

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY
LÉČIV



DIPLOMOVÁ PRÁCE

VYUŽITÍ HPLC V ANALÝZE LÉČIV II.
Úprava separačních podmínek vitamínů H, B12 a kyseliny listové
pro spojení HPLC s elektrochemickým detektorem

V Hradci Králové 2008
Vedoucí diplomové práce

Petra Holásková
PharmDr. Radim Kučera, Ph. D.

„Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.”

Petra Holásková

Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph. D. za odborné vedení, trpělivost a pomoc při vypracování diplomové práce. Dále bych ráda vyjádřila své díky všem pracovníkům katedry za ochotu a pomoc.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	CÍL PRÁCE.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	PŘEHLED STUDOVANÝCH LÁTEK.....	12
3.2	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)	15
3.2.1	Součásti kapalinového chromatografu.....	17
3.3	STAVBA ELEKTROCHEMICKÉHO DETEKTORU	24
3.3.1	Pracovní elektroda.....	25
3.3.2	Referenční elektroda.....	25
3.3.3	Pomocná elektroda	26
3.3.4	Dvouelektrodové detekční cely.....	26
3.4	VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÉHO DETEKTORU V ANALÝZE LÉČIV ..	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
4.1	CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	31
4.1.1	Chemikálie	31
4.1.2	Přístroje	31
4.1.3	Další pomůcky.....	31
4.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A MOBILNÍ FÁZE.....	32
4.2.1	Roztoky.....	32
4.2.2	Mobilní fáze	35
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
5.1	HLEDÁNÍ OPTIMÁLNÍHO SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE.....	40
5.2	VLIV ZMĚNY pH NA CELKOVOU SEPARACI.....	56
5.3	VLIV ZMĚNY TYPU, KONCENTRACE A pH PUFRU.....	57
5.4	VLIV ZMĚNY NAPĚTÍ VLOŽENÉHO NA PRACOVNÍ ELEKTRODY.....	61
5.5	POKUSNÁ ZKOUŠKA IZOLACE VITAMÍNŮ Z VYBRANÝCH VITAMÍNOVÝCH PŘÍPRAVKŮ	62
6	ZÁVĚR.....	64
7	ABSTRAKT	66
8	ABSTRACT	68
9	POUŽITÁ LITERATURA.....	70

1 ÚVOD

Vitamíny jsou esenciální látky, které spolu s bílkovinami, tuky a sacharidy patří k základním složkám lidské stravy. V lidském organismu mají funkci katalyzátorů biochemických reakcí, tudíž hrají významnou úlohu při procesech vstřebávání a výměny látek mezi vnějším prostředím a živým organismem. Podporují fyziologické procesy v těle a mají i ochrannou funkci. Nedostatek vitamínů způsobuje malou odolnost vůči infekčním chorobám. Vzniklé stavy z nedostatku vitamínů označujeme též jako hypovitaminóza nebo avitaminóza.

Lidský organismus si vitamíny neumí sám vytvořit, proto je musí přijímat ve stravě jako vitamíny nebo provitamíny. Protože složení vitamínů je už známé, lze některé vyrábět synteticky.

Potřeba vitamínů je velmi nízká, jen několik miligramů či mikrogramů denně. Proto metody pro separaci či stanovení vitamínů např. z potravinových doplňků musí být vysoce citlivé. Mezi takové patří i vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).

Kapalinová chromatografie byla objevena roku 1903 ruským botanikem, fyziologem a biochemikem M.S.Cvětěm, který provedl experiment, při němž rozdělil chlorofyl na jeho složky - chlorofyl a, chlorofyl b a karotenoidy. Experiment spočíval v tom, že petroletherový extrakt chlorofylu nechal v kolonce protékat přes sloupec křemeliny (CaCO_3). Chlorofylový extrakt se při průchodu kolonkou rozdělil na jednotlivá barviva obsažená v chlorofylu a na kolonce se tak vytvořily jednotlivé barevné zóny viditelné okem. Cvět tuto metodu pojmenoval „chromatografie“ („barvopis“, řec. chroma = barva)¹.

Z uvedeného vyplývá, že kapalinová chromatografie je fyzikálně chemická separační metoda, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Je založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze, z nichž mobilní fází je kapalina, která prostupuje stacionární fází naplněnou do kolony².

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je v současné době jednou z nejprogressivnějších analytických metod. Nachází stále větší uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv. Jedná se o metodu plně automatizovanou a dobře reprodukovatelnou, kterou lze využít jak pro kvalitativní, tak kvantitativní analýzu. Ve srovnání s metodami bioanalytickými, které jsou také rozsáhle automatizované, rychlé a citlivé, má HPLC separace vyšší specifičnost a umožňuje současně stanovit jak analyzovanou látku, tak i její metabolity, popřípadě nečistoty. Velmi často se HPLC využívá nejen pro analýzu syntetických léčiv, ale též pro sloučeniny izolované z přírodních materiálů.

V metodě HPLC je dostupná řada různých detektorů, které se liší principem, konstrukcí, selektivitou, citlivostí a lineárním dynamickým rozsahem. Mezi používané detektory patří i detektor elektrochemický. Podmínkou použití těchto detektorů je, aby daný analyt podléhal elektrochemickým reakcím jako je oxidace a redukce. Můžeme je rozdělit na detektory konduktometrické, které pracují na principu měření vodivosti eluátu a amperometrické, které měří velikost elektrického náboje. Vzniklý signál je po zesílnění zaznamenán nejčastěji počítačem³.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vypracovat vhodné chromatografické podmínky pro separaci biotinu, vitamínu B12 a kyseliny listové s ohledem na elektrochemickou detekci.

Pozornost byla soustředěna především na

- složení mobilní fáze (vliv změny hodnoty potenciálu, pH, vliv koncentrace a následně i typu pufru)
- návrh možného extrakčního postupu, který by nejúčinněji oddělil analyty od balastních látek

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 PŘEHLED STUDOVANÝCH LÁTEK

Existuje 13 základních typů vitamínů. Jednotlivé vitamíny se označují velkými písmeny abecedy, přednost mají však názvy odvozené z jejich chemické struktury. Základním kritériem pro rozdělení vitamínů je jejich rozpustnost v lipidech a ve vodě. Mezi vitamíny rozpustné v tucích patří vitamín A, D, E, K. Ostatní vitamíny jako je vitamín C a vitamíny skupiny B jsou rozpustné ve vodě. Toto rozdělení nesouvisí s jejich biologickým účinkem.

3.1.1.1 BIOTIN (vitamín H)

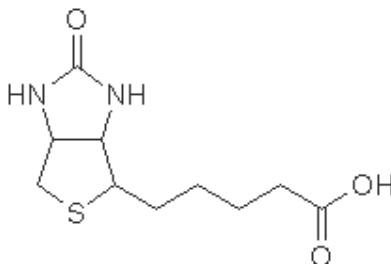
Biotin, neboli vitamín H, je členem skupiny B-vitamínů (viz obr. č. 1). Má životně důležitou úlohu v aktivitách různých enzymů. Zapojuje se do biosyntézy mastných kyselin, glukoneogeneze, výroby energie, metabolismu rozvětvených aminokyselinových řetězců (L-leucin, L-isoleucin, L-valin) a *de novo* syntézy purinových nukleotidů. Podle nejnovějších výzkumů biotin hraje roli při expresi genů na transkripční a translační úrovni a zřejmě se podílí na replikaci DNA⁴.

Biotin, objevený v r. 1935 jako růstový faktor kvasinek, je nezbytnou složkou lidské potravy. Jeho nedostatek v potravě je však vzácný, protože je přítomen v mnoha potravinách⁵. Absolutní množství biotinu v potravě je ovšem relativně nízké ve srovnání s ostatními vitamíny skupiny B. Dobrymi zdroji biotinu jsou vaječný žloutek, játra, ledviny, pankreas, mléko, sója a ječmen. Pivovarské kvasnice nebo mateří kašička, používané jako potravinové doplňky, jsou jedním z nejbohatších zdrojů biotinu i ostatních B vitamínů. Savci a četné rostlinné druhy jsou neschopné syntetizovat biotin, ale je syntetizován bakteriemi, kvasnicemi a jinými houbami, řasami a některými rostlinnými druhy. Také mikroflóra tlustého střeva člověka pravděpodobně pomáhá zásobit tělo biotinem⁶.

Nedostatek biotinu může nastat po dlouhodobém užívání vaječných bílků, protože bílek obsahuje bílkovinu avidin, která brání absorpci vitamínu ve střevě. Také dlouhodobá léčba antibakteriálními léčivy ze skupiny antibiotik a sulfonamidů zvyšuje riziko nedostatku, protože tato léčiva usmrcují střevní bakterie, které produkují biotin.

Nedostatek biotinu se projevuje slabostí, únavou, snížením chuti k jídlu, vypadáváním vlasů a depresí. Těžký nedostatek může vyvolat ekzém na tváři a zánět jazyka⁷.

Individuální denní dávka je stanovena na 300 mikrogramů. Organismem je lépe vstřebáván v kombinaci s dalšími vitamíny řady B – především B2, B3, B6⁶.



Obr. č. 1: Strukturální vzorec biotinu

3.1.1.2 VITAMÍN B12 (kyanokobalamin)

Vitamín B12 (viz obr.č. 2), člen skupiny vitamínů B, je poměrně složitá molekula. Základem je komplexní vazba centrálního atomu kobaltu se čtyřmi atomy dusíku pyrrolových jader, vázaných spolu do porfyrinového skeletu. Toto uspořádání je silně podobné molekule hemoglobinu, kde je centrálním atomem železo nebo chlorofylu s atomem hořčíku.

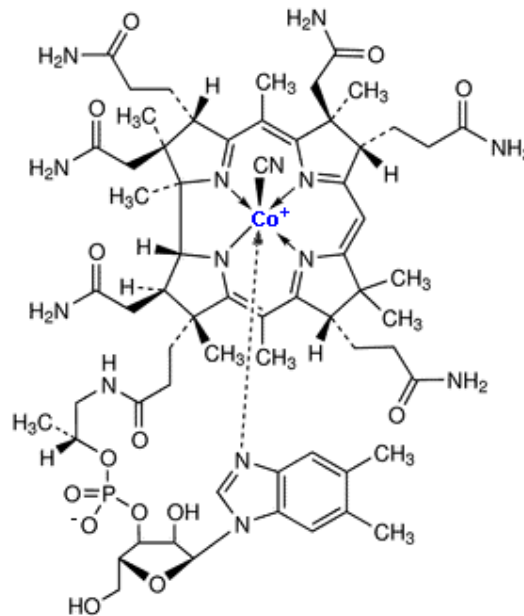
Je přítomen v důležitých orgánech jako jsou játra, v části tlustého střeva, spolu s kyselinou listovou působí při přeměně sacharidů v tuky a při jejich využití. Je též důležitý pro syntézu kyseliny nukleové a pro správnou funkci nervové soustavy, napomáhá množení červených krvinek, odstraňuje předmenstruační otoky, podporuje růst, působí proti bolestem a zánětům žil atd.

