientu determinace a QC koeficientu.

	HMR	ENTL
R^2	0,9996	0,9991
QC [%]	3,10	4,42

Srovnáním dat z Tab. XXIV a mezních hodnot pro jednotlivá kritéria vychází, že kalibrační křivky TMSi-HMR a TMSi-ENTL splňují podmínky linearity v celém testovaném rozsahu.

3.4.2 Správnost a přesnost

Správnost a přesnost metody byla otestována pomocí vzorků připravených stejným způsobem, jako je uvedeno v Tab. XXIII. Vzorky byly opět připraveny ve třech opakováních pro každou koncentrační úroveň. Z naměřených hodnot poté byly dle regresních rovnic uvedených na Obr. 20 vypočteny hodnoty koncentrací. Správnost byla poté otestována jako výtěžnost metody na jednotlivých koncentračních úrovních. Přesnost byla otestována jako relativní směrodatná odchylka pro každou koncentrační úroveň [38]. Výsledné hodnoty byly porovnány s nastavenými kritérii přijatelnosti, viz Tab. XXV.

Tab. XXV: Dosažené hodnoty správnosti a přesnosti spolu s hodnotou daného kritéria.

Koncentrační úroveň	Správnost [%]			Přesnost [%]		
	HMR	ENTL	Kritérium	HMR	ENTL	Kritérium
15	101,8	100,1	80-110	2,2	1,2	7,3
9	101,5	102,3	80-110	3,7	3,6	11,0
3	99,3	101,6	80-110	5,4	5,0	11,0
0,6	84,3	95,8	80-110	3,9	2,1	15,0
0,15	107,2	107,0	80-110	3,9	4,8	15,0
0,06	195,1	156,6	60-115	6,0	1,7	21,0
0,015	606,2	390,5	60-115	1,1	2,3	21,0

Z hodnot uvedených v Tab. XXV vyplývá, že metoda splňuje kritérium přesnosti na všech koncentračních úrovních. Kritérium správnosti však metoda nesplňuje na koncentračních úrovních 0,06 a 0,015 $\mu\text{g/ml}$.

3.4.3 Rozsah

Rozsah kalibrační křivky byl stanoven jako oblast, ve které kalibrační křivky splňují všechna výše testovaná kritéria. Kalibrační křivky splňovaly všechna testovaná kritéria v plném rozsahu 0,015 – 15 $\mu\text{g/ml}$, s výjimkou určení správnosti pro kalibrační body 0,06 a 0,015 $\mu\text{g/ml}$. Při zohlednění této skutečnosti tak byl rozsah kalibračních křivek pro TMSi-HMR i TMSi-ENTL stanoven na 0,15 – 15 $\mu\text{g/ml}$. Bohužel žádná z dřívějších prací neuváděla rozsah kalibrační křivky hodnocený obdobným způsobem tak, aby bylo možné vzájemné srovnání.

3.5 Stabilita TMSi-HMR

3.5.1 Dlouhodobá stabilita TMSi-HMR

Jedním z problému, který je pro praktickou aplikaci metody nutné vyřešit, je otázka stability TMSi-HMR. U všech předchozích měření byly TMSi deriváty lignanů měřeny ihned po přípravě. Pro použití metody derivatizace lignanů pro unikátní vzorky (např.: vodné extrakty) je vhodné ověřit stabilitu TMSi deriváty lignanů, kvůli možnosti uchování takových vzorků a případné možnosti jejich opětovného měření. V literatuře je,

že stabilita TMSi-ENTL byla ověřena po dobu 120 hodin a však bez údaje o teplotě skladování a koncentrační hladině [14]. Jako modelový lignan byl vybrán HMR. Jak už bylo uvedeno v oddíle Materiály a metody, byl tento pokus z provozních důvodů měřen na ITQ.

Vzorky byly derivatizovány pomocí BSTFA s 1 % TMCS (vzhledem k vyšším koncentracím nebylo nutné využívat aktivované MSTFA) postupem, který je uvedený v oddíle Materiály a metody. Kalibrační křivka byla připravena v rozsahu 10 – 50 µg/ml. Způsob naředění jednotlivých kalibračních bodů je uveden v Tab. XXVI. Každý kalibrační bod byl připraven ve třech opakováních.

Tab. XXVI. Způsob ředění jednotlivých bodů kalibrační křivky.

