

VYSOKOÚČINNÉ SEPARAČNÍ METODY PŘI ANALÝZE BENZENKARBOXYLOVÝCH KYSELIN

MILAN WURST^a, VĚRA PACÁKOVÁ^b
a KAREL ŠTULÍK^b

^aMikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Václavská 1083, 142 20 Praha 4, ^bKatedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2, e-mail: pacakova@natur.cuni.cz

Došlo dne 5.X.2000

Klíčová slova: benzenkarboxylové kyseliny, GC, HPLC, kapilární elektroforéza

Obsah

1. Úvod
2. Metody analýzy benzenkarboxylových kyselin
 - 2.1. Plynová chromatografie
 - 2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
 - 2.3. Kapilární elektroforéza
 - 2.4. Chirální separace
3. Závěr

1. Úvod

Rostlinná oblast biosféry je zdrojem nejrůznějších aromatických sloučenin, které jsou složkami rostlinných barviv, květů a plodů i jiných částí rostlin (lignin), vonných olejů a v neposlední řadě jsou vytvářeny rostlinami na obranu před různými škůdci (hmyz, mikroorganismy). Aromatické látky jsou produkovány nejen rostlinami, ale i některými mikroorganismy (houby, bakterie). Naopak živočišné organismy jsou odkázány na příjem těchto látek potravou, např. ve formě aromatických aminokyselin. Z toho vyplývá, že výskyt aromatických sloučenin a jejich metabolitů v živočišném organismu je vždy důsledkem přísunu zvenčí.

V rostlinách, houbách a mikroorganismech vznikají aromatické látky jednak šikimátovou dráhou jako produkt cukerného metabolismu, jednak oligoketidovou dráhou, tj. kondenzací acetaátových jednotek, kdy se vytvářejí převážně tzv. sekundární metabolity. Aromatické látky, především fenolové kyseliny, vznikají též rozkladem zbytků rostlin v půdě; při vyšších koncentracích mohou být autotoxické a mít tak negativní vliv na úrodu kulturních plodin. Některé benzenkarboxylové kyseliny (BKK), jako jsou např. salicylová, katalpová, gentisová, protocatechová, kumarová, ferulová, sinapová a kávová kyselina, vznikají při biosyntéze a látkové přeměně aromatických aminokyselin. Fenolické karboxylové kyseliny, které používá rostlina jako ochranu před houbami a plísněmi, jsou užitečné též v medicíně. Některé deriváty jsou účinné pro

snížení hladiny lipidů a cholesterolu a jsou aktivní i antimikrobiálně a antivirově. Jsou to např. deriváty 3-fenylpropanové kyseliny, jako je skořicová kyselina a její složitější deriváty, např. kumariny. Značný význam pro lékařskou diagnostiku má stanovení obsahu jednoduchých aromatických kyselin a jejich derivátů v tělních tekutinách, kde se vyskytují jako metabolity léčiv a jedů i jako důsledek patologických metabolických procesů v organismu při některých onemocněních (fenyloctová, mandlová, 4-hydroxy-3-methoxymandlová, homovanilová, vanilová kyselina).

Jednoduché aromatické kyseliny v rostlinách mají často terapeutické účinky a široce se používají ve fytoterapii jak vnitřní (čaje), tak i vnější (obklady, koupele, masti). Po objevu v přírodním materiálu bylo možné tyto sloučeniny i jejich deriváty syntetizovat pro použití ve farmakologii. Salicylová a benzoová kyselina a jejich deriváty se uplatňují v kožním lékařství jako antiflogistika, analgetika, antipyretika a antirevmatika. Podobné terapeutické účinky mají deriváty kyselin 3-fenylpropanové (ibuprofen, fenoprofen, ketoprofen, naproxen a pod.), fenyloctové (diclofenac, aceclofenac) a anthranilové (2-aminobenzoové). 4-Aminosalicylová kyselina je účinnou látkou pro léčbu tuberkulózy. Další deriváty benzoové kyseliny (kokain, prokain, hexylkain aj.) se používají ve stomatologii, očním a krčním lékařství jako anestetika.

Jednoduché aromatické karboxylové kyseliny mají význam i v jiných oborech, včetně průmyslového využití. V potravinářství se hojně používá sodná sůl benzoové kyseliny jako konzervační přísada pro inhibici růstu mikroorganismů (kvasinek a plísní). Široce jsou používány polyester aromatických karboxylových kyselin a polyhydroxyalkoholů při výrobě plastů, syntetických vláken a barvářských pryskyřic. Estery fenyloctové, 3-fenylpropanové, skořicové, anthranilové a dalších kyselin jsou součástí přírodních i syntetických vonných a chuťových látek.

2. Metody analýzy benzenkarboxylových kyselin

Stanovení směsí BKK jako složek komplexních biologických materiálů vyžaduje vysoce účinné, selektivní a citlivé analytické metody¹⁻³. Tyto požadavky splňuje plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza (CE). Volba separačního systému se odvíjí od vlastností BKK, což jsou slabé kyseliny, které obsahují jak hydrofilní, tak hydrofobní funkční skupiny a jejichž disociaci lze ovlivnit volbou pH. Vzhledem ke svému polárnímú charakteru jsou obvykle málo těkavé.

Významné místo, zejména ve farmaceutické analýze, zauímají separace optických izomerů BKK, protože biologická aktivita je převážně vázána na jeden enantiomer. K separaci enantiomerů se využívají všechny níže diskutované vysokoúčinné separační metody.

Struktura, systematické a triviální názvy vybraných BKK jsou uvedeny v tab. I.