Vitamín B12 je obsažen v syrových zvířecích vnitřnostech jako jsou játra, ledviny, srdce, dále v sardinkách, makrele nebo v racích. V menším množství potom vitamín B12 nalezneme ve vejcích, vepřovém mase nebo mléce. V rostlinách se téměř nevyskytuje nebo jen v malém množství, proto bývá nedostatek tohoto vitamínu zaznamenán nejčastěji u vegetariánů.

Kyanokobalamin může být vstřebáván stěnami střev z potravy pouze tehdy, jestliže žaludek produkuje enzym nazývaný se „vnitřní faktor“. Nedostatek kobalaminu se

projevuje chudokrevností, hubnutím, zhoršováním paměti, duševní výkonnosti a svalové koordinace.

Denní dávka vitamínu B12 se pohybuje v rozmezí 3 – 5 mikrogramů. Terapeutické dávky nebo dávky v těhotenství jsou rozdílné⁶.



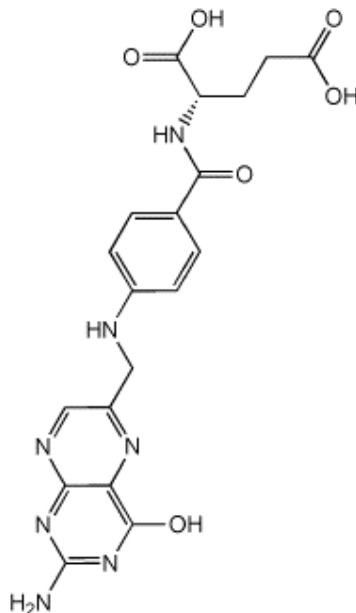
Obr. č. 2: Strukturální vzorec vitamínu B12

3.1.1.3 KYSELINA LISTOVÁ (kyselina folová, pteroylglutámová)

Kyselina listová (obr. č. 3) v organismu redukcí přechází na svou aktivní formu 5,6,7,8-tetrahydrofolát. Všechny její biologicky aktivní deriváty označujeme jako foláty.

Foláty patří do skupiny vitamínů B. Zúčastňují se syntézy a funkce DNA a RNA, což jsou základní složky nezbytné pro zajišťování životních funkcí. Podílejí se na tvorbě a udržování nových buněk a zvláště jsou důležité v období rychlého růstu v průběhu těhotenství a života malých dětí. Foláty potřebují dospělé osoby i děti pro tvorbu červených krvinek a k zabránění vzniku anémie. Nedostatek folátů rovněž souvisí se zvýšenou hladinou aminokyseliny homocysteinu v krvi, což je významný rizikový faktor pro vznik onemocnění srdce a mozkové mrtvice. Vzhledem k tomu, že zabráňují poškození DNA, mohou patrně snižovat i riziko vzniku některých druhů rakoviny, zvláště tlustého střeva.

Pro dospělou osobu je doporučován denní příjem 200 mg folátů. Potravní zdroje folátů zahrnují pomerančovou šťávu, tmavozelenou listovou zeleninu, arašídý, fazole a vnitřnosti⁶.



Obr. č. 3: Strukturální vzorec kyseliny listové

3.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC)

Mezi metodami kapalinové chromatografie zaujímá významné místo technika HPLC. Zkratka je odvozena od dvou přípustných názvů této techniky a to „high performance liquid chromatography“ (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) nebo „high pressure liquid chromatography“ (vysokotlaká kapalinová chromatografie). Mobilní fází je v tomto případě kapalina. Stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Přístroj, na kterém se provádí HPLC analýzy se nazývá kapalinový chromatograf.

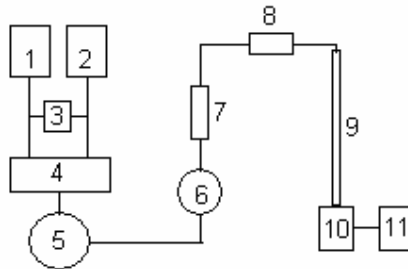
Aparaturou protéká mobilní fáze, která je ze zásobních lahví vedena přes vysokotlakou pumpu do kolony, z ní do detektoru a dále pak do odpadu. Dávkovačem je do proudu mobilní fáze nadávkován vzorek (1 - 500 μ l). Vzorek je unášen mobilní fází do kolony. Zde dochází k separaci jednotlivých složek. Výstup z kolony vede do detektoru,

kde jsou jednotlivé složky detekovány. Signál z detektoru je zaznamenáván pomocí PC a zobrazován v podobě chromatogramu.

Chromatogram je tvořen soustavou píků, které mají různou plochu a výšku, mají od sebe různou vzdálenost a v ideálním případě jsou symetrické a mají tvar Gaussovy křivky. Pokud je analyzovaná směs dobře rozdělena, pak každé složce směsi odpovídá jeden pík. Identifikační charakteristikou látky je za přesně stanovených chromatografických podmínek její retenční čas. Pro kvantitativní stanovení látky potom slouží výška píku nebo častěji plocha pod píkem⁸. Kvantitativní analýzu lze provést několika způsoby. Mezi nejpoužívanější patří metoda vnitřního standardu, kdy se ke zkoušenému a porovnávacímu roztoku přidají stejná množství látky, kterou lze odlišit od zkoušené látky a která s ní nereaguje (vnitřní standard). Koncentrace zkoušené látky se stanoví porovnáním poměru ploch píků nebo výšek píků stanovované látky a vnitřního standardu pro zkoušený roztok a odpovídajícího poměru pro porovnávací roztok². Dalším možným způsobem kvantifikace je využití metody vnějšího standardu. Koncentrace stanovované složky se určí porovnáním odezvy píku složky naměřené pro zkoušený roztok a odpovídající odezvy pro porovnávací roztok². Obecně přesnější je použití standardu vnitřního, protože tak probíhá analýza sledované látky i standardu za stejných podmínek.

Kvantifikace může být prováděna i pomocí dvou dalších lékopisných metod, a to metodou normalizace nebo kalibrace. Při normalizaci se obsah jedné či více složek zkoušené látky v procentech vypočítá z plochy nebo ploch jako procento celkové plochy všech píků, s výjimkou píků rozpouštědel nebo přidaných reakčních činidel a píků, které jsou v limitu zanedbatelnosti píků. Při kalibraci se stanoví vztah mezi měřeným nebo vyhodnocovaným signálem a množstvím stanovované látky a vypočítá se kalibrační funkce. Výsledky analýzy se vypočítají ze změřeného nebo vyhodnoceného signálu stanovované látky pomocí inverzní funkce².

3.2.1 Součásti kapalinového chromatografu



Obr. č. 4: Blokové schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf tvoří tyto hlavní části:

- 1,2 – zásobníky mobilní fáze
- 3 – programovací jednotka gradientu
- 4 – směšovač
- 5 – odplyňovač
- 6 – vysokotlaké čerpadlo
- 7 – dávkovací ventil
- 8– předkolona
- 9 – kolona
- 10 – detektor
- 11 – řídicí jednotka – počítač s chromatografickým softwarem

3.2.1.1 MOBILNÍ FÁZE

Při dělení směsi látek, jejichž pKa a lipofilita se příliš neliší, se používá izokratická eluce jedinou mobilní fází, jejíž složení se během chromatografie nemění. U některých směsí látek však nelze tímto způsobem dosáhnout optimálního dělení, zejména, jestliže se jednotlivé složky směsi svými elučními parametry významně liší. V tomto případě se s výhodou využívá gradientové eluce, při které se k jedné složce mobilní fáze plynule

přimíchává rostoucí množství druhé složky mobilní fáze s větším elučním účinkem. Vytváří se tak plynulý koncentrační gradient organické složky mobilní fáze.

Jako zásobníky mobilní fáze se obvykle používají skleněné uzavíratelné nádoby. Měli by být umístěné tak, aby byly dobře chráněny před světlem, otevřeným ohněm a prachem ve vzduchu.

Mobilní fáze musí být velmi čisté a zbavené rozpuštěných plynů probubláváním heliem nebo působením ultrazvuku. U novějších zařízení probíhá odplyňování přímo v přístroji⁹.

3.2.1.2 ČERPADLA

Čerpadla vedou mobilní fázi ze zásobníků na kolonu. Důležitá je jejich velká přesnost a dobrá reprodukovatelnost průtoku v celém rozsahu parciálních tlaků. Můžeme je rozdělit na pulzní a bezpulzní, dále na pístové a membránové. Pracují buď za konstantního tlaku nebo konstantního průtoku.

Vysokotlaká bezpulzní pumpa je velmi důležitou součástí HPLC aparatury. Kolony pro HPLC jsou plněny mikročásticemi, které při průchodu mobilní fáze kladou značný odpor. Z toho důvodu musí být mobilní fáze pod vysokým tlakem, až 60 Mpa, aby mohla projít přes kolonu. Dostatečný tlak a konstantní průtok mobilní fáze, v rozmezí 0,1 – 10 ml/min, zajišťuje právě vysokotlaká pumpa.

Čerpadla jsou obecně nejnáročnější součástí chromatografu⁹.

3.2.1.3 DÁVKOVAČ

Používají se pro dávkování vzorku do proudu mobilní fáze. U starších přístrojů jsme se mohli setkat s tzv. „stop flow“ dávkovači. Z moderních aparatur ale už úplně vymizely. V dnešní době se uplatňují dávkovače s šesticestnými ventily, které lze rozdělit na manuální, a plně automatizované, tzv. autosamplery.

3.2.1.4 KOLONY

Kolony pro HPLC jsou zpravidla ocelové, titanové nebo PEEKové trubice 5-30 cm dlouhé o vnitřním průměru 2-8 mm naplněné stacionární fází. S rozměrem kolon souvisí i její celková kapacita. Se čtvercem průměru kolony roste i množství vzorku, jímž můžeme kolonu zatížit. Délka kolony se odvíjí od velikosti zrn sorbentu. Čím menší je velikost zrn, tím kratší je kolona. Velikost zrn se dnes nejčastěji pohybuje v rozmezí 1,8-5 μm . Náplň kolony musí být naprosto homogenní a rovnoměrná, proto se dnes už používají kolony plněné a testované přímo výrobcem. Spojí mezi kolonou, dávkovacím zařízením a detektorem jsou kapilární (vnitřní průměr 0,5 mm), nejčastěji z nerez oceli. O schopnosti kolony separovat určité směsi na jednotlivé složky opět rozhoduje zejména typ stacionární fáze.