Koncentrace roztoku [µg/ml]	Koncentrace pracovního roztoku [µg/ml]	Objem pracovního roztoku [µl]	Finální objem [µl]
50	30	250	150
40	30	200	150
30	30	150	150
20	30	100	150
10	30	50	150

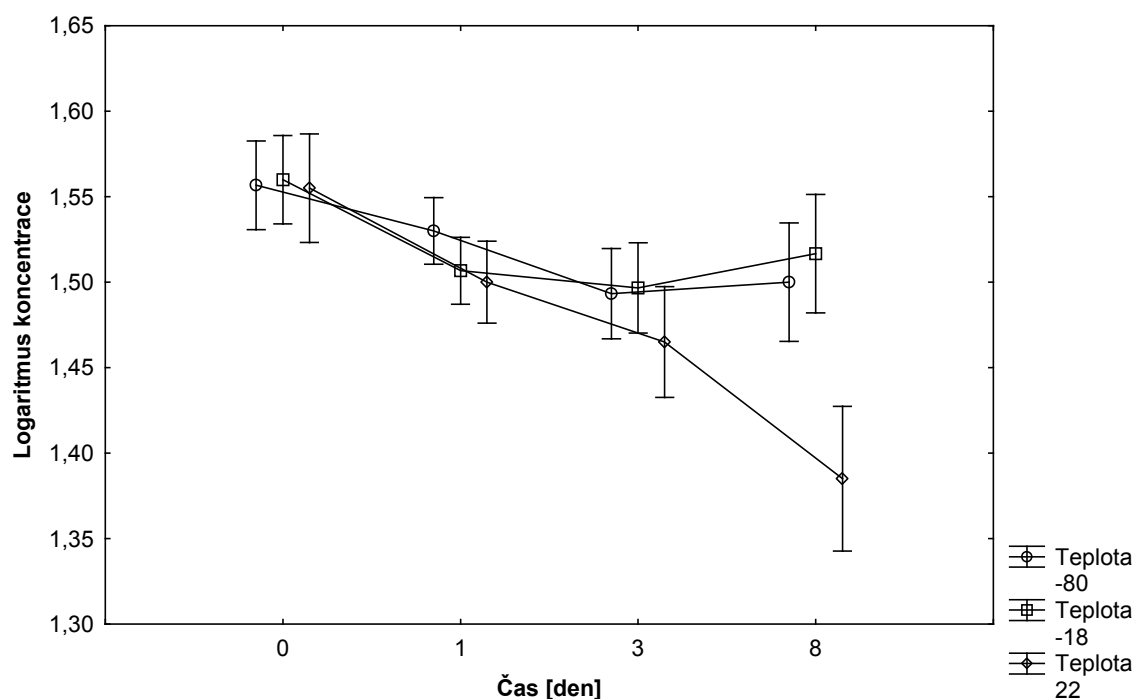
Stejným způsobem jako je uvedeno v Tab. XXVI, byly připravovány i všechny další kalibrační křivky, které byly použity při ověřování stability TMSi-HMR. Hmotnostní spektrum bylo snímáno v rozsahu 50-600 m/z a teprve po naměření byly ze spektra filtrovány ionty s hmotami 590; 500; 297 m/z pro TMSi-HMR a 458, 368 a 336 m/z pro TMSi-CHOL.

Tímto způsobem naměřená a vyhodnocená správnost měření vyjádřená jako výtěžnost dosahovala 103 %. Tímto způsobem naměřená a vyhodnocená přesnost měření vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka měření dosahovala 4 %. Obě tyto hodnoty splňovaly doporučená kritéria, viz Tab. XXV [38].

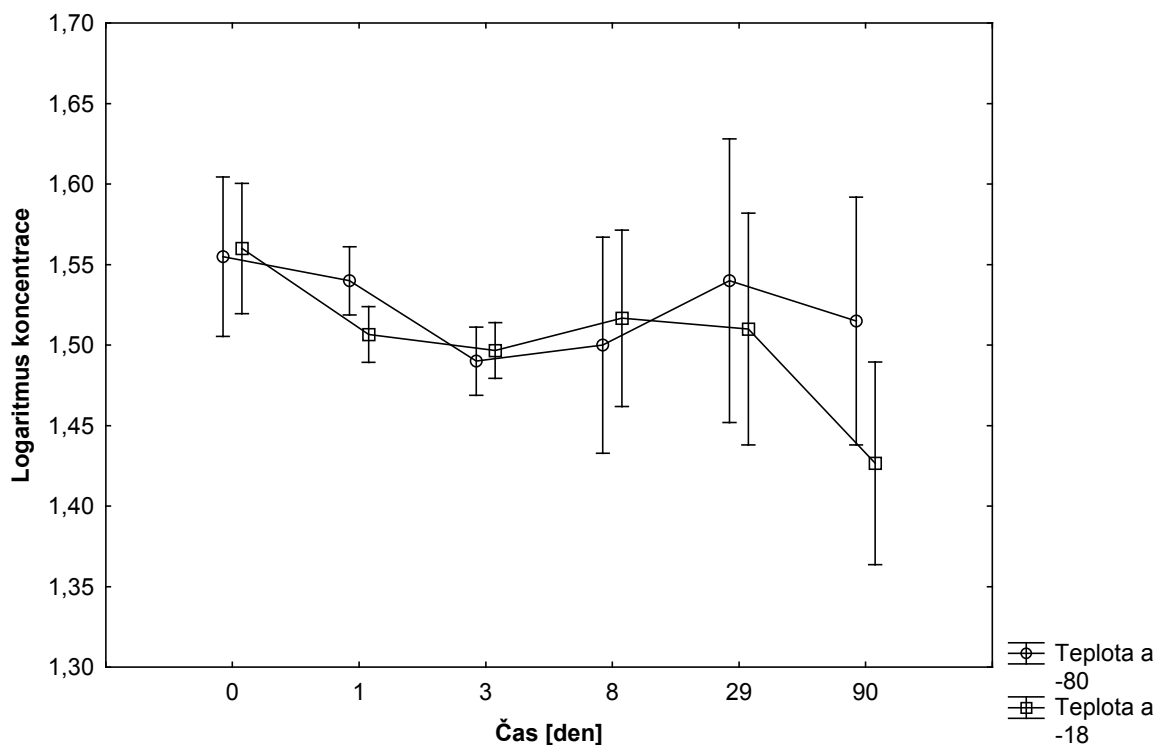
Teploty, při kterých byla stabilita TMSi-HMR ověřována, byly vybrány tak, aby odrážely skutečné laboratorní podmínky a to 22, -18 a -80 °C. Teplota 22 °C