Tabulka I

Struktura, systematické a triviální názvy benzenkarboxylových kyselin (R¹–R⁶ – substituenty na benzenovém jádře)

Č.	Systematický název	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
1	benzoová	COOH	H	H	H	H	H
2	2-hydroxy-(salicylová)	COOH	OH	H	H	H	H
3	3-hydroxy-	COOH	H	OH	H	H	H
4	4-hydroxy-(katalpová)	COOH	H	H	OH	H	H
5	2,3-dihydroxy-(pyrokatechová)	COOH	OH	OH	H	H	H
6	2,4-dihydroxy-(β-resorcylová)	COOH	OH	H	OH	H	H
7	2,5-dihydroxy-(gentisová)	COOH	OH	H	H	OH	H
8	2,6-dihydroxy-(γ-resorcylová)	COOH	OH	H	H	H	OH
9	3,4-dihydroxy-(protokatechová)	COOH	H	OH	OH	H	H
10	3,5-dihydroxy-(α-resorcylová)	COOH	H	OH	H	OH	H
11	2,3,4-trihydroxy-	COOH	OH	OH	OH	H	H
12	3,4,5-trihydroxy-(gallová)	COOH	H	OH	OH	OH	H
13	2-methoxy-(<i>o</i> -anisová)	COOH	OCH ₃	H	H	H	H
14	3-methoxy-(<i>m</i> -anisová)	COOH	H	OCH ₃	H	H	H
15	4-methoxy-(<i>p</i> -anisová)	COOH	H	H	OCH ₃	H	H
16	2,3-dimethoxy-	COOH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H
17	2,6-dimethoxy-	COOH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃
18	3,4-dimethoxy- (veratrová)	COOH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
19	3,5-dimethoxy-	COOH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	H
20	4-hydroxy-3-methoxy- (vanilová)	COOH	H	OCH ₃	OH	H	H
21	4-hydroxy-3,5-dimethoxy- (syringová)	COOH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
22	fenyloctová	CH ₂ COOH	H	H	H	H	H
23	4-hydroxyfenyloctová	CH ₂ COOH	H	H	OH	H	H
24	2,5-dihydroxyfenyloctová (homogentisová)	CH ₂ COOH	OH	H	H	OH	H
25	4-hydroxy-3-methoxyfenyloctová (homovanilová)	CH ₂ COOH	H	OCH ₃	OH	H	H
26	3,4-dimethoxyfenyloctová (homoveratrová)	CH ₂ COOH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
27	fenyl(hydroxy)octová (mandlová)	CH(OH)-COOH	H	H	H	H	H
28	hydroxy(2-methoxyfenyl)octová (<i>o</i> -methoxymandlová)	CH(OH)-COOH	OCH ₃	H	H	H	H
29	hydroxy(3-methoxyfenyl)octová (<i>m</i> -methoxymandlová)	CH(OH)-COOH	H	OCH ₃	H	H	H
30	hydroxy(4-methoxyfenyl)octová (<i>p</i> -methoxymandlová)	CH(OH)-COOH	H	H	OCH ₃	H	H
31	hydroxy(4-acetoxifenyl)octová (<i>p</i> -acetoxymandlová)	CH(OH)-COOH	H	H	OCOCH ₃	H	H
32	3-fenylpropenová (skořicová)	CH=CHCOOH	H	H	H	H	H
33	3-(2-hydroxyfenyl)propenová (<i>o</i> -kumarová)	CH=CHCOOH	OH	H	H	H	H
34	3-(3-hydroxyfenyl)propenová (<i>m</i> -kumarová)	CH=CHCOOH	H	H	OH	H	H
35	3-(4-hydroxyfenyl)propenová (<i>p</i> -kumarová, <i>p</i> -hydroxyskořicová)	CH=CHCOOH	H	H	OH	H	H
36	3-(3,4-dihydroxyfenyl)propenová (kávová, 3,4-dihydroxy skořicová)	CH=CHCOOH	H	OH	OH	H	H
37	3-(4-hydroxy-3-methoxy-fenyl)propenová (ferulová, 4-hydroxy-3-methoxyskořicová)	CH=CHCOOH	H	OCH ₃	OH	H	H
38	3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)propenová (sinapová, 4-hydroxy-3,5-dimethoxyskořicová)	CH=CHCOOH	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
39	3-(2-hydroxyfenyl)propanová (melilotová)	CH ₂ CH ₂ COOH	OH	H	H	H	H
40	2-amino-3-fenylpropanová (fenylalanin)	CH ₂ CH(NH ₂)-COOH	H	H	H	H	H
41	2-amino-3-(4-hydroxy-fenyl)propanová (tyrosin)	CH ₂ CH(NH ₂)-COOH	H	H	OH	H	H
42	2-amino-3-(3,4-dihydroxyfenyl)propanová (DOPA)	CH ₂ CH(NH ₂)-COOH	H	OH	OH	H	H
43	2-aminobenzoová (anthranilová)	COOH	NH ₂	H	H	H	H
44	4-aminobenzoová	COOH	H	H	NH ₂	H	H
45	2-amino-3-hydroxybenzoová (3-hydroxyanthranilová)	COOH	NH ₂	OH	H	H	H
46	3-fenyl-2-oxopropanová (fenylpyrohroznová)	CH ₂ COCOOH	H	H	H	H	H

2.1. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je velmi účinná separační metoda, vhodná zejména pro stanovení těkavých látek. Přestože benzenkarboxylové kyseliny jsou málo těkavé a tepelně nestálé, je GC široce používána pro jejich analýzu. Je však nezbytné je před vlastní GC analýzou převést na stabilnější a těkavější deriváty. Využívají se funkční karboxy-, hydroxy-, eventuálně aminoskupiny na benzenovém jádře, které obsahují aktivní vodík. Nejčastěji se připravují alkyl-, acetyl-, alkoxy nebo trimethylsilyl (TMS) deriváty. Použití silylačních metod je nejobecnější, neboť silylační činidla reagují současně s různými funkčními skupinami BKK. K přípravě TMS derivátů byla použita řada silylačních činidel a jejich kombinace, např. trimethylchlorosilan (TMCS), dimethyldichlorsilan (DMCS) nebo hexamethyldisilazan (HMDS). Silná silylační činidla, jako jsou *N,N'*-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA), *N,N'*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA), *N*-(trimethylsilyl)imidazol (TMSI) a *N*-(trimethylsilyl)diethylamin (TMSDA) jsou vhodná pro vícenásobnou silylaci, např. pro aminokyseliny a složitější aromatické látky. TMSDA se používá pro málo reaktivní sloučeniny.