V HPLC se nejčastěji používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze zakotvené na silikagelovém nosiči. Připravují se reakcí silikagelu s chlorsilany nebo alkoxyasilany. Navázané mohou být dlouhé alkylové řetězce hydrofóbního charakteru (C_8 -oktan, C_{18} -oktadekan), které povrch nosiče hydrofobizují. Vzniká tak reverzní nepolární fáze. Takovéto provedení bývá označováno jako reverse phase HPLC (RP HPLC). Mobilní fáze v RP HPLC je pak charakteru polárního, např. voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Pokud není výrobcem uvedeno jinak, předpokládá se, že kolony na chromatografii s obrácenými fázemi s náplní na bázi silikagelu jsou stabilní v mobilních fázích o zdánlivém pH 2,0 až 8,0². Tato HPLC technika je již řadu let používána mnohem častěji než normální HPLC. Nebo mohou být navázány kratší C_2 , C_3 řetězce obsahující polární funkční skupinu (-CN, -OH, $-\text{NH}_2$), kde se pak jedná o fázi středně polární.

Jako HPLC sorbenty se rovněž používají silikagel a oxid hlinitý (polární sorbenty), i když daleko méně než chemicky vázané stacionární fáze. Pro potřeby iontově výměnné chromatografie se jako sorbenty používají vhodné ionexy, což jsou makromolekulární matrice obsahující kyselé nebo bazické funkční skupiny. Můžeme je rozdělit na kationtové, tzv. katexy (např. $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$) a aniontové, tzv. anexy ($-\text{NR}_4^+$, $-\text{NH}_2$)

V současné době jsou již běžně komerčně dostupné různé typy chirálních stacionárních fází umožňující chromatografickou analýzu enantiomerů léčiv¹⁰.

3.2.1.5 DETEKTORY

V metodě HPLC je dostupná řada různých detektorů, které se liší principem funkce, konstrukcí, selektivitou, citlivostí a lineárním dynamickým rozsahem. Metoda HPLC využívá tyto typy detektorů: spektrofotometrický detektor (UV-VIS), fluorescenční detektor, hmotnostní spektrometr, refraktometrický detektor, elektrochemický a další. Volba detektoru opět závisí na konkrétní aplikaci³.

Na detektory pro HPLC jsou kladeny mimořádné požadavky:

- vysoká citlivost
- reprodukovatelnost a linearita odezvy
- nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci
- univerzálnost⁹

3.2.1.5.1 Spektrofotometrický detektor

Spektrofotometrický detektor je nejčastěji používaný při HPLC analýze léčiv. Proměňuje absorbanci elektromagnetického záření určité vlnové délky složkami eluátu protékajícího celou detektorem. K detekci léčiv se využívá především UV oblast spektra (200 – 400 nm), mnohem méně oblast viditelná (400 – 800 nm). Z uvedeného vyplývá selektivita detektoru. Zaznamenává pouze látky schopné absorbovat v uvedených oblastech spektra. V praxi se uplatňují především UV detektory, eventuelně UV-VIS detektory.

Minimální detekovatelné množství UV detektoru je 10^{-10} g/ml. Rozlišujeme UV detektor s fixní vlnovou délkou (nejčastěji 254 nm nebo 280 nm, při nichž absorbuje většina léčiv), který se v dnešní době už příliš nepoužívá. Mnohem častěji se využívají detektory s proměnnou vlnovou délkou (možnost libovolného nastavení vlnové délky), dále scanning UV detektory, které snímají během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva¹⁰.

Nejvíce informací lze získat spektrofotometrem s diodovým polem (diode array) řízeným počítačem a snímajícím celé absorpční spektrum eluátu. Výsledkem je trojrozměrný chromatogram jako závislost absorbance na vlnové délce a na čase, ze kterého lze rychle identifikovat eluované látky a posoudit jejich čistotu⁹.

3.2.1.5.2 Fluorimetrický detektor

Fluorimetrické detektory jsou s výhodou použitelné v případech, kdy analyzované léčivo (rozkladný produkt nebo metabolit) vykazuje fluorescenci. Látky, které nefluoreskují, lze mnohdy derivatizací s vhodnými činidly převést na fluoreskující deriváty. Fluorimetrické detektory jsou tedy méně univerzální než UV detektory, ale citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g/ml), selektivnější a jsou rovněž použitelné při gradientové eluci¹⁰.

3.2.1.5.3 Refraktometrický detektor

Refraktometrický detektor registrující změny indexu lomu mezi mobilní fází a eluátem vytékajícím z kolony je sice univerzální, ale málo citlivý (10^{-6} g/ml) a vyžaduje oproti ostatním detektorům velmi pečlivé termostatování. Nelze je využít při gradientní eluci^{9, 10}.

3.2.1.5.4 Hmotnostní detektor

Pro detekci léčiv je v poslední době využíváno též spojení HPLC s hmotnostním spektrometrem. Po výstupu z HPLC kolony jsou molekuly léčiva v plynném stavu v hmotnostním spektrometru ionizovány jednou z ionizačních technik. Pro HPLC má dnes největší význam ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo fotoionizace (APPI). Dále dochází k rozlišení podle poměru hmotnosti a náboje a následnému zaznamenání relativních intenzit jednotlivých iontů. Nabité částice jsou v magnetickém nebo vysokofrekvenčním poli separovány podle poměru hmotnosti a náboje a následně jsou zaznamenány relativní intenzity jednotlivých iontů v podobě hmotnostního spektra. Spojení HPLC a MS je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů potřebných pro identifikaci léčiv. Hmotnostní detektory jsou finančně náročnější než ostatní detektory¹⁰.

3.2.1.5.5 Elektrochemický detektor

Elektrochemické detektory běžně užívané pro HPLC můžeme rozdělit na amperometrické, které přímo měří vzniklý proud a konduktometrické, které se využívají hlavně pro chromatografii iontově-výměnou. Amperometrický detektor se ve své citlivosti a selektivitě podobá detektoru fluorimetrickému. Obecně vzato, fluorimetrické detektory jsou obvykle více selektivní, amperometrické více citlivé.

Sloučeniny, které chceme měřit pomocí amperometrického detektoru, musí vykazovat elektrochemickou aktivitu. Avšak v dnešní době existuje řada dobře prostudovaných derivatizačních činidel a procesů, které dokáží změnit elektrochemicky neaktivní sloučeniny na aktivní. Dokonce je možné použít chemicky modifikované elektrody, které mohou detekovat elektrochemicky neaktivní analyty, jako jsou bílkoviny a jiné biopolymery.

Ve všech případech kapalinové chromatografie s využitím elektrochemické detekce je měřen elektrický proud, který je vytvářen tzv. pracovní elektrodou. Obvykle je na pracovní elektrodě nastaven fixní potenciál. Výběrem vhodného fixního potenciálu můžeme nastavit selektivitu elektrochemické detekce. Po umístění elektrody do proudu mobilní fáze se na chromatogramu vytvoří tzv. šum. Je způsobený oxidovatelnými popř. redukovatelnými složkami mobilní fáze. Studovaný analyt je po té na chromatogramu zobrazen jako pík.

Jak už bylo zmíněno, elektrochemická detekce může být provedena buď v oxidačním nebo redukčním režimu. Vše se odvíjí od molekulové struktury daného analytu. Oxidační detekce je daleko více běžná a jednodušší. Detekce v redukčním režimu se potýká často se slabou odezvou, která může být způsobená obsahem rozpuštěného kyslíku v roztoku. Proto je důležité používané roztoky dobře odplynit.

Mezi látky podléhající oxidaci patří:

- Fenoly
- Oximy
- Dihydroxysloučeniny
- Peroxidové sloučeniny
- Hydroxyperoxidové sloučeniny
- Aromatické aminy, diaminy
- Puriny

Mezi látky podléhající redukci patří:

- Ketony
- Aldehydy
- Oximy
- Konjugované kyseliny
- Konjugované estery
- Konjugované nitrily
- Aktivované halogeny
- Aromatické halogeny
- Nitrosloúčeniny

Velikost odezvy detektoru závisí především na struktuře molekuly a koncentraci daného analytu, dále také na velikosti nastaveného potenciálu. Je též ovlivnitelná teplotou, pH mobilní fáze, rychlostí toku. Čím menší potenciál nastavíme, tím nastane menší oxidace (redukce), což se následně projeví menší odezvou. V neposlední řadě záleží též na materiálu, ze kterého je vyrobena pracovní elektroda. Nejčastěji se setkáme s uhlíkovou, na které může probíhat oxidace i redukce. Ta se například využívá pro coulometrické elektrochemické detektory. Většina pracovních elektrod je ze skleněného uhlíku, které jsou vysoce odolné proti organickým rozpouštědlům. Dále existují elektrody rtuťové, amalgámové nebo i zlaté, která se často používá pro pulzní amperometrickou detekci.

Jako referenční elektrody se využívají elektrody argentochloridové (Ag/AgCl), jako pomocné potom nejčastěji nerezové ocelové³.

Základní vztah, který popisuje elektrochemické děje, je Nernstova rovnice. Rovnice definuje vztah mezi potenciálem kovové elektrody a aktivitou jejích iontů v roztoku u jejího povrchu. Obecně poskytuje informaci o vlivu koncentrací složek reakce na redox-potenciál pro libovolný redox-pár. Je-li znám E^0 tohoto systému (např. z elektrochemické řady napětí), je možno z Nernstovy rovnice vypočítat redox-potenciál pro libovolnou koncentraci.

$$E = E_0 - (RT/zF) \ln (a_{\text{red}})/(a_{\text{ox}})$$

- E – elektrický potenciál elektrody
E⁰ – standartní redoxní potenciál
R – molární plynová konstanta (8,314 J/K/mol)
T - teplota v Kelvinech
z – počet vyměněných elektronů
F – Faradayova konstanta (96485 C/mol)
a – aktivita oxidované nebo redukované formy

Při teplotě 25 °C můžeme Nernstovu rovnici vyjádřit:

$$E = E_0 - 0,0592/z \log [(a_{\text{red}})/(a_{\text{ox}})]$$

U zředěných roztoků se místo aktivity dosazuje relativní látková koncentrace.

Amperometrické senzory poskytují jako signál proud vzniklý elektrochemickou reakcí při konstantním napětí pracovní elektrody. Ten je úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Tyto detektory vynikají rychlou odezvou a vyšší citlivostí, selektivita je pak řízena redox potenciálem analyzovaných látek přítomných ve vzorku¹¹.