reprezentovala vzorky uchovávané při běžné laboratorní teplotě např.: vzorky na autosampleru. Teplota -18 °C reprezentovala teplotu v běžné mrazničce. Teplota -80 °C poté reprezentovala speciální mrazničku určenou pro dlouhodobé skladování vzorků. Měření vzorků bylo naplánováno na den 0 (ihned po derivatizaci), 1, 3, 8, 29 a 90.

Pokus byl veden tak, že pro každou teplotní úroveň a každý den byly připraveny 3 vzorky. Vzorky skladované při teplotě 22 °C pro den 29 a 80 nebyly připraveny. Skladování vzorků při laboratorní teplotě po tak dlouho dobu by odporovalo běžné laboratorní praxi. Celkem tak bylo připraveno 39 vzorků během dne 0. Příprava probíhala naprosto shodně jako při přípravě vzorků pro měření správnosti a přesnosti na iontové pasti. Všechny vzorky byly skladovány bez přístupu slunečního záření. Výsledky jsou shrnuty v Obr. 21 a 22.



Obr. 21: Průměrné hodnoty logaritmu koncentrace TMSi-HMR v prvních 8 dnech v závislosti na teplotě skladování a době skladování. Chybové úsečky vyznačují 95 % konfidenční interval.



Obr. 22: Průměrné hodnoty logaritmu koncentrace TMSi-HMR v 90 dnech v závislosti na teplotě skladování a době skladování. Chybové úsečky vyznačují 95 % konfidenční interval.

Výsledky byly dále statisticky zpracovány v programu Statistica 13. K vyhodnocení výsledků byla použita metoda ANOVy pro opakovaná měření. Zvlášť byl otestován vliv teploty uskladnění v prvních 8 dnech a druhým testem byl testován vliv teplot -18 a -80 °C od nultého až do devadesátého dne.

Test homogeneity variance (Bartlet, Corchan C a Hartley) vyšel pro logaritmované hodnoty koncentrací u obou testů neprůkazně na hladině významnosti 5%.

Jednostrannou analýzou variance pro opakovaná měření byl otestován předpoklad, že teplota uskladnění ani doba uskladnění nemají vliv na koncentraci TMSi-HMR v roztoku. Zároveň byl také testován předpoklad, že mezi teplotou uskladnění a dobou uskladnění neexistuje synergický efekt.

Pro prvních 8 dnů na třech teplotních úrovních bylo možné zamítnout hypotézy o tom, že teplota uskladnění nemá vliv ($p= 0,0015$; $df= 2;5$), že doba uskladnění nemá vliv

($p < 0,0001$; $df = 3;15$) a že neexistuje synergický efekt mezi efektem teploty a času ($p = 0,0007$; $df = 6;15$).

V 90 dnech na dvou teplotních úrovních -18 a -80 °C nebylo možné zamítnout hypotézu o tom, že teplota uskladnění nemá vliv ($p = 0,0584$; $df = 1;3$). Naopak bylo možné zamítnout hypotézu o tom, že doba uskladnění nemá vliv ($p < 0,0017$; $df = 5;15$) a že neexistuje synergický efekt mezi efektem teploty a času ($p = 0,0375$; $df = 5;15$).