BKK se dále derivatizují na alkylestery, které jsou méně polární a těkavější. Methylestery (ME) se připravují reakcí s diazomethanem nebo reakcí stříbrných solí karboxylových kyselin s methyljodidem. Reakce s diazomethanem je velmi rychlá, avšak diazomethan je toxický. Reakce s methyljodidem je sice pomalá, avšak probíhá s vysokou výtěžností. Velmi účinná je esterifikace pomocí methyl- a ethylchloromravenčanů (MCF, ECF) za vzniku methyl- nebo ethylderivátů.

Jinou formou derivatizace je pyrolyza, kdy se analyzovaná látka reprodukovatelně rozloží na těkavější produkty v pyrolyzátoru, přímo připojeném k plynovému chromatografu, v němž se produkty separují (metoda Py-GC).

K separaci derivátů BKK se používají nepolární i středně polární stacionární fáze. Nejběžnější je plamenová ionizační detekce (FID), pro halogenderiváty BKK je vhodný detektor elektronového záhytu (ECD). Plynově chromatografická analýza BKK nabyla na významu zejména po zavedení kapilárních kolon a jejich spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS). Metoda GC-MS patří k nejvýznamnějším současným analytickým metodám, neboť se vyznačuje vysokou separační účinností spojenou s citlivou detekcí s velkou vypovídací schopností, která usnadňuje identifikaci neznámých látek.

Některé příklady použití GC k dělení a stanovení směsí BKK v různých maticích jsou uvedeny v tab. II (cit.^{1,2,4-15}).

2.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se široce používá pro analýzu BKK zejména proto, že nevyžaduje, aby analyty byly těkavé a tepelně stálé a tedy umožňuje jejich přímé stanovení bez předchozí derivatizace. Využívají se různé stacionární fáze. Disociaci BKK lze buď podpořit a pak využít iontově výměnnou chromatografii (IEC) nebo iontově párovou chromatografii (IPC), nebo naopak potlačit a použít chromatografii na reverzních stacionárních fázích (RPC). Nejběžnější jsou chemicky vázané reverzní fáze, které vykazují lepší selektivitu vůči mírně polárním sloučeninám a většinou umožňují i vyšší účinnost separace než adsorbenty a měniče iontů.

Volba mobilní fáze a její pH závisí na použité stacionární fázi. V RPC závisí retence jednosytné kyseliny HA na pH a na disociační konstantě K_a :

$$k = k_0 (1 - F^-) + k_{-1} F^-$$

kde $F^- = 1 / \{1 + ([H^+]/K_a)\}$, k_0 a k_{-1} jsou retenční poměry neionizované a ionizované formy a F^- je frakce ionizovaných molekul.

Mobilní fáze v RPC jsou nejčastěji vodné roztoky pufrů v kombinaci s organickými modifikátory, jako jsou methanol (MeOH) nebo acetonitril (ACN). Pufr by měl potlačit disociaci kyseliny a mít dostatečnou pufrací kapacitu. Zvýšení koncentrace pufru způsobí sice zvýšení pufrací kapacity, ale také může vyvolat vysolovací efekt. Hodnota pH mobilní fáze by se v případě fází na bázi silikagelu měla pohybovat v rozmezí pH 2–8. Tomuto požadavku vyhovují např. pufrы fosfátový (pH 2,1–3,1 a 6,2–8,2), acetátový (pH 3,8–5,8), citrátový (pH 2,1–6,4), uhličitanový (pH 3,8–4,8) a některé další, přičemž nejběžnější jsou fosfátový a acetátový pufr nebo jejich kombinace. Další důležitou vlastností vybraného pufru je jeho rozpustnost v mobilní fázi. Anorganické pufrы (např. fosfátové) jsou špatně rozpustné v mobilních fázích, které obsahují vysokou koncentraci organického modifikátoru. Mobilní fáze methanol–voda poskytuje lepší rozpustnost, a proto je methanolu při volbě organického rozpouštědla dávána většinou přednost.

HPLC iontů bývá obtížnější než separace neutrálních látek. Používají se buď IEC nebo IPC s reverzní stacionární fází a s mobilní fází obsahující iontově párové činidlo, nejčastěji kvartérní amoniouvé bázi nebo její sole, jako jsou dodecyltrimethylamonium-bromid (DTAB), tetrabutylamonium-bromid (TBAB) nebo jodid (TBAJ), tetraethylamonium-bromid (TEAB) nebo jodid (TEAJ) a pod. Pro separaci organických kyselin se používají jak slabé, tak silné měniče aniontů. Jako mobilní fáze slouží voda, zředěné roztoky kyselin a některých pufrů. Zajímavou stacionární fází je amorfní oxid zirkoničitý, který se chová jako slabý měnič aniontů. BKK se dělí jak izokraticky, tak s gradientovou elucí. IEC aromatických kyselin se v současné době používá jen zřídka a většinou se nahrazuje metodou IPC, která je účinnější. Přesto jsou však případy, kdy metoda IEC je výhodnější, např. při použití hmotnostní detekce, kdy mobilní fáze musí být dostatečně těkavá a obsahovat málo solí.

Adsorpční chromatografie se nepoužívá příliš často vzhledem k tomu, že není příliš účinná. Jako mobilní fáze při ní slouží směsi rozpouštědel o různé polaritě.