3.3 STAVBA ELEKTROCHEMICKÉHO DETEKTORU

Většina komerčně dostupných elektrochemických detektorů využívá tři elektrod: pracovní, pomocnou a referenční. Nejběžnější provedení je umístění pomocné elektrody přímo naproti elektrody pracovní, mezi nimiž je nastaven fixní rozdíl elektrochemického potenciálu. Tento potenciál řídí elektrochemickou reakci na povrchu pracovní elektrody. Proud vzniklý elektrochemickou reakcí na pracovní elektrodě je porovnáván s proudem proudícím opačným směrem na elektrodě pomocné. Referenční elektroda slouží jako srovnávací bod pro redoxní pár. V průběhu elektrochemické reakce dojde k zesílení proudu, což se na záznamu projeví jako pík.

Proud měřený na pracovní elektrodě nepochází pouze z redoxní reakce, která nás zajímá, ale také z nechtěných redoxních reakcí probíhajících v mobilní fázi nebo pocházející z materiálu, z něhož je pracovní elektroda vyrobena. Proto je důležitá pečlivá příprava mobilní fáze, správný výběr materiálu pro pracovní elektrodu a celková čistota HPLC systému.

3.3.1 Pracovní elektroda

Nejběžnějším materiálem pro pracovní elektrodu je uhlík, a to v podobě uhlíku skleněného, pyrolytického, uhlíkové pasty nebo porézního grafitu. Jinými vhodnými materiály mohou být platina, zlato, stříbro, rtuť a jejich sloučeniny. Výběr optimálního materiálu pro pracovní elektrodu závisí na mnoha faktorech, mezi které můžeme zahrnout velikost rozsahu použitého potenciálu, účast elektrody na redoxní reakci, celkovou kinetiku elektrochemické reakce spojenou s přenosem elektronu. Jiným faktorem může být i volba složení mobilní fáze, která také hraje důležitou roli.

Například pro analýzu peroxidů je výhodnější užití elektrody platinové než uhlíkové, protože elektrochemická reakce je více účinná a probíhá příznivější kinetikou. Taktéž elektrody z karbonové pasty nemohou být použity tehdy, pokud mobilní fáze obsahuje vysoké množství organických modifikátorů. Došlo by k rozpuštění elektrody.

Výkonost pracovní elektrody ovlivňují taktéž podmínky, za kterých je elektroda vyrobena. Důležitý je také pečlivý výběr zdroje materiálu pro uhlíkovou elektrodu. Co se týče elektrod z porézního grafitu, jsou vysoké požadavky na velikost pórů, musí být menší než 1 μm . Neméně důležitým požadavkem je jejich stejnoměrnost.

3.3.2 Referenční elektroda

Oxidační nebo redukční síla pracovní elektrody je posuzována pomocí referenční elektrody. Referenční elektroda vytváří tzv. stabilní potenciál, který slouží jako porovnávací bod pro měření nebo nastavení potenciálu pracovní elektrody. Potenciál referenční elektrody se udržuje na stálé hodnotě díky tomu, že tato elektroda je konstrukčně uspořádána tak, aby se její chemické složení během měření neměnilo (vlastní roztok oddělený od zbytku článku fritou). Jako referenční (srovnávací) elektrody se využívá elektrody vodíkové, argenochloridové nebo kalomelové.

V elektrochemii je daleko nejznámější standardní vodíková elektroda, pomocí níž byla stanovena a tabelována řada standardních redoxních potenciálů mnoha látek. Tato elektroda se ale pro HPLC-ECD ukázala jako nepraktická a proto se v současnosti často nevyužívá.

Argenochloridová elektroda je tzv. „mokrý“ elektroda, která je vytvořena z kovu uloženého do roztoku jeho solí. Obvykle je umístěna po proudu naproti elektrody pracovní

a je v kontaktu s mobilní fází přes mikroporézní keramickou zátku. Ačkoliv její využití je praktičtější než u standardní vodíkové elektrody, vyžaduje vzdálenější umístění od pracovní elektrody, což může často vést k několikanásobnému stykovému potenciálu a následně k nepřiměřenému šumu, nestabilitě aplikovaného potenciálu a nelineární odezvě. Elektroda vyžaduje běžnou údržbu, je fotosenzitivní, může být snadno poškozena sulfidy nebo jinými anionty. Taktéž může dojít k ucpání mikroporézní zátky.

Podobnou elektrodou elektrodě argentschloridové je kalomelová. Stavba kalomelové elektrody je však více složitá a postihují ji podobné problémy jako elektrodu argentschloridovou. Navíc použité soli při výrobě jsou daleko toxičtější. Obě elektrody, jak argentschloridová, tak kalomelová, pracují při relativně nízkých tlacích, proto musí být v systému HPLC umístěny až za kolonou a pracovní elektrodou.

Jinou a možná nejvíce používanou referenční elektrodou je elektroda hydrogen-paládiová. Je velice malá a může být umístěna v blízkosti pracovní a pomocné elektrody. Snadno se udržuje, je velmi stabilní a může pracovat za velmi vysokých tlaků až 6000 psi. Naproti tomu je velice citlivá na změnu pH.

3.3.3 Pomocná elektroda

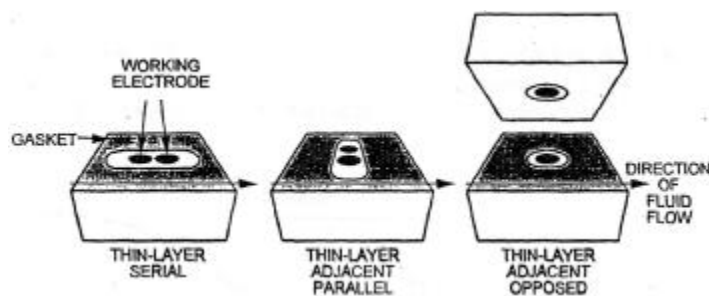
Pomocné elektrody musí být tvořeny z dobrého vodiče s dostatečně velkou plochou a musí být elektrochemicky neaktivní. Tato elektroda vytváří přenosový kanál pro elektrony, které jsou zapojené do elektrochemické reakce probíhající na pracovní elektrodě. Požadavky na umístění pomocné elektrody jsou daleko méně přísné než u pracovní nebo referenční elektrody. Pomocná elektroda je nejčastěji umístěna co nejbližší elektrody pracovní. Typickým materiálem pro výrobu pomocných elektrod jsou ušlechtilé kovy, jako je platina, paladium nebo nerezová ocel. Její tvar, velikost a umístění mohou ovlivnit vzniklý signál, šum a počet a velikost píků³.

3.3.4 Dvouelektrodové detekční cely

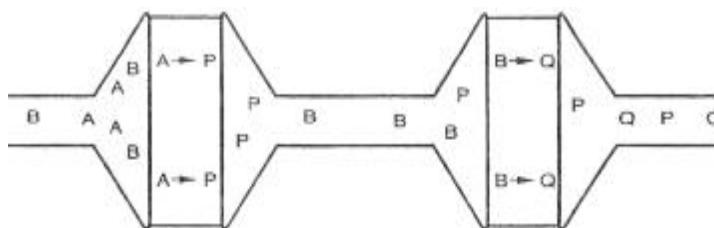
Existují 4 různá uspořádání pro dvouelektrodové systémy: tenkovrstvé elektrody umístěné buď v sérii za sebou, paralelně vedle sebe nebo naproti sobě, které se označují jako detektory amperometrické (obr. č. 5), a porézní průtokové elektrody umístěné za sebou označované jako coulochemické (obr. č. 6).

Coulochemické detekční cely jsou unikátní pro své uspořádání. Obsahují dvě pracovní průtokové elektrody vyrobené z porézního grafitu. Na jejich obrovské ploše probíhá kompletní elektrochemická reakce. Poskytují obrovskou citlivost a selektivitu, protože mobilní fáze prochází přímo skrze pracovní elektrody.

Výhoda dvouelektrodového systému spočívá v tom, že první elektroda se může využít na eliminaci případných interferujících elektroaktivních látek, druhá pak na detekci zkoumané látky. Všechny sloučeniny s reakčním potenciálem nižším než látky našeho zájmu jsou potom vyřazené z reakcí na druhé pracovní elektrodě¹².



Obr. č. 5: Amperometrické dvouelektrodové detekční cely



Obr. č. 6: Schématické znázornění coulochemické dvouelektrodové cely

3.4 VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÉHO DETEKTORU V ANALÝZE LÉČIV

Elektrochemický detektor je v současné době považován za nejcitlivější detektor pro HPLC¹³. Je vysoce citlivý na elektroaktivní části molekuly. Byl použit například při

stanovování biotinu a dalších vitamínů skupiny B z vitamínových premixů, při separaci a identifikaci oxidovaných forem disulfidů glutathionu a cysteinu, ve studiích zabývajících se vlivem raloxifenu na osteoporózu nebo při stanovování hladin klenbuterolu ve vepřových játrech. Uplatňuje se také při detekci látek extrahovaných z přírodních zdrojů. Chromatografické podmínky pro jednotlivé látky najdeme v následující tabulce. Jedná se o přehled od roku 2003 do roku 2008. Pozornost byla věnována především farmaceuticky významným látkám.