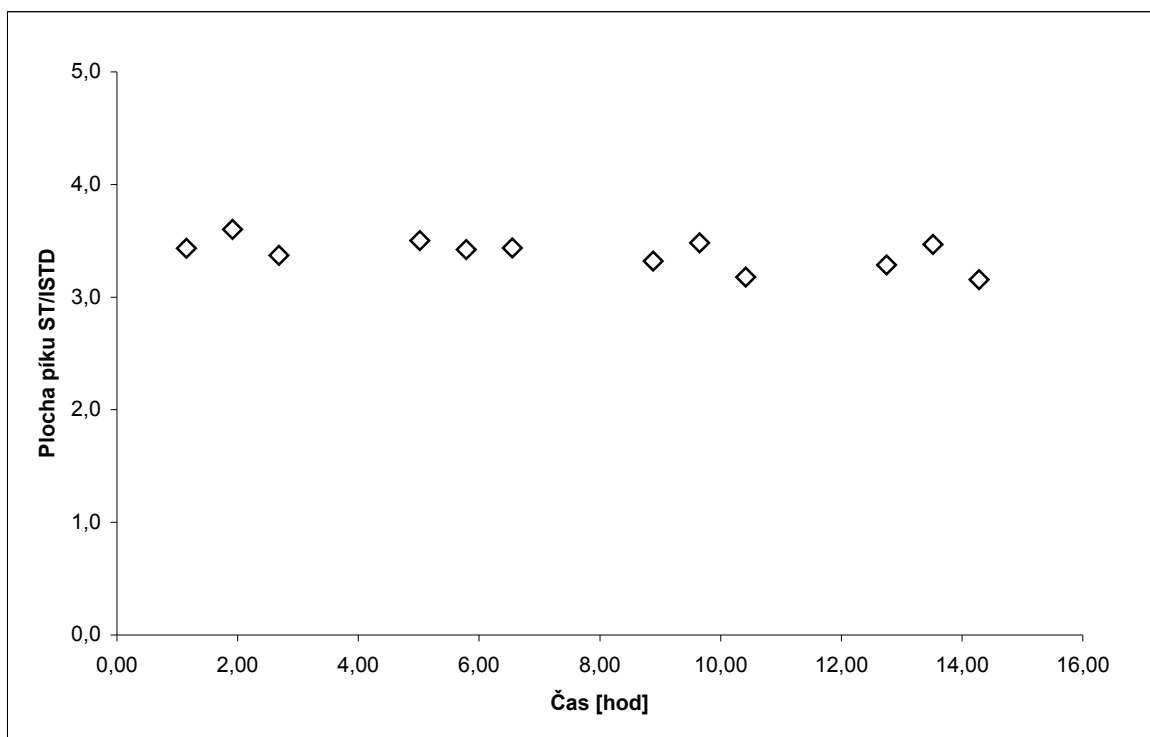
V prvních 8 dnech byl statistiky významně odlišný 0. a 3. dne na všech teplotních úrovních, což však bylo v kontextu dalších naměřených hodnot připsáno chybě v měření. Vzorky skladované při 22 °C po dobu 8 dní pak byly statisticky významně odlišné od všech dalších naměřených hodnot. Proto není možné doporučit uchovávání roztoků TMSi-derivátů lignanů při 22 °C po dobu delší 3 dní.

Porovnání výsledků naměřených skladováním po dobu 90 dnů při teplotách -18 a -80 °C ukázalo, že statisticky významně se odlišovaly pouze vzorky skladované 90 dnů při -18 °C. Z uvedeného vyplývá, že pro skladování delší než 1 měsíc, je vhodné vzorky skladovat při teplotě -80 °C.

3.5.2 Krátkodobá stabilita TMSi-HMR

Z důvodu poměrně velké variability při měření triplikátů na iontové pastičce, které mohlo mít za následek potlačení rozdílů při statistickém vyhodnocení měření dlouhodobé stability TMSi-HMR, bylo provedeno detailní měření krátkodobé stability TMSi-HMR s využitím ISQ.

Test byl opět koncipován tak, aby prezentoval obvyklý způsob práce se vzorky, což odpovídalo 15 hodinám opakovaného měření, během kterého vzorky zůstávaly na autosampleru. Dle popisu uvedeného v oddíle Materiály a metody byly derivatizovány 3 roztoky HMR o koncentraci 1 µg/ml (pracovní roztok) Po derivatizaci byly vzorky naředěny na finální objem roztokem Me-C19 v hexanu o koncentraci 1 µg/ml. Mezi jednotlivými měřeními triplikátů byla zařazena pauza trvající 140 minut. Naměřené výsledky jsou shrnuty na Obr. 23.



Obr. 23: Závislost koncentrace TMSi-HMR na čase při opakovaném měření.