Vzhledem k tomu, že aromatický kruh silně absorbuje ultrafialové záření, je zdaleka nejběžnější UV spektrofotometrická detekce, v současné době hlavně s diodovým polem (DAD). Dále se uplatňuje selektivní a vysoce citlivá fluorescenční (FD) nebo elektrochemická (voltametrická) detekce (ED), resp. pulsní amperometrická detekce (PAD). Metoda HPLC-MS dovoluje identifikovat a kvantifikovat velmi malá množství stanovovaných látek (méně než 6 pg).

Při analýze přírodních materiálů často předchází separačním metodám, jako jsou GC a HPLC, extrakce na tuhé fázi (SPE), protože matrice vzorků (např. vosků, olejů atd.) může poškozovat analytické kolony a rušit chromatografická stanovení a mnohdy je rovněž zapotřebí vzorky zakoncentrovat. Jako tuhé extrakční fáze se často kombinují různé materiály, např. reverzní fáze s iontově výměnnou.

Tabulka II
 GC některých benzenkarboxylových kyselin

Analyt	Derivát	Stacionární fáze	Teplota [°C]	Detekce	Poznámka	Cit.
Gentisová, 6-methylsalicylová, 3-hydroxybenzoová kyselina	TMS	10 % QF-1/Gas-Chrom Q	120–200	FID	metabolity patulinu, stanovení	5
Přírodní netěkavé fenolické látky	TMS	1,5 % SE-30 + 1,5 % SE-52/Chromosorb W, AW, DMCS	80–210 210–300	FID	rostlinný extrakt, identifikace i stanovení	4
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	1 % OV-1/Chromosorb W, AW, DMCS	100–200	MS	sedimenty řek, jezera a moře, identifikace	6
Aromatické karboxylové kyseliny	TMS	2,5 % SE-52 + 2,5 % MPHT/Chromosorb G, AW, DMCS	120–160 2 °C/min	FID	metabolity houby <i>Oudemasiela mucida</i> , stanovení, dělení	1
Fenolické karboxylové kyseliny	různé	OV-1/kapilární kolona	100–250 160	FID ECD	studium derivatizace	7
Deriváty benzenkarboxylových kyselin	TMS	1 % SE-52, OV-1, MPHT, OV-17/Chromosorb G, AW, DMCS	100–250 2 °C/min	FID	mikrobiální metabolity stanovení, srovnání s HPLC	2
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	SE-52/kapilární kolona	80–260	MS	<i>Lysimachia nummularia</i> , <i>Lysimachia vulgaris</i> , identifikace, stanovení	8
Metabolity 1,4-diethylbenzenu	TMS ME	OV-1/kapilární kolona	35–55– –250	MS	kryší moč, identifikace	9
Benzoová kyselina	–	QF-1/kapilární kolona	200	FID	kůže	10
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	SE-54/kapilární kolona	80–280 300	FID ECD	propolis, identifikace	11
Fenolické karboxylové kyseliny	MCF	ECF SP-SIL-5CB/kapilární kolona	gradient teploty	FID	studium derivatizace	12
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	SPB-1/kapilární kolona	138–150	FID	rostlinné pletivo, půdy, stanovení	13
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	poly[fenyl(methyl)siloxan]/kapilární kolona	80–320 MS	FID	pšenice, trávy, identifikace	14
Fenolické karboxylové kyseliny	TMS	poly[fenyl(methyl)siloxan]/kapilární kolona	40–290	MS	analýza tanninu, rostlinné pletivo	15

 Tabulka III
 Příklady aplikací HPLC

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Poznámky	Cit.
Ferulová kyselina	Hypersil ODS	12 % MeOH-citrátový pufr, pH 5,4	DAD, FD	mletá pšenice	16
Fenolické karboxylové kyseliny a další látky	C18	gradient 2–100 % ACN ve vodě, pH 2,6	UV	červené víno	17
Benzenkarboxylové kyseliny	SIX C18, SGX C18	EtOH + 1 % CH ₃ COOH 5:95, 10:90, 20:80 i gradient	UV	kultivační medium srovnání s GC	2
Fenolické karboxylové kyseliny	Viospher C6	12 % MeOH v 0,1 % HClO ₄	ED	metabolismus ligninu a celulosy, pšeničná sláma	18
Benzenkarboxylové kyseliny	RP 18	MeOH + HCOOH + voda	UV	<i>Genus althaea</i> , identifikace	19
Salicylová kyselina a produkty hydroxylace	ODS	0,03 M acetát-citrátový pufr, pH 3,6	ED	měření hydroxylových radikálů v srdci	20
Benzoová a hippurová kyselina	Ultraspher ODS	ACN–H ₂ O–CH ₃ COOH (12 + 38 + 0,25)	UV	metabolity benzylalkoholu v plazmě	21