ANALYZOVANÁ LÁTKA	CHROMATOGRAFICKÉ PODMÍNKY	POZNÁMKA	Z D R O J
Biotin	Kolona LiChrospher 60RP-select B (250 mm × 4 mm; 5 μm). Mobilní fáze obsahovala 0,24 mol/L vodného roztoku složeného z kyseliny octové a acetonitrilu v poměru 85:15 (v/v). Jenalo se o izokratickou eluci. Průtoková rychlost byla nastavená na 1 ml/min, napětí na pracovní elektrodě bylo 900 mV, citlivost detektoru byla 1 μA.		14
Thiamin (B1) Pyridoxin (B6) Vitamín B12	Kolona LC18 5 μm (25 cm × 4.6 mm), temperovaná na 25 °C. Mobilní fáze obsahovala methanol a fosfátový pufr v poměru 10:90, 0,018M trimethylaminu, pH upraveno na 3,55 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Jenalo se o izokratickou eluci. Průtoková rychlost 1 ml/min.		15
Thiamin (B1) Pyridoxin (B6) Vitamín B12	Kolona Supelco LC18 5 μm (25 cm × 4.6 mm), temperovaná na 22 °C. Mobilní fáze byla složená z 0,05M fosfátu disodného, 10% methanolu (v/v), 0,018M trimethylaminu, pH bylo upraveno na 3.55 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Jenalo se o izokratickou eluci. Průtoková rychlost 1 ml/min.		16

Disulfidy cysteinu a glutathionu	Kolona C18 YMC ODS AQ (250 mm×4.6 mm). Mobilní fáze obsahovala 2% acetonitrilu, 98% 20mM roztoku fosfátu amonného, pH bylo upraveno na 2,5 kyselinou o-fosforečnou. Jenalo se o izokratickou eluci. Průtoková rychlost byla 0,7 ml/min.		17
Raloxifen hydrochlorid	Kolona Nucleosil C18 5 μm (250 mm × 4.0 mm), temperovaná na 37°C. Mobilní fáze obsahovala 36% acetonitrilu, 64% 50 mM fosfátového pufru, pH bylo upraveno na 3,0 pomocí o-fosforečné kyseliny. Jenalo se o izokratickou eluci.	Doba analýzy byla 10 min.	18
Klenbuterol	Kolona ODS Hypersil 5 μm (150 mm×4 mm). Mobilní fáze byla složena ze složky A (50 mM kyselina fosforečná a 30 mM triethylamin, pH upraveno na 4,0 pomocí 2 M roztoku hydroxidu sodného) a složky B (acetonitril a methanol v poměru 45:30 (v/v)). Poměr obou složek byl 80:20 (v/v). Jenalo se o izokratickou eluci. Průtoková rychlost byla 0,8 ml/min.	Retenční čas klenbuterolu byl 8,1 min.	19
Makrolidy	Kolona SymmetryShield RP8 5 μm (150 mm×3.9 mm). Jednalo se o gradientovou eluci. Byly použity dvě mobilní fáze. Mobilní fáze A (1M fosfátový pufr o pH 6,7 : voda : acetonitril v poměru 12.5:687.5:150, v/v/v) a mobilní fáze B (1M fosfátový pufr o pH 6,7 : voda : acetonitril v poměru 12.5:237.5:600, v/v/v).	Délka analýzy 30 min.	20
Tetracykliny	Kolona C18 5 μm (150 mm × 4 mm). Mobilní fáze obsahovala 0,05 M dihydrát fosforečnanu sodného o pH 2,2 a acetonitril v poměru 78:22 (v/v). Průtoková rychlost byla 1 ml/min.	Délka analýzy do 7 min.	21

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE

4.1.1 Chemikálie

Acetonitril – g.g. 99.9% Merck, KgaA, Německo

Acidum folicum – 99,0%, Fluka Chemie GmbH, Německo

Amoniak – Fluka Chemie GmbH, Německo

Biotin – Aldrich Chemie GmbH, Německo

Voda připravená reverzní osmózou – zařízení Millipore Milli QRG

Dihydrogenfosforečnan draselný – Merck, KgaA, Německo

Hydrogenfosforečnan draselný – Merck, KgaA, Německo

Kyselina fosforečná – Lachema a.s., ČR

Kyselina octová – 99,8%, Merck, KgaA, Německo

Methanol – Penta, ČR

Triethylamin – Fluka Chemie GmbH, Německo

Vitamín B12 – Aldrich Chemie GmbH, Německo

4.1.2 Přístroje

Sestava HPLC:

Čerpadlo: Model 582, Solvent delivery model, ESA, Inc., MA, U.S.A.

Chromatografická kolona: Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d.,
5 µm), Merck KgaA, Německo

Elektrochemický detektor: Coulochem III, ESA, Inc., MA, U.S.A.

PC program: CSW v. 1.7, Data Apex s.r.o., ČR

Digitální váhy: A&D HR – 120, Helago s.r.o., ČR

Laboratorní magnetická míchačka: MM2A Laboratorní přístroje Praha, ČR

Centrifuga: T51, VEB MLW, Německo

Ultrazvuková lázeň: KLN Ultraschall, K10, Slovensko

pH metr: Acidimetr 333, Duoapta Praha, ČR

4.1.3 Další pomůcky

kádinky, odměrné baňky, Erlenmayerovy baňky, odsávací baňky, odměrné válce
dělené pipety, nedělené pipety, balonek k pipetě, automatické pipety

zkumavky, centrifugační zkumavky
frita, stříčka, laboratorní lžičky, nálevky
mikrostříkačky Hamilton 25 μ l, 100 μ l
filtry (Nylon membrane filters, SIGMA, velikost pórů 0,2 μ m), oční filtr Minisart (velikost pórů 0,2 μ m),

4.2 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ A MOBILNÍ FÁZE

4.2.1 Roztoky

Zásobní roztok kyseliny folové 0,2 μ g/ml

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky byl navážen 1 mg kyseliny folové a vodou doplněno po značku. 0,1 ml tohoto roztoku bylo napipetováno do 5 ml odměrné baňky a opět doplněno vodou po značku.

Zásobní roztok vitamínu B12 1 μ g/ml

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky byl navážen 1 mg vitamínu B12 a vodou doplněno po značku. 1 ml tohoto roztoku byl napipetován do 10 ml odměrné baňky a opět doplněno vodou po značku.

Zásobní roztok biotinu 1 μ g/ml

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky byl navážen 1 mg biotinu a vodou doplněno po značku. 1 ml tohoto roztoku byl napipetován do 10 ml odměrné baňky a opět doplněno vodou po značku.

Zásobní roztok směsi všech standardů

Složení: kyselina listová (2 μ g/ml)

biotin (10 μ g/ml)

vitamin B12 (50 μ g/ml)

Příprava: Nejdříve byly vytvořeny zásobní roztoky jednotlivých složek.

Zásobní roztok kys. listové (0,02 mg/ml): 2 mg byly naváženy do 100 ml odměrné baňky a vodou doplněno po značku.

Zásobní roztok biotinu (0,1 mg/ml): 10 mg bylo naváženo do 100ml odměrné baňky a vodou doplněno po značku.

Zásobní roztok vitamínu B12 (1 mg/ml): 10 mg bylo naváženo do 10 ml odměrné baňky a vodou doplněno po značku.

Následně byl do 10 ml odměrné baňky napipetován 1 ml zásobního roztoku kyseliny listové, 1 ml zásobního roztoku biotinu a 0,5 ml zásobního roztoku vitamínu B12 a vodou doplněno po značku.

Roztok vitamínového přípravku 1 (biotin, vitamín B12, kyselina listová)

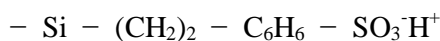
Příprava: Nejprve byl připraven 0,1 M pufr hydrogenfosforečnanu draselného ($M_r = 174,18$). Vypočítané množství 1,74 g K_2HPO_4 se rozpustilo ve 100 ml vody. Pomocí kyseliny fosforečné bylo následně pH upraveno na hodnotu 8,0.

Do 10 ml odměrné baňky bylo naváženo 300 mg vitamínového přípravku, přidal se 1 ml acetonitrilu. Po důkladném protřepání se roztok doplnil po značku pomocí předem vyrobeného hydrogenfosforečnanového pufru. Na 15 minut se ponořilo do ultrazvukové lázně a poté se pomocí centrifugy oddělil čistý supernatant, který se ještě přefiltroval přes oční filtr.

Extrakt vitamínového přípravku 2 (biotin, vitamín B12, kyselina listová)

Příprava: 1 tableta se rozdrtila v třence a vzniklý prášek se nasypal do centrifugační zkumavky. Přidalo se 5 ml vody. Na 3 minuty se zkumavka ponořila do ultrazvukové lázně a následně byla dána do centrifugy na další 3 minuty. Vzniklý supernatant byl slit do 10 ml odměrné baňky. Ke zbytku v centrifugační zkumavce bylo přidáno 4,5 ml vody a celý proces se opakoval. Supernatant byl opět slit do odměrné baňky a ta poté doplněna vodou po značku. Vzhledem k vysokému obsahu rychle se oxidujících kovů v přípravku musel být roztok nejdříve přefiltrován přes oční filtr a následně extrahován na tuhou fázi, a to za pomoci iontovýmenné kolony DSC – SCX, která z extraktu zachytila veškeré kovové kationty.

Postup extrakce na tuhou fázi: První fází bylo tzv. kondicionování, kdy se za použití 1 ml methanolu a 2 ml vody napřímily řetězce sorbentu, jímž byla polymerně vázaná kyselina benzensulfonová (obr. č. 7). Jedná se o velmi silný katex s $pK_a < 1,0$ a iontově výměnnou kapacitou 0,8 mg/g.



Obr. č. 7: Polymerně vázaná kys. benzensulfonová

Ve druhé fázi byly na kolonku nastříknuty 2 ml vzorku. Vše se provádělo souběžně ve dvou zkumavkách, přičemž druhá zkumavka byla v závěru ještě promyta 2 ml vody. Konečné promytí vodou se ukázalo jako nevyhovující.

Aby byla extrakce účinná, vše muselo probíhat pod tlakem.

Extrakt vitamínového přípravku 3 (vitamín B12, kyselina listová)

Příprava: 5 tablet se rozdrtilo v třence a vzniklý prášek se nasypal do centrifugační zkumavky. Přidalo se 5 ml vody. Na 3 minuty se zkumavka ponořila do ultrazvukové lázně a následně byla dána do centrifugy na další 3 minuty. Vzniklý supernatant byl slit do 10 ml odměrné baňky. Ke zbytku v centrifugační zkumavce bylo přidáno 4,5 ml vody a celý proces se opakoval. Supernatant byl opět slit do odměrné baňky a ta poté doplněna vodou po značku. Obdobně jako u předchozího přípravku následovala filtrace přes oční filtr a extrakce na tuhou fázi.

Extrakt vitamínového přípravku 4 (biotin, vitamín B12, kyselina listová)

Příprava: 2 tablety se rozdrtily v třence a vzniklý prášek se nasypal do centrifugační zkumavky. Přidalo se 5 ml vody. Na 3 minuty se zkumavka ponořila do ultrazvukové lázně a následně byla dána do centrifugy na další 3 minuty. Vzniklý supernatant byl slit do 10 ml odměrné baňky. Ke zbytku v centrifugační zkumavce bylo přidáno 4,5 ml vody a celý proces se opakoval. Supernatant byl slit do odměrné baňky a ta poté doplněna vodou po značku. Opět následovala filtrace přes oční filtr a extrakce na tuhou fázi.

Roztok z injekčního přípravku 5 (vitamín B12)

Příprava: 1 ml byl napipetován do 10 ml odměrné baňky a vodou doplněno po značku. Tím byla získána koncentrace kyanokobaltaminu 50 µg/ml.

Roztok z injekčního přípravku 6 (vitamín B12)

Příprava: 1 ml byl napipetován do 10 ml odměrné baňky a vodou doplněno po značku. Následně bylo pipetováno 0,5 ml vzniklého roztoku do další 10 ml odměrné baňky a vodou doplněno po značku. Byl získán roztok o koncentraci vitamínu B12 50 µg/ml.