Data zaznamenaná na Obr. 23 byla dále statisticky vyhodnocena. Test homogeneity variance (Bartlett, Cochran C a Hartley) vyšel pro hodnoty koncentrací neprůkazně na hladině významnosti 5%. Jednostrannou, jednocestnou analýzou variance byl otestován předpoklad, že čas nemá vliv na koncentraci TMSi-HMR. Tuto hypotézu nebylo možné zamítnout ($p=0,1657$; $df= 3;8$). Z uvedených dat vyplývá, že stabilita TMSi-derivátů lignanů by neměla představovat problém při stanovení lignanů pomocí GC/MS.

4 ZÁVĚR

V teoretické části byly shrnuty poznatky týkající se chemické charakteristiky lignanů, výskytu lignanů v rostlinné říši a jejich vlivu za metabolismus savců. Následně pak byly uvedeny dostupné informace týkající se výskytu lignanů v povrchových vodách. Ve druhé podkapitole pak byly shrnuty obecné poznatky týkající se plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí, kdy byl zdůrazněn význam derivatizace polárních funkčních skupin pomocí silylačních činidel. Teoretická část byla uzavřena shrnutím poznatků týkajících se stanovením lignanů pomocí GC-MS instrumentace.

V praktické části pak byly nejprve určeny retenční časy vybraných lignanů a vybrány vhodné molekulové fragmenty pro SIM měření. Během prvních pokusů s měřením kalibračních křivek pro TMSi-HMR a TMSi-ENTL v rozsahu 0,015 – 15 µg/ml bylo zjištěno, že kalibrační křivku není možné s dostatečnou přesností aproximovat pomocí přímky. K odhalení příčiny byla provedena řada testů. Nejprve byl proveden test celého systému derivatizací a měřením kalibrační křivky cholesterolu. Tato kalibrační křivka byla aproximovatelná přímkou. Následně pak byla provedena řada testů majících za cíl odhalit příčinu nelineárního chování kalibračních křivek TMSi derivátů lignanů. Během přípravy vzorků HMR a ENTL byly otestovány tyto vlivy: přidavek 1 % derivatizačního činidla do nástřiku, silanizace inzertů a naředění kalibrační křivky z derivatizovaného pracovního roztoku lignanů. Žádný z těchto testů nevedl k linearizaci kalibračních křivek. Následně byly otestovány jednotlivé komponenty GC-MS systému a to pomocí čtyř různých typů linerů a 2 chromatografických kolon lišících se polaritou stacionární fáze a třemi různými hmotnostními detektory – IT, ISQ a TSQ. Opět žádný z testů nevedl k linearizaci kalibračních křivek. Pro srovnání byl zařazen i test kalibračních křivek v rozsahu 1,5 – 500 µg/ml měřený na GC-FID systému. Tento test odhalil, že zatímco kalibrační křivka TMSi-CHOL měla lineární průběh v celém rozsahu, tak kalibrační křivky TMSi-HMR a TMSi-ENTL měly lineární průběh až v rozsahu 25 – 500 µg/ml. V rozsahu 1,5 – 25 µg/ml kalibrační křivky TMSi-HMR a TMSi-ENTL lineární průběh neměly. Toto zjištění vedlo k hypotéze, že v některém z kroků (pravděpodobně během chromatografie) může docházet ke ztrátám, které jsou procentuálně významnější právě pro nižší koncentrace. Tuto hypotézu nebylo možné dále ověřit.

Při validaci GC-MS metody tak byl k aproximaci průběhu kalibrační křivky použit polynom druhého řádu, který byl signifikantně lepší než aproximace pomocí přímky. Metoda pak byla úspěšně validována v rozsahu 0,15 – 15 µg/ml.

Porovnání účinnosti vybraných derivatizačních činidel ukázalo, že mezi jednotlivými derivatizačními činidly existují statisticky významné rozdíly. A to jak při porovnání derivatizačních činidel mezi sebou, tak i při porovnání účinnosti daného derivatizačního činidla pro ENTL a HMR. Na základě výsledků bylo k derivatizaci směsného roztoku ENTL a HMR doporučeno používat MSTFA-I a MSTFA-II.

Test stability TMSi HMR ukázal, že roztok TMSi HMR v hexanu je při pokojové teplotě možné skladovat po dobu 3 dní a při teplotě -80 °C pak po dobu 90 dní. Stabilita TMSi derivátů lignanů by tak neměla být při GC-MS analýze překážkou.