Tabulka III – pokračování

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Poznámky	Cit.
Benzoová kyselina	Econospher C18	ACN–0,02 % H ₃ PO ₄ izokrat. + gradient	UV	podzemní vody, biodegradace toluenu	22
Thiofenkarboxylová a benzoová kyselina	RP18	30 % MeOH v 0,01 M fosfát	UV	biologické vzorky, metabolismus	23
Benzoová kyselina	Spherisorb C18	8 % MeOH ve fosfát. pufru, pH 6,7	UV	konzervační prostředky	24
Benzoová kyselina	NovaPak C18	ACN + fosfátový pufr, pH 3,9	UV	aditiva v potravinách, porovnání CZE a HPLC	25
Fenolické karboxylové kyseliny anthokyaninů	SuperPak C18	MeOH–H ₂ O–1 % HCOOH gradientová eluce	PAD	okvětní lístky grejpů	26
Fenolické glykosidy	C18	10 % ACN v 2 % CH ₃ COOH	UV	semipreparativní izolace látek v mouce	27
Benzoová kyselina a její konjugáty	C8	MeOH + 0,2 % CH ₃ COOH	IS-MS	játra krysy, vztah mezi strukturou a metabolismem	28
Benzenkarboxylové kyseliny	Spherisorb ODS	8 % MeOH v octanovém pufru	UV	obsah žaludku přezvýkavců	29
Fenolické karboxylové kyseliny	Adsorbospher C18	ACN–H ₂ O–H ₃ PO ₄ , gradientová eluce	DAD	ječmenový slad, antioxidační vlastnosti	30
Skořicová a benzoová kyselina	Nucleosil C18	ACN–H ₂ O–CH ₃ COOH	DAD	vinný mošt, kvašení	31
Fenolické karboxylové kyseliny	Hypersil ODS	MeOH–H ₂ O–CH ₃ COOH (25 + 75 + 1)	UV	rostlinný materiál <i>Echinacea sp.</i> , SPE, výměna iontů	32
Substituované benzoové kyseliny	Spherisorb ODS	H ₂ O–ACN–MeOH–CH ₃ COOH (88 + 10 + 2)	DAD	flavonový metabolismus, tělní tekutiny, <i>Ginkgo biloba</i>	33,34
Salicylová, acetylsalicylová kyselina	RP18	ACN–pufr, pH 6, TBA	UV	IPC, studie separace BKK	35
Aspirin, antipyrin, fenobarbital	Bondapak C8	ACN–fosfátový pufr, pH 3 a 6, TBAJ	UV	IPC, TBA studie, léčiva	36
<i>p</i> -Aminosalicylová kyselina	RP 18	MeOH–fosfátový pufr, pH 7,7, TBAH	UV	IPC	37
Fenolické karboxylové kyseliny	fenyl	MeOH–voda–0,01 % CH ₃ COOH TEAJ	ESI-MS	IPC, vlákniny v potravinách	38

Přehled vybraných aplikací HPLC je uveden v tab. III (cit. ^{2,16–38}).

2.3. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) v poslední době nalezla široké uplatnění v analytické chemii, neboť je vhodná pro separaci mnoha typů sloučenin, včetně BKK. Poskytuje dobrou separaci v relativně krátkém čase, nevyžaduje složitou přípravu vzorku a spotřebuje jen omezené množství činidel, takže cena analýzy je většinou nižší než u chromatografických metod. Také proto se tato metoda široce používá pro analýzu komplexních směsí a separaci organických kyselin pocházejících z rostlinných a mikrobiálních materiálů. Ve srovnání s chromatografií však CE má určitá omezení: vzhledem k nízkým dávkovaným množstvím (řádově nl) je nutné používat citlivé detektory a spolehlivost výsledků bývá horší než v HPLC.

Pro separaci nabitých látek se používá kapilární zónová elektroforéza (CZE). Tato metoda umožňuje nejen identifikaci a kvantifikaci složek vzorku, ale také stanovení fyzikálně-chemických vlastností sloučenin, např. disociačních konstant BKK.

Separaci BKK můžeme ovlivnit řadou faktorů, jako je pH, typ a koncentrace pufru a použité separační napětí. Podobně jako v HPLC i zde je dominantní vliv pH. V alkalickém prostředí se BKK stanovují jako anionty. Dalším z faktorů, které ovlivňují separaci, jsou organická rozpouštědla, jež se používají jako modifikátory v nosných elektrolytech. Tato rozpouštědla ovlivňují pohyblivost analytů snížením polaritativy pufru, mohou zlepšit selektivitu, a tím zvýšit pravděpodobnost jejich identifikace. Mají však také vliv na povahu povrchu křemenné kapiláry a ovlivňují tak pK_a ionizovaných silanolových skupin na stěně kapiláry a molekul solutu. Kromě toho ještě mohou změnit gradient elektrického pole změnou vodivosti elektrolytu.

K separaci neutrálních látek (např. při potlačení disociace BKK v kyselém prostředí) se hodí micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC), při které se do nosného elektrolytu přidávají ionické tenzidy vytvářející v roztoku nabitě micely, které interagují s neutrálními látkami a migrují charakteristickými rychlostmi. Nejčastěji se používá dodecylsulfát sodný (SDS). MEKC na bázi cetyltrimethylammonium-bromidu (CTAB) byla použita pro separaci BKK ve vzorcích rostlinných materiálů a byla shledána dostatečně účinnou a ne-