4.2.2 Mobilní fáze

Jak už bylo uvedeno výše, jedním z cílů diplomové práce bylo nalézt optimální složení mobilní fáze. Hledal se nejvhodnější eluát a pufr, jejich koncentrace a optimální hodnota pH.

V návaznosti na předchozí práce a literární rešerše byl vzhledem k použité separaci na reverzní fázi zkoušen jako eluát nejdříve acetonitril, následně methanol. Pufr byl použit acetátový a fosfátový v různých koncentracích. pH se pohybovalo v rozmezí 2,6 – 3,7. Zkoušel se též vliv triethylaminu, který byl do mobilní fáze přidán. Celkem bylo vyzkoušeno 11 různých mobilních fází.

Mobilní fáze č. 1 (11% acetonitrilu, acetátový pufr):

Do 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 7 ml kyseliny octové 98% a doplněno vodou po značku. Z připraveného roztoku kyseliny octové s hodnotou pH = 3 bylo použito 445 ml a doplněno 55 ml acetonitrilu na objem 500 ml. Mobilní fáze byla důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze č. 2 (11% acetonitrilu, fosforečnanový pufr):

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,477 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněno vodou po značku. Do druhé 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 55 ml acetonitrilu a doplněno po značku připraveným fosforečnanovým pufrům. pH bylo upraveno na 3,55 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Mobilní fáze byla přefiltrována pod tlakem přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm a následně důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze č. 3 (12% acetonitrilu, pH = 3,55):

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,477 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněno vodou po značku. Do druhé 500 ml odměrné baňky bylo

napipetováno 60 ml acetonitrilu a doplněno po značku připraveným fosforečnanovým pufrem. pH bylo upraveno na 3,55 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Mobilní fáze byla přefiltrována pod tlakem přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm a následně důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze č. 4 (12% acetonitrilu, pH = 2,6):

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,477 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněno vodou po značku. Do druhé 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 60 ml acetonitrilu a doplněno po značku připraveným fosforečnanovým pufrem. pH bylo upraveno na 2,6 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Mobilní fáze byla přefiltrována pod tlakem přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm a následně důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze č. 5 (20% methanolu, 0,018M triethylamin):

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,477 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněno vodou po značku. Do druhé 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 100 ml methanolu, 1,26 ml triethylaminu a doplněno po značku připraveným fosforečnanovým pufrem. pH bylo upraveno na 3,55 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Mobilní fáze byla přefiltrována pod tlakem přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm a následně důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze č. 6 (20% methanolu, 0,009M triethylamin):

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,477 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněno vodou po značku. Do druhé 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 100 ml methanolu, 0,63 ml triethylaminu a doplněno po značku připraveným fosforečnanovým pufrem. pH bylo upraveno na 3,55 pomocí kyseliny fosforečné 85%.

Mobilní fáze byla přefiltrována pod tlakem přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm a následně důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze č. 7 (20% methanolu, bez triethylaminu):

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,477 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněno vodou po značku. Do druhé 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 100 ml methanolu a doplněno po značku připraveným fosforečnanovým pufrům. pH bylo upraveno na 3,55 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Mobilní fáze byla přefiltrována pod tlakem přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm a následně důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze č. 8 (25% methanolu):

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,477 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněno vodou po značku. Do druhé 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 125 ml methanolu a doplněno po značku připraveným fosforečnanovým pufrům. pH bylo upraveno na 3,55 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Mobilní fáze byla přefiltrována pod tlakem přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm a následně důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze č. 9 (23% methanolu):

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,477 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněno vodou po značku. Do druhé 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 115 ml methanolu a doplněno po značku připraveným fosforečnanovým pufrům. pH bylo upraveno na 3,55 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Mobilní fáze byla přefiltrována pod tlakem přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm a následně důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze č. 10 (25% methanolu, pH = 2,6):

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,477 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněno vodou po značku. Do druhé 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 125 ml methanolu a doplněno po značku připraveným fosforečnanovým pufrem. pH bylo upraveno na 2,6 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Mobilní fáze byla přefiltrována pod tlakem přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm a následně důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze č. 11 (24% methanolu):

Do 500 ml odměrné baňky bylo naváženo 3,477 g dihydrogenfosforečnanu draselného a doplněno vodou po značku. Do druhé 500 ml odměrné baňky bylo napipetováno 120 ml methanolu a doplněno po značku připraveným fosforečnanovým pufrem. pH bylo upraveno na 3,55 pomocí kyseliny fosforečné 85%. Mobilní fáze byla přefiltrována pod tlakem přes filtr o velikosti pórů 0,2 μm a následně důkladně odplyněna v ultrazvukové lázni.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

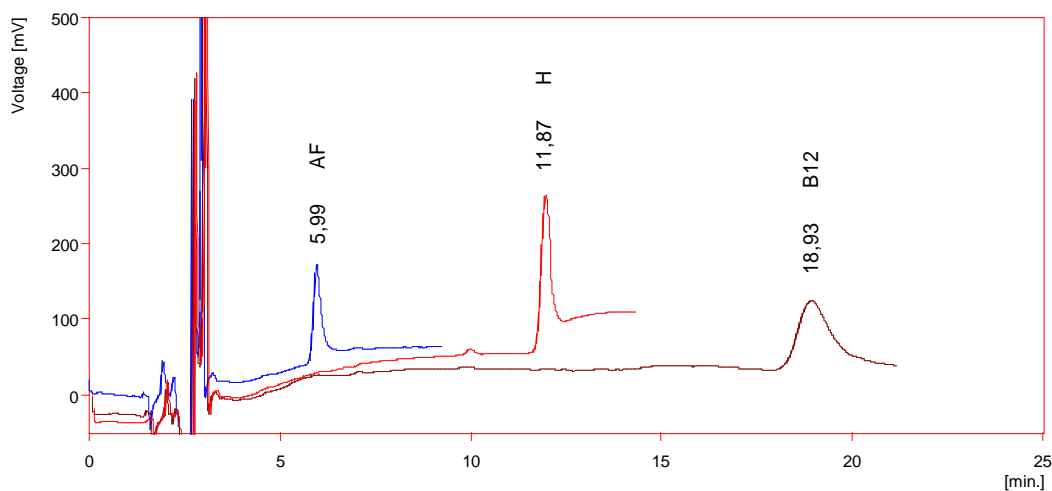
5.1 HLEDÁNÍ OPTIMÁLNÍHO SLOŽENÍ MOBILNÍ FÁZE

Jak už bylo uvedeno dříve, celkem bylo vyzkoušeno 11 mobilních fází. Citlivost detektoru byla nastavena na 1 μ A a napětí na pracovní elektrodě bylo 900 mV. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min. Separace biotinu, kyseliny listové a vitamínu B12 byla zkoušena nejdříve pomocí jejich zásobních roztoků standardů, následně byly separace opakovány se zkušebními extrakty z různých vitamínových přípravků.

Mobilní fáze č. 1

Mobilní fáze č. 1 obsahovala 11% acetonitrilu, anorganická fáze byla tvořena acetátovým pufrům, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 3.

Na obrázku č.8 je znázorněn chromatografický záznam roztoku standardu vitamínu B12, biotinu a kyseliny listové. Vitamin B12 se eluuje s retenčním časem 19,1 min, což zbytečně prodlužuje celkovou dobu separace. Retenční čas biotinu je 11,9 min. Odezva kyseliny listové je zobrazena na záznamu s retenčním časem 6,3 min (viz tab. č. 1). Takto nízký retenční čas byl hlavním důvodem, proč mobilní fáze nemohla plně vyhovovat. Kyselina listová se eluuje příliš blízko startu, což při extrakci ze složitějších vitamínových přípravků, které obsahují navíc snadno oxidovatelné složky, může způsobit značné nepřesnosti jak při separaci, tak při stanovení.



Obr. č. 8: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

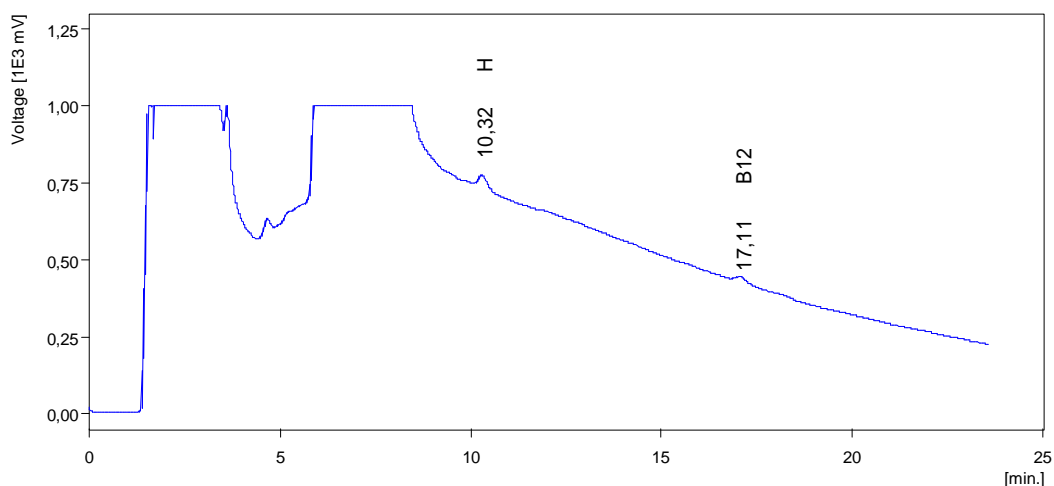
Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μ m), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

	C [$\mu\text{g/ml}$]	R _t [min]
B12	1	18,93
BIOTIN	1	11,87
AF	0,2	5,99

Tab.č. 1: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 1

Na obrázku č. 9 je zobrazena separace vitamínů z extraktu připraveného z vitamínového přípravku 2, který musel být extrahován na tuhou fázi, aby se zabránilo přestupu snadno oxidovatelných složek do extraktu. I přesto není zaznamenána eluce kyseliny listové.