5 REFERENCE

1. HAWORTH RD Natural resins. *Ann. Rep. Prog. Chem.* 1936, 33, 266–279. [cit. 2016-11-03].
2. WILLFOR, S., M. REUNANEN, P. EKLUND, R. SJOHOLM, L. KRONBERG, P. FARDIM, S. PIETARINEN, B. HOLMBOM. Oligolignans in Norway spruce and Scots pine knots and Norway spruce stemwood. *Holzforschung* [online]. 2005, 58, 345–354 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1515/HF.2004.053.
3. POPOVA, I.E., C. HALL a A. KUBÁTOVÁ. Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, 1216(2), 217-229 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.11.063. ISSN 00219673.
4. WILLFÖR, S.M., A.I. SMEDS a B.R. HOLMBOM. Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, 1112(1-2), 64-77 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.11.054. ISSN 00219673.
5. GORDALIZA, M, P.A GARCÍA, J.M MIGUEL DEL CORRAL, M.A CASTRO a M.A GÓMEZ-ZURITA. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon* [online]. 2004, 44(4), 441-459 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.05.008. ISSN 00410101.
6. WARD, R.S. Recent Advances in the Chemistry of Lignans [online]. s. 739 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1016/S1572-5995(00)80054-X.
7. KEBBI-BENKEDER, Zineb, Francis COLIN, Stéphane DUMARÇAY a Philippe GÉRARDIN. Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. *Annals of Forest Science* [online]. 2015,72(2), 277-284 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1007/s13595-014-0428-7. ISSN 1286-4560.

8. FREUDENBERG, Karl a Leo KNOF. Die Lignane des Fichtenholzes. *Chemische Berichte* [online]. 1957, 90(12), 2857-2869 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1002/cber.19570901221. ISSN 00092940.
9. R., Wilson, Mrcio Luis Andrade E SILVA, Rodrigo Cassio SOLA VENEZIANI, Srgio RICARDO a Jairo KENUPP. Lignans: Chemical and Biological Properties. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health* [online]. InTech, 2012 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.5772/28471. ISBN 978-953-51-0296-0.
10. FRANCO, Oscar H, Huibert BURGER, Corinne E. I. LEBRUN, Petra H. M. PEETERS, Steven W. J. LAMBERTS, Diederick E. GROBBEE, Yvonne T. Van Der SCHOUW. Higher Dietary Intake of Lignans Is Associated with Better Cognitive Performance in Postmenopausal Women, *J. Nutr* [online]. 2005 135 (5), 1190-1195, [cit. 2016-11-03].
11. Food and Drug Agency. New Dietary Ingredient Notification for 7-Hydroxymatairesinol (HMR) Potassium Acetate Complex [online], www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0235-05-contents-vol167.pdf, 2004. [cit. 2016-11-03]
12. SPILIOTI Eliana, Bjarne HOLMBOM, Athanasios G. PAPA VASSILIOU a Paraskevi MOUTSATSOU. Lignans 7-hydroxymatairesinol and 7-hydroxymatairesinol 2 exhibit anti-inflammatory activity in human aortic endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2014, 58(4), 749-759 [cit. 2016-11-03]. DOI: 10.1002/mnfr.201300318
13. HEINONEN, Satu, Tarja NURMI, Kirsi LIUKKONEN, Kaisa POUTANEN, Kristiina WÄHÄLÄ, Takeshi DEYAMA, Sansei NISHIBE a Herman ADLERCREUTZ. In Vitro Metabolism of Plant Lignans: New Precursors of Mammalian Lignans Enterolactone and Enterodiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2001, 49(7), 3178-3186 [cit. 2016-11-12]. DOI: 10.1021/jf010038a. ISSN 0021-8561.
14. GRACE, Philip B, James I TAYLOR, Nigel P BOTTING, Tara FRYATT, Mark F OLDFIELD a Sheila A BINGHAM. Quantification of isoflavones and lignans in urine

using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* [online]. 2003, 315(1), 114-121 [cit. 2016-11-12]. DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00707-8. ISSN 00032697

15. SMEDS, Annika I., Stefan M. WILLFÖR, Suvi P. PIETARINEN, Pirjo PELTONEN-SAINIO a Markku H. T. REUNANEN. Occurrence of “mammalian” lignans in plant and water sources. *Planta* [online]. 2007-7-5, 226(3), 639-646 [cit. 2016-11-12]. DOI: 10.1007/s00425-007-0512-4. ISSN 0032-0935.

16. TŘÍSKA, Jan, Martin MOOS, Iveta MAREŠOVÁ, Naděžda VRCHOTOVÁ. Occurrence of Lignans in Environmental Waters. *CECE 2012: 9th international interdisciplinary meeting on bioanalysis : Brno, Czech Republic ..* Brno: Institute of Analytical Chemistry AS CR, 2004.

17. KANG, J., PRICE, W. E, HICK, L. A. Simultaneous determination of isoflavones and lignans at trace levels in natural waters and wastewater samples using liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom* [online]. 2006, 20, 2411–2418 [cit. 2016-11-12].. doi:10.1002/rcm.2609

18. DRBAL, Karel a Martin KŘÍŽEK. *Analytická chemie*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 1999. ISBN 80-7040-352-7.