Tabulka IV
 Příklady aplikací CZE a MEKC

Analyt	Matrice	Předběžná úprava vzorku	Separáčnı́ způsob: elektrolyt	Separáčnı́ a detekčnı́ podmínky	Cit.
Homovanilová, vanilylmandlová, homogentisová kyselina	moč	přímé dávkování	CZE: 300 mM borátový pufr, pH 8,5	$L_T = 64,5$ cm, $L_D = 56$ cm, 50 μ m, 30 kV, 200 nm	39
Hippurová, <i>p</i> -hydroxyhippurová kyselina	sérum	ultrafiltrace a ředění	CZE: 10 mM acetátový pufr, pH 3,8 nebo 10 mM MES, pH 6,1	$L_D = 15$ cm při pH 3,8 nebo 25 cm při pH 6,1, 200 μ m, PTFE, 254 nm	40
Hippurová kyselina	sérum	ultrafiltrace	CZE: 150 mM borátový pufr, pH 9,0	$L_T = 64$ cm, $L_D = 55,8$ cm, 50 μ m, 22 kV, 25 $^{\circ}$ C, 210 nm	41
Hippurová kyselina	sérum	ultrafiltrace	CZE: 150 mM borátový pufr, pH 9,0; MEKC: 20 mM borát, 80 mM SDS, pH 9,0	$L_T = 80,5$ cm, $L_D = 72$ cm, 50 μ m, 24 kV (CZE) nebo 22 kV (MEKC), 25 $^{\circ}$ C, 210 nm	42
Hippurová, <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -methylhippurová kyselina	moč	srážení bílkovin acetonem a ultrafiltrace	MEKC: 20 mM fosfátový pufr, pH 8,0; 10 mM DTAB, 4 M močovina	$L_T = 67$ cm, $L_D = 47$ cm, 50 μ m, -22 kV, 30 $^{\circ}$ C, 224 nm	43
Hippurová kyselina, tryptofan	moč	přímé dávkování	MEKC: 30 mM borát, pH 10, 75 mM SDS, 10 mM β -CD	$L_T = 44$ cm, $L_D = 37$ cm, 75 μ m, 20 kV, 195 nm	44
Salicylová kyselina	sérum moč	přímé dávkování, ředění (moč), ultrafiltrace (sérum)	MEKC: 75 mM SDS, borátový-fosfátový pufr, pH 9,1; CZE: 33 mM fosfát, pH 8,3	$L_T = 90$ cm, $L_D = 70$ cm, 75 μ m, 20 kV, DAD 195 až 320 nm	45
Salicylová kyselina	sérum	promytı́ a následné přímé dávkování	MEKC: 60 mM borát, pH 10, 200 mM SDS	$L_T = 42,5$ cm, $L_D = 34,5$ cm, 50 μ m, 10 kV, 25 $^{\circ}$ C, 200 nm	46
Naproxen, salicylová kyselina	sérum moč	přímé dávkování nebo ředění (moč)	MEKC: borátový-fosfátový pufr, pH 9,2; 75 mM SDS	$L_T = 70$ cm, $L_D = 50$ cm, 75 μ m, 20 kV, absorbance při 220 nm, fluorescence (ex = 220 nm, em = 340 nm)	47
Naproxen	sérum	přímé dávkování ultrafiltrace	MEKC: borátový-fosfátový pufr, pH 9,1; 75–200 mM SDS	$L_T = 65$ cm, $L_D = 75$ cm, 75 μ m, 25 kV, 35 $^{\circ}$ C, 215 nebo 240 nm	48
(4-Fluorbenzoyl)propanová kyselina, (4-fluorofenyl)octová kyselina	moč	SPE	CZE: 50 mM octan amonny, 10 % metanol, 1 % ledová kys. octová, pH 4,1	$L_D = 65$ cm, 50 μ m, 30 kV, 25 $^{\circ}$ C, 214 nm	49
D,L-mandlová kyselina	–	–	CZE: 40 mM γ -CD, 50 mM fosfát, pH 7,0	$L_T = 50$ cm, $L_D = 45,4$ cm, 50 μ m, 20 kV, 20 $^{\circ}$ C, 206 nm	50
D,L-tryptofan a D,L-DOPA	–	–	CZE: 30 mM crown-6-tetra-karboxylová kyselina, pH 2,2	254 nm	51

nákladnou. Ve srovnání s CZE se MEKC vyznačuje vyšší selektivitou. Aplikace kapilární elektrochromatografie (CEC), při níž je kapilára naplněna některou ze stacionárních fází používaných v HPLC, avšak pohyb mobilní fáze je elektroosmotický, nikoli mechanický, lze rovněž nalézt v odborné literatuře. Mezi nejběžnější detekci v CE patří UV spektrofotometrická detekce. Často se využívá fluorescence buzená laserem. Velice významná je i kombinace CE s hmotnostní spektrometrií (CE-MS) nebo s voltametrickou detekcí.

Příklady použití CZE a MEKC pro analýzu BKK jsou uvedeny v tab. IV (cit. ³⁹⁻⁵¹).

2.4. Chirálnı́ separace

Chirálnı́ separace jsou velmi důležitě, neboť enantiomery

se liší biologickou aktivitou. Pro chirální separace lze využít tři postupy. *a*) Derivatizací převést optické izomery na diastereoizomery a následně je separovat na opticky neaktivní stacionární fázi v HPLC nebo v neaktivním nosném elektrolytu v CE, *b*) použít chirální mobilní fáze v kombinaci s opticky neaktivní stacionární fází pro HPLC či přidat chirální činidlo do nosného elektrolytu v CE, *c*) k separaci využít chirální stacionární fázi, a to jak v GC, tak v HPLC a v elektrochromatografii.

Metoda *a*) se využívá v HPLC a CE v případech, kdy látky vykazují nízkou absorbanci v UV oblasti (např. u nízkomolekulárních alifatických kyselin). Příprava derivátů je poměrně komplikovaná a pro BKK se používá jen ojediněle.

Postup *b*) je velmi jednoduchý a snadný. Využívá se jak v HPLC, tak v CE. Jako chirální selektory se nejčastěji použí-

Tabulka V
Příklady chirálních aplikací v HPLC

Analyty	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Detekce	Cit.
Hydroxy- a methoxybenzenkarboxylové a indolkarboxylové kyseliny	Separon SiC18	β -CD v MeOH–0,01 M fosfátový pufr	UV	52
Benzenkarboxylové kyseliny	Cyclobond I (β -CD)	MeOH–0,01 M fosfát, pH 2,2–6,5	UV nepř	53
MethylDOPA	ODS	HSA	UV	54
DOPA	ODS	L-prolin + ion kovu	ECD	55
DOPA	ODS	L-fenylalanin + ion kovu	UV	56
		(<i>R</i>)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylpropan–1,2-diamin + ion kovu		
Benzenkarboxylové kyseliny	diol	chinin	UV nepř	57
Mandlová a tropová kyselina, baklofen	β -CD	0,1 M fosfát, pH 4,2 nebo 6,2–ACN (65 + 35)	UV	58
Aromatické karboxylové kyseliny	β -CD	0,1 M fosfát, pH 4,2–ACN (65 + 35)		59
Citronellová, benzenkarboxylové kyseliny	ergolinový derivát	0,05 M acetát-methanol	UV	60
Mandlová, fenylctová a další kyseliny	polysacharid	hexan–propanol-2–TFA (80 + 20 + 1)		61
Levodopa, methylodopa, karbidopa	glykopeptid (teikoplanin)	MeOH–voda, trimethylamin, CH ₃ COOH	UV	62