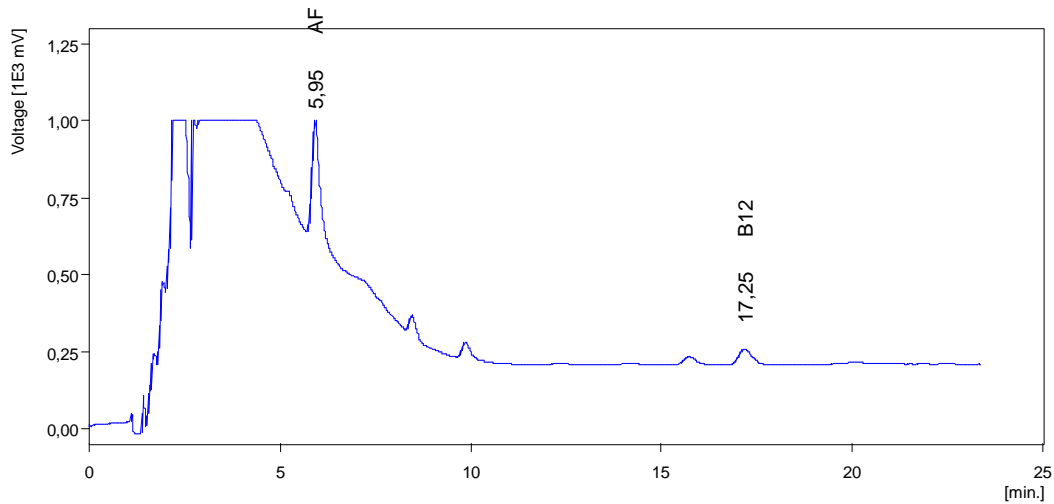


Obr. č. 9: Chromatografický záznam extraktu z vitamínového přípravku 2

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

Obrázek č. 10 znázorňuje též separaci vitamínů z extraktu, který byl připraven z vitamínového přípravku 3 a následně opět extrahován na tuhou fázi.



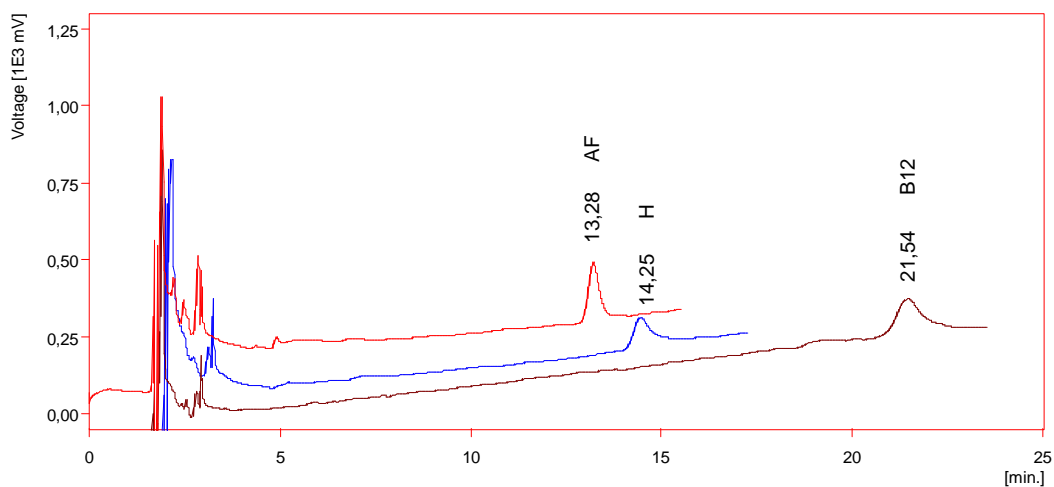
Obr. č. 10: Chromatografický záznam extraktu z vitamínového přípravku 3
 Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo
 Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

Extrakce na tuhou fázi v případě stanovování koncentrací vitamínů v přípravcích s sebou nese komplikace týkající se především standardizace a validace metody. Proto jsme následně pracovali převážně s roztoky standardů jednotlivých vitamínů.

Mobilní fáze č. 2

Mobilní fáze č. 2 obsahovala také 11% acetonitrilu, ale anorganická fáze byla tvořena fosfátovým pufrem o koncentraci 0,05M. pH bylo upraveno na 3,55. Snahou bylo zdržet kyselinu listovou déle na koloně a tím zpomalit její eluci.

Na chromatogramu (obr. č. 11) vidíme, že zvýšené pH nemělo vliv pouze na kyselinu listovou, ale též na vitamín B12, který se eluuje až ve 21,54 min, což negativně ovlivňuje celkovou dobu separace. Kyselina listová a biotin se nyní eluují s velmi podobným retenčním časem.(viz tab. č 2) Jelikož by bylo ve smíšeném vzorku těžko rozlišitelné, o jaký z těchto vitamínů se jedná a píky by se pravděpodobně překrývaly, shledali jsme mobilní fázi č. 2 jako nevhodnou.



Obr. č. 11: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

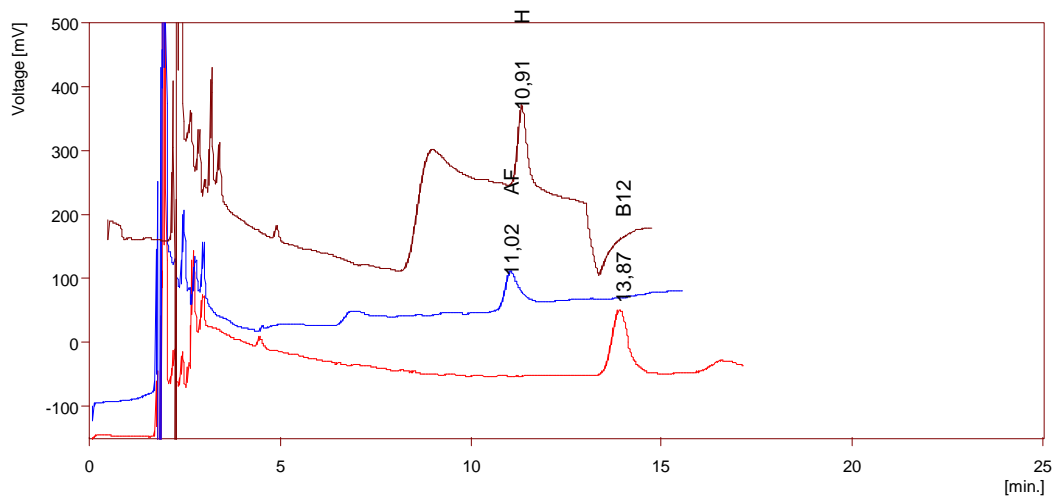
	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	21,54
BIOTIN	1	14,25
AF	0,2	13,28

Tab.č. 2: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 2

Mobilní fáze č. 3

V mobilní fázi č. 3 jsme změnilí obsah acetonitrilu na 12%, ostatní chromatografické podmínky zůstaly stejné.

Zvýšením podílu acetonitrilu jsme docílili zkrácení elučního času vitamínu B12, ovšem opět nedošlo k optimálnímu časovému rozdělení píků biotinu a kyseliny listové(viz obr. č. 12, tab. č. 3).



Obr. č. 12: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

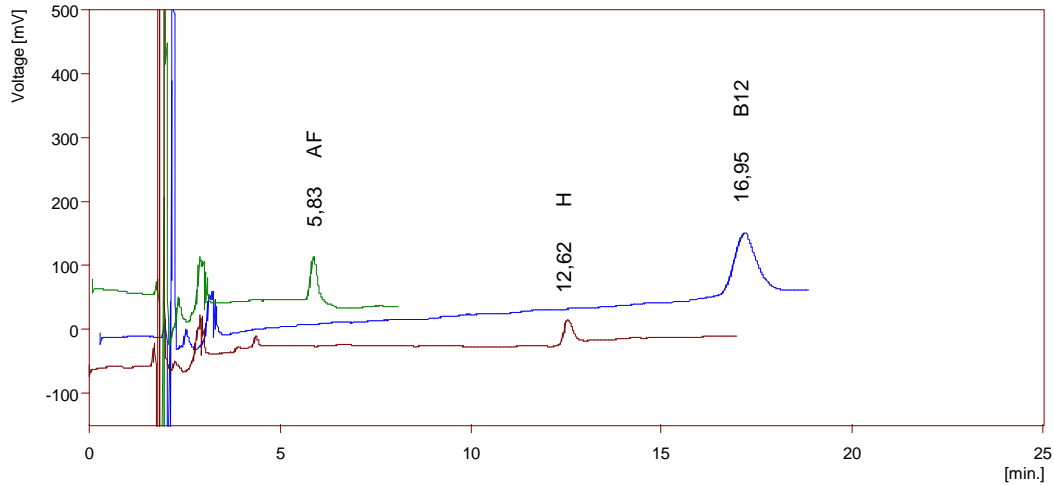
	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	13,87
BIOTIN	1	11,02
AF	0,2	10,91

Tab.č. 3: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 3

Mobilní fáze č. 4

V mobilní fázi č. 4 jsme ponechali 12% acetonitrilu a pH jsme snížili na 2,6. Změnou pH jsme chtěli dosáhnout rozdílného retenčního času kyseliny listové a biotinu.

Retenční čas kyseliny listové je 5,83 min. Stejně jako v případě mobilní fáze č. 1 se eluuje příjíš blízko startu (viz obr. č. 13, tab. č. 4).



Obr. č. 13: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

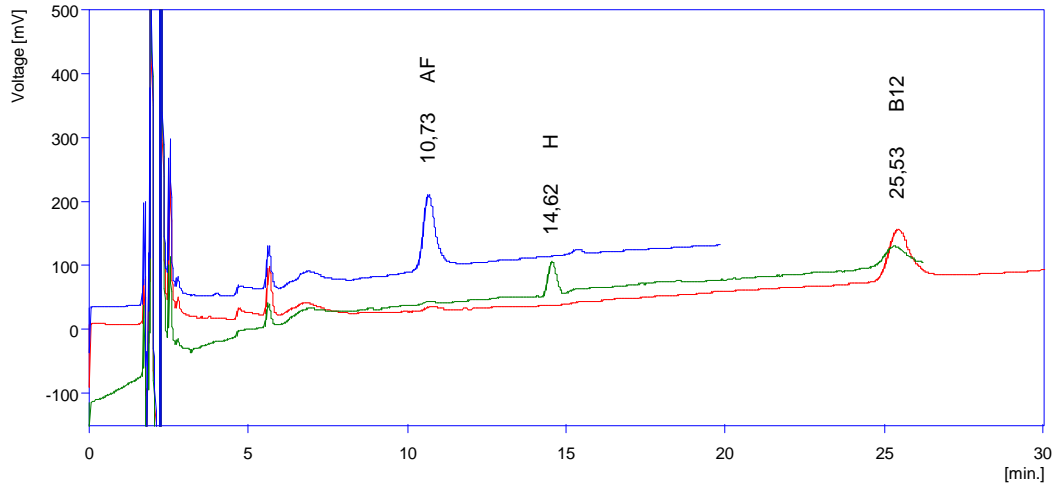
	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	16,95
BIOTIN	1	12,62
AF	0,2	5,83

Tab.č. 4: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 4

Mobilní fáze č. 5

V další mobilní fázi jsme zkoušeli zaměnit acetonitril za methanol. Podíl methanolu byl 20%, pH fosfátového pufru bylo upraveno na 3,55. Do mobilní fáze byl přidán ještě triethylamin o koncentraci 0,018M. Také v následujících dvou mobilních fázích byl zkoušen jeho vliv na průběh eluce. Ostatní chromatografické podmínky zůstaly stejné.