19. KITSON, Fulton G., Barbara Seliger LARSEN a Charles N. MCEWEN. *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. San Diego: Academic Press, c1996 .

20. Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi. [online] <http://www.enclabmed.cz/encyklopedie/A/JVATL.htm> [cit. 2016-11-26].

21. ORATA, Francis. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications* [online]. InTech, 2012 [cit. 2016-11-12]. DOI: 10.5772/33098. ISBN 978-953-51-0298-4.

22. SARAJLIJ, H., N., ČUKEJL., D., NOVOTNI, G., MRŠIĆ, M., BRNČIĆ, D., ČURIĆ. Preparation of flaxseed for lignan determination by gas chromatography-mass spectrometry metho., *Czech J. Food Sci.*, 30, 45-52 , 2012 [online]. [cit. 2016-11-12]
23. LIGGINS, Jason, Rebecca GRIMWOOD a Sheila A. BINGHAM. Extraction and Quantification of Lignan Phytoestrogens in Food and Human Samples. *Analytical Biochemistry* [online]. 2000, 287(1), 102-109 [cit. 2016-11-12]. DOI: 10.1006/abio.2000.4811. ISSN 00032697.
24. MAZUR, Witold, Theodore FOTSIS, Kristina WÄHÄLÄ, Sirpa OJALA, Auli SALAKKA a Herman ADLERCREUTZ. Isotope Dilution Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Method for the Determination of Isoflavonoids, Coumestrol, and Lignans in Food Samples. *Analytical Biochemistry* [online]. 1996, 233(2), 169-180 [cit. 2016-11-12]. DOI: 10.1006/abio.1996.0025. ISSN 00032697
25. XIA, Yong-Gang, Bing-You YANG, Jun LIANG, Qi YANG, Di WANG a Hai-Xue KUANG. Quantitative Analysis and Fingerprint Profiles for Quality Control of Fructus Schisandrae by Gas Chromatography: Mass Spectrometry. *The Scientific World Journal* [online]. 2014, 2014, 1-8 [cit. 2016-11-12]. DOI: 10.1155/2014/806759. ISSN 2356-6140.
26. KAMAL-ELDIN, A., L. Å. APPELQVIST a G. YOUSIF. Lignan analysis in seed oils from four Sesamum species: Comparison of different chromatographic methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society* [online]. 1994, 71(2), 141-147 [cit. 2016-11-12]. DOI: 10.1007/BF02541548. ISSN 0003-021x.
27. PEÑALVO, José L., Kati M. HAAJANEN, Nigel BOTTING a Herman ADLERCREUTZ. Quantification of Lignans in Food Using Isotope Dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2005, 53(24), 9342-9347 [cit. 2016-12-07]. DOI: 10.1021/jf051488w. ISSN 0021-8561.
28. DONIKE, M. a J. ZIMMERMANN. Zur Darstellung von Trimethylsilyl-, Triethylsilyl- und tert.-Butyldimethylsilyl-enoläthern von Ketosteroiden für gas-

chromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen. *Journal of Chromatography A* [online]. 1980, 202(3), 483-486 [cit. 2016-12-07]. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)91836-3. ISSN 00219673.

29. MARTIN, Luis-Alberto. Silylation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *AnalytiX* [online]. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytix/silylation-reagents.html> [cit. 2016-11-26].

30. WILLFÖR, S.M., A.I. SMEDS a B.R. HOLMBOM. Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A* [online]. 2006, 1112(1-2), 64-77 [cit. 2016-11-26]. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.11.054. ISSN 00219673.

31. ATKINSON, David A., Herbert H. HILL a Terry D. SHULTZ. Quantification of mammalian lignans in biological fluids using gas chromatography with ion mobility detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 1993, 617(2), 173-179 [cit. 2016-11-26]. DOI: 10.1016/0378-4347(93)80485-M. ISSN 03784347.

32. MAREŠOVÁ I. *Biomasa jako zdroj lignanů a studium jejich distribuce*. České Budějovice, 2014. Disertační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Fakulta zemědělská. Katedra aplikované chemie.

33. HUANG, Bin, Xue-Jun PAN, Jing-Liang LIU, Kai FANG, Yu WANG a Jian-Pei GAO. Hydroxyl Group Derivatization of Steroid Environmental Endocrine Disrupting Chemicals. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2009, 37(11), 1651-1656 [cit. 2016-11-26]. DOI: 10.1016/S1872-2040(08)60145-0. ISSN 18722040.

34. QIAN, Yuan, Tjorben POSCH a Torsten C. SCHMIDT. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on glass surfaces. *Chemosphere* [online]. 2011, 82(6), 859-865 [cit. 2016-11-26]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.11.002. ISSN 00456535.

35. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology [online], 1996. [cit. 2016-11-26]

36. CARRIERI, Mariella, Giovanni Battista BARTOLUCCI, Monica LIVIERI, Enrico PACI, Daniela PIGINI, Renata SISTO, Federica CORSETTI a Giovanna TRANFO. Quantitative determination of the 1,3-butadiene urinary metabolite 1,2-dihydroxybutyl mercapturic acid by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry using polynomial calibration curves. *Journal of Chromatography B* [online]. 2009, 877(13), 1388-1393 [cit. 2016-11-26]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.02.005. ISSN 15700232.
37. MASSART, Desiré L. *Handbook of chemometrics and qualimetrics*. New York: Elsevier, 1998. ISBN 0444828532.
38. Communities, Association of Analytical. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Appendix F, p. 9. [Online] 2012. [cit. 2016-11-26]
39. MILDER, Ivon E. J., Ilja C. W. ARTS, Betty van de PUTTE, Dini P. VENEMA a Peter C. H. HOLLMAN. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *British Journal of Nutrition* [online]. 2005, 93(03), 393- [cit. 2016-12-06]. DOI: 10.1079/BJN20051371. ISSN 0007-1145.
40. WILLFOR, S., L. NISULA, J HEMMING, M. REUNANEN, B. HOLMBOM. Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 2: Knots and stemwood of fir species, *Holzforschung* [online]. 2004, 58, 650-659 [cit. 2016-12-06]. DOI: 10.1515/HF.2004.119.
41. MEAGHER, Lucy P. a Gary R. BEECHER. Assessment of Data on the Lignan Content of Foods. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2000,13(6), 935-947 [cit. 2016-12-06]. DOI: 10.1006/jfca.2000.0932. ISSN 08891575.
42. MAZUR, W., H. ADLERCREUTZ. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. Naturally occurring oestrogens in food [online]. 1998, 70(9), 1759-1776 [cit. 2016-12-06].

43. MAZUR, Witold a Herman ADLERCREUTZ. Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health. *Nutrition*[online]. 2000, 16(7-8), 654-658 [cit. 2016-12-06]. DOI: 10.1016/S0899-9007(00)00333-6. ISSN 08999007.
44. WILLFOR, S., L. NISULA, J HEMMING, M. REUNANEN, B. HOLMBOM. Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stemwood of different spruce species, *Holzforschung* [online]. 2004, 58, 335–344 [cit. 2016-12-06]. DOI: 10.1515/HF.2004.052.
45. WILLFOR, S., L. NISULA, J HEMMING, M. REUNANEN, B. HOLMBOM. Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 2: Knots and stemwood of fir species, *Holzforschung* [online]. 2004, 58, 650-659 [cit. 2016-12-06]. DOI: 10.1515/HF.2004.119.

6 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

ANOVA	Analysis of variance – Analýza rozptylu
ANSECO	Ansecoisolariciresinol
ARC	Arctigenin
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CONI	Conidendrin
D	Detected - Detekováno
df	Degrese of freedom - Stupeň volnosti
DAD	Diode array detector – Detektor s diodovým polem
DMDCS	Dimethyldichlorosilan
END	Enterodiol
ENTL	Enterolakton
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flame ionization detektor – Plamenově ionizační detektor
GC	Gas chromatography – Plynová chromatografie
HEL	7-Hydroxyenterolakton
HMDS	Hexamethyldisilazan
HMR	7-Hydroxymatayresinol
HPLC	High performace liquid chromatgropy – Vysoce účinná kapalinová chromatografie
CHOL	Cholesterol
IMS	Ion-mobility spektrometry – Iontová mobilní spektrometrie
Iso-LAR	Iso-Lariciresinol
ISQ	Ion single quadropole – Jednoduchý kvadrupól
ISTD	Internal standard – Vnitřní standard
IT	Ion trap – Iontová past
LAR	Lariciresinol
LOD	Limit of detection – Mez detekce
LOQ	Limit of quantification – Mez stanovitelnosti
Me-C19	Methylester kyseliny stearové
Me-OH	Methanol
MR	Matairesinol

MS	Mass spectrometry – Hmotnostní spektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
NA	Not analyzed – Nebylo analyzováno
ND	Not determined – Nebylo určeno
NR	Not reported - Nebylo uvedeno
p	Probability - Pravděpodobnost
PIN	Pinoresinol
R ²	Coefficient of determination – Koeficient determinace
SDG	Secoisolariciresinol diglucoside
SEC	Secoisolariciresinol
SIM	Single ion monitoring – Měření jediného iontu
ST	Standard
SYR	Syringaresinol
TIC	Total ion chromatogram – Měření všech hmot v daném rozsahu
TMSi	Trimethylsilyl
TSQ	Ion triple quadrupole – Trojitý kvadrupól
UV	Ultra violet – Ultrafialové záření