vají cykloextriny (CD), které vytvářejí s analyty, zejména s BKK, které obsahují hydroxy a amino skupiny, inkluzní sloučeniny. CD jsou cyklické oligosacharidy vystavěné z D-(+)-glukopyranosových jednotek, které jsou vázány α -(1 \rightarrow 4)-vazbami. Přírodní CD (α -, β - a γ -) sice řeší mnoho separačních problémů, avšak selektivitu a rozsah použití lze značně zvýšit použitím syntetických derivátů CD, neboť jsou lépe rozpustné ve vodě než přírodní CD. Kromě CD se používají jako chirální selektory též lidský sérový albumin, chinin, různé aminokyseliny v kombinaci s ionty kovů a řada dalších látek. Kapilární elektroforéza s CD se rovněž používá pro separaci izomerních BKK, tj. monokarboxylových (benzoová kyselina), dikarboxylových (ftalová, tereftalová a isoftalová kyselina) a trikarboxylových (trimesinová, hemimelitová a trimelitová kyselina) kyselin. K potlačení adsorpce cykloextrinů na stěnu kapiláry, která vede ke zhoršení účinnosti separace, se stěny kapiláry modifikují polymerními filmy. Podobně jako v HPLC se v CE jako chirálních selektorů používá celá řada dalších látek, např. hovězí sérový albumin, různá antibiotika a pod.

Nevýhodou použití metody *b*) v HPLC je vysoká spotřeba chirálních selektorů, které jsou vesměs velmi drahé. Tato nevýhoda odpadá v CE, kde potřebné množství nosného elektrolytu je nízké.

Metoda *c*) je v současné době nejběžnější v HPLC a GC. Využívá chirálních chemicky vázaných stacionárních fází (CSP), čímž odpadá hlavní nevýhoda metody *b*). Mezi nejběžnější patří chirální fáze s cykloextrinem a jeho deriváty. Dále se využívají chemicky vázané opticky aktivní deriváty aminokyselin. Pro separaci izomerů derivátů BKK byly testovány též CSP na bázi ergotalkaloidů, lidského sérového albuminu, polysacharidů, glykopeptidů (např. teicoplanin) atd. V plynové chromatografii lze využít pouze metodu *c*), separaci na chirální stacionární fázi. Komerčně dostupné fáze pro GC jsou založeny na derivátech CD (např. dimethyl-, permethyl-, propionyl-, butyryl-, dipentyl- a (hydroxypropyl)-CD) a L-valinu (pro separaci enantiomerů aminokyselin). Před vlastní GC separací je nutné BKK derivatizovat.

Příklady chirálních separací metodou HPLC jsou uvedeny v tab. V (cit.^{52–62}), metody CE jsou zahrnuty v tab. IV.

3. Závěr

Všechny diskutované separační metody, GC, HPLC a CE, umožňují účinnou separaci BKK v poměrně krátkém čase. HPLC a CE navíc nevyžadují složitou přípravu vzorku. GC je vhodná pro dostatečně těkavé a tepelně stálé látky, a proto lze BKK analyzovat touto metodou až po jejich derivatizaci. Z tohoto hlediska je pro analýzu aromatických karboxylových kyselin vhodnější HPLC nebo CE. GC však přesto má své výhody ve vysoké účinnosti dělení, vysoké citlivosti detekce, instrumentální jednoduchosti a nižší nákladnosti. HPLC nabízí široké spektrum možností při volbě separačního systému, dobrou selektivitu a spolehlivost výsledků, je však časově i finančně náročnější. Kapilární elektroforéza je nejrychlejší a nejlevnější, je však prozatím méně spolehlivá. Analytická výkonnost se podstatně zvýší, jsou-li GC, HPLC či CE kombinovány s hmotnostní detekcí, přičemž z technického i finančního hlediska je nejvýhodnější GC-MS, následována CE-MS a konečně HPLC-MS.

LITERATURA

1. Wurst M., Jurková M., Zonchová Z., Komers R.: J. Chromatogr. 291, 145 (1984).
2. Jurková M., Wurst M.: J. Chromatogr. 446, 117 (1988).
3. Waksmondzka-Hajnos M.: J. Chromatogr., B 717, 93 (1998).
4. Vande Castele K., de Pooter H., van Sumere C. F.: J. Chromatogr. 121, 49 (1976).
5. Ehman J., Gaucher G. M.: J. Chromatogr. 132, 17 (1977).
6. Matsumoto G., Hanya T.: J. Chromatogr. 193, 89 (1980).
7. Lehtonen K., Ketola M.: J. Chromatogr. 370, 465 (1986).

8. Luczak S., Swiatek L., Daniewski M.: *Acta Pol. Pharm.* 46, 381 (1989).
9. Linhart I., Novak J.: *J. Chromatogr.* 530, 284 (1990).
10. Reifenrath W. G., Hawkins G. S., Kurtz M. S.: *J. Pharm. Sci.* 80, 526 (1991).
11. Christov R., Bankova V.: *J. Chromatogr.* 623, 182 (1992).
12. Hušek P.: *Chromatographia* 34, 621 (1992).
13. Heimler D., Pieroni A.: *Chromatographia* 38, 475 (1994).
14. Packert M., Steinhart H.: *J. Chromatogr. Sci.* 33, 631 (1995).
15. Mejanelle P., Bleton J., Goursaud S., Tchaplá G. A.: *J. Chromatogr.*, A 767, 177 (1997).
16. Pussayanawin V., Wetzel D. L.: *J. Chromatogr.* 391, 243 (1987).
17. Oszmianski J., Ramos T., Bourzeix M.: *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 259 (1988).
18. Galletti G. C., Piccaglia R., Conciallini V.: *J. Chromatogr.* 507, 439 (1990).
19. Gudej J., Bieganowska J.: *J. Liq. Chromatogr.* 13, 4081 (1990).
20. Das D. K., Cordis G. A., Rao P. S., Liu X. K., Maity S.: *J. Chromatogr.* 536, 273 (1991).
21. Tan H. S., Manning M. A., Hahn M. K., Tan H. G., Kotagal U. R.: *J. Chromatogr.* 568, 145 (1991).
22. Chamkasem N., Hill K. D., Sewell G. W.: *J. Chromatogr.* 587, 185 (1991).
23. Lucarelli C., Pelloso R., Brunno G., La-Rosa C., Belliardo F.: *J. Chromatogr.* 573, 150 (1992).
24. Hannisdal A.: *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 194, 517 (1992).
25. Jimidar M., Hamoir T. P., Foriers A., Massart D. L.: *J. Chromatogr.* 636, 179 (1993).
26. Gao L., Mazza G.: *J. Agric. Food Chem.* 42, 118 (1994).
27. Amarowicz R., Shahidi F.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 551 (1994).
28. Kasuya F., Igarashi K., Fukui M.: *J. Chromatogr.*, A 684, 93 (1994).
29. Amin M. R., Tomita Y., Onodera R.: *J. Chromatogr.*, B 663, 201 (1995).
30. Maillard M. N., Berset C.: *J. Agric. Food Chem.* 43, 1789 (1995).
31. Betessaura C., Andreslacueve C., Lamuelaraventos R. M.: *J. Agric. Food Chem.* 44, 3040 (1996).
32. Glowniak K., Zgórká G., Kozyra M.: *J. Chromatogr.*, A 730, 25 (1996).
33. Pietta P. G., Gardena C., Mauri P. L., Maffei-Facino R., Carini M.: *J. Chromatogr.* 673, 75 (1995).
34. Pietta P. G., Gardena C., Mauri P. L.: *J. Chromatogr.*, B 693, 249 (1997).
35. Tilly-Melin A., Askemark Y., Wahlund K. G., Schill G.: *Anal. Chem.* 51, 976 (1979).
36. Tilly-Melin A., Ljungcrantz M., Schill G.: *J. Chromatogr.* 185, 225 (1979).
37. Martin C. J., Saxena S. J.: *J. Chromatogr. Sci.* 18, 1459 (1980).
38. Gioacchini A. M., Roda A., Galletti G. C., Bocchini P., Manetta A. Ch., Baraldini M.: *J. Chromatogr.*, A 730, 31 (1996).
39. Englstoen K. B. P., Jellum E.: *Electrophoresis* 18, 1857 (1997).
40. Schoots A. C., Verheggen T. P. E. M., De Vries P. M. J. M., Everaerts F. M.: *Clin. Chem.* 36, 435 (1990).
41. Petucci C. J., Kantes H. L., Strein T. G., Veening H.: *J. Chromatogr.*, B 668, 241 (1995).
42. Tran T. C., Huq T. A., Kantes H. L., Crane J. N., Strein T. G.: *J. Chromatogr.*, B 690, 35 (1997).
43. Lee K.-J., Lee J. J., Moon D. C.: *Electrophoresis* 15, 98 (1994).
44. Alfazema L. N., Hows M. E. P., Howells S., Perrett D.: *Electrophoresis* 18, 1847 (1997).
45. Caslavská J., Lienhard S., Thormann W.: *J. Chromatogr.* 638, 335 (1993).
46. Kunkel A., Günter S., Wätzig H.: *J. Chromatogr.*, A 768, 125 (1997).
47. Caslavská J., Gassmann E., Thormann W.: *J. Chromatogr.*, A 709, 147 (1995).
48. Schmutz A., Thormann W.: *Electrophoresis* 15, 51 (1994).
49. Tomlinson A. J., Benson L. M., Johnson K. L., Naylor S.: *Electrophoresis* 15, 62 (1994).
50. Valkó I. E., Billiet H. A. H., Frank J., Luyben K. Ch. A. M.: *Chromatographia* 38, 730 (1994).
51. Maman O., Marseille F., Guillet B., Disnar J.-R., Morin P.: *J. Chromatogr.*, A 755, 89 (1996).
52. Bažant L., Wurst M., Smolková-Keulemansová E.: *J. Chromatogr.* 445, 337 (1988).
53. Petterson C., Schell G.: *J. Liq. Chromatogr.* 9, 269 (1986).
54. Oerlich E., Preusch H., Wilhelm E.: *J. High Resolut. Chromatogr.* 3, 269 (1980).
55. Aso Y., Yoshioko S., Shibazaki T., Uchiyama M.: *Bunseki Kagaku* 35, 314 (1986).
56. Kurganov A., Darankov V.: *J. Chromatogr.* 218, 559 (1981).
57. Petterson C., No K.: *J. Chromatogr.* 282, 671 (1983).
58. Feitsma K. G., Bosman J., Drenth B. F. H., De Zeeuw R. A.: *J. Chromatogr.* 333, 59 (1985).
59. Feitsma K. G., Drenth B. F. H., De Zeeuw R. A.: *J. High Resol. Chromatogr.* 7, 147 (1984).
60. Sinibaldi M., Flieger M., Cvak L., Messina A., Pichini A.: *J. Chromatogr.* 666, 471 (1994).
61. Okamoto Y., Aburatani R., Kanda Y., Hatada K.: *Chem. Lett.* 1988, 1125.
62. Doležalová M., Tkaczyková M.: *Chirality* 11, 394 (1999).

M. Wurst^a, V. Pacáková^b, and K. Štulík^b (^a*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^b*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Charles University, Prague*): **High-Performance Separation Methods in Analysis of Benzenecarboxylic Acids**

High-performance separation methods applied to the analysis of benzenecarboxylic acids are critically reviewed. Special attention is paid to gas and liquid chromatography and capillary electrophoresis. Numerous examples of applications are summarized in tables.