Rozdělení jednotlivých píků je dostačující. Nevýhodou je pouze retenční čas vitamínu B12 (25,53 min), který zbytečně prodlužuje celkovou dobu separace (viz obr. č. 14, tab. č. 5).



Obr. č. 14: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

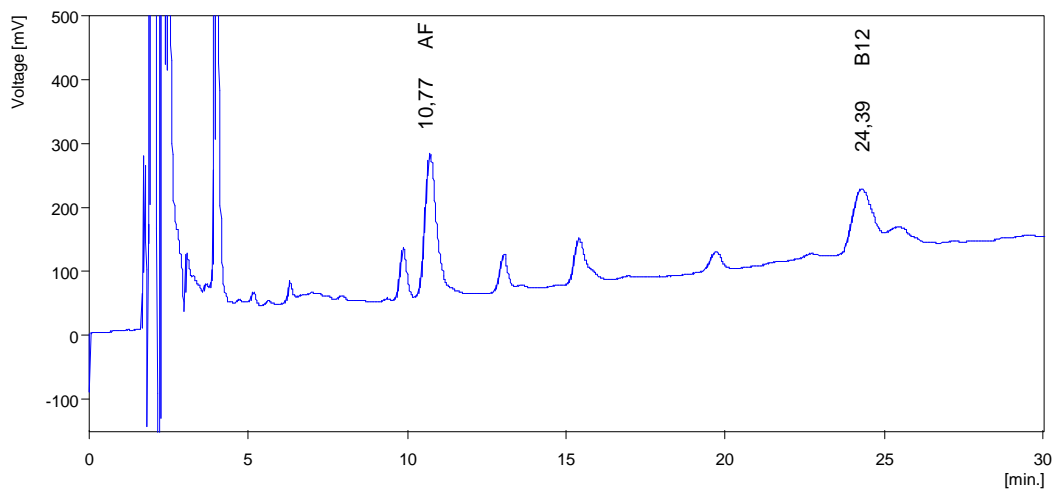
Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

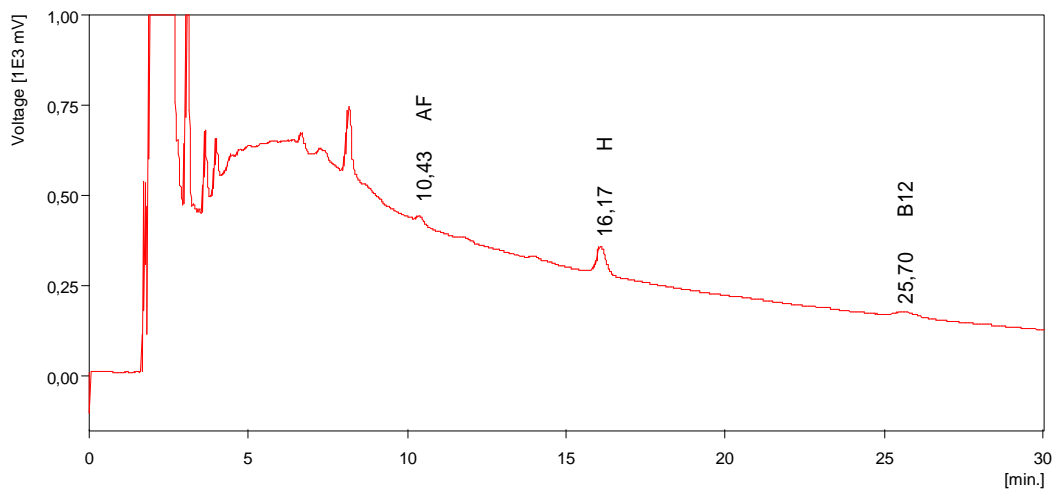
	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	25,53
BIOTIN	1	14,62
AF	0,2	10,73

Tab.č. 5: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 5

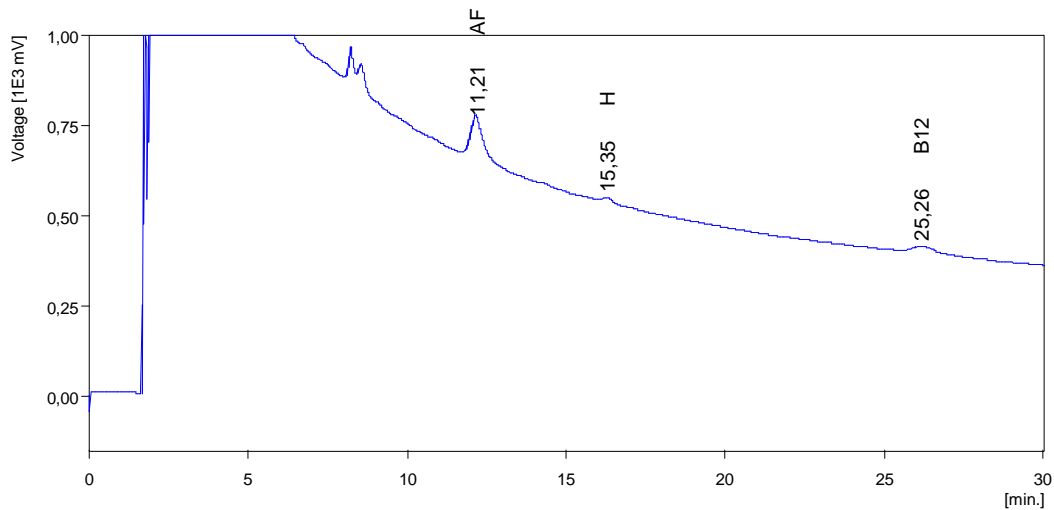
Vzhledem k uspokojivému rozdělení jednotlivých píků jsme zkoušeli separovat vitamíny z extraktů vitamínových přípravků. Výsledek můžeme vidět na obrázcích č. 15, 16 a 17. Nevýhodou je stále vysoký obsah snadno se oxidujících látek, které způsobují ne příliš vhodné čelo grafu, a také relativně dlouhá doba separace.



Obr. č. 15: Chromatografický záznam extraktu z vitamínového přípravku 3
Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μ m), Merck KGaA, Německo
Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce



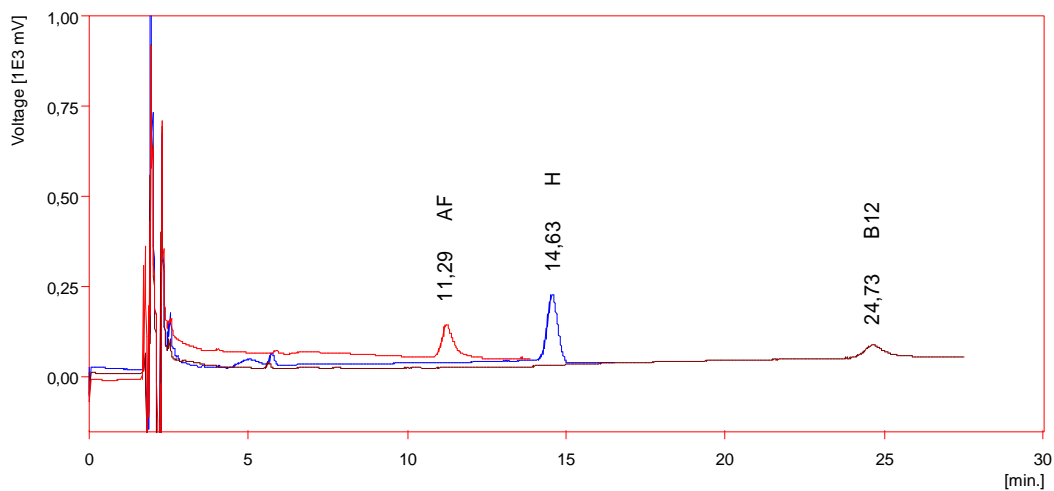
Obr. č. 16: Chromatografický záznam extraktu z vitamínového přípravku 4
Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μ m), Merck KGaA, Německo
Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce



Obr. č. 17: Chromatografický záznam extraktu z vitamínového přípravku 2
 Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo
 Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

Mobilní fáze č. 6

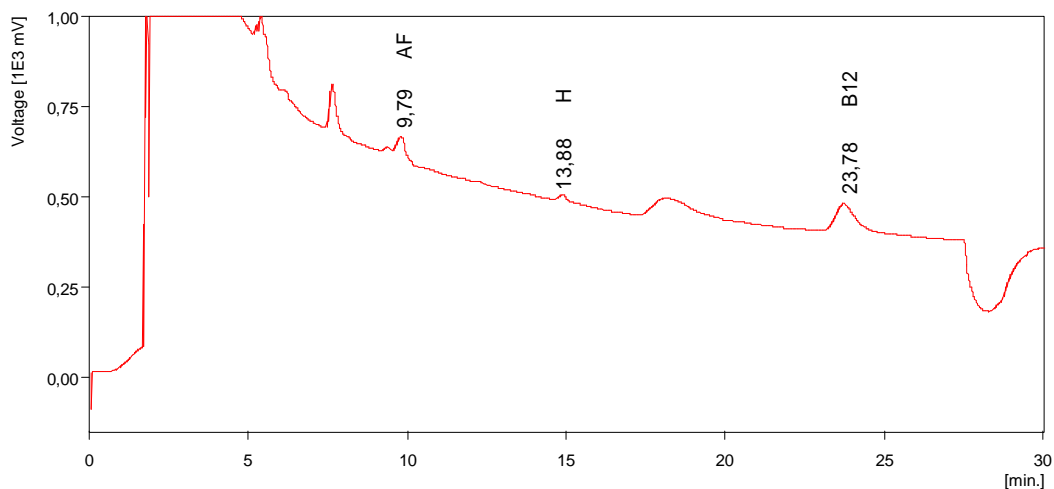
Mobilní fáze č. 6 obsahovala opět 20% methanolu. Byl zkoušen vliv poloviční koncentrace triethylaminu (0,009M). Retenční časy jednotlivých vitamínů se výrazně neliší (viz obr. č. 18, 19, tab. č. 6).



Obr. č. 18: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12
 Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo
 Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

	C [$\mu\text{g/ml}$]	R _t [min]
B12	1	24,73
BIOTIN	1	14,63
AF	0,2	11,29

Tab.č. 6: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 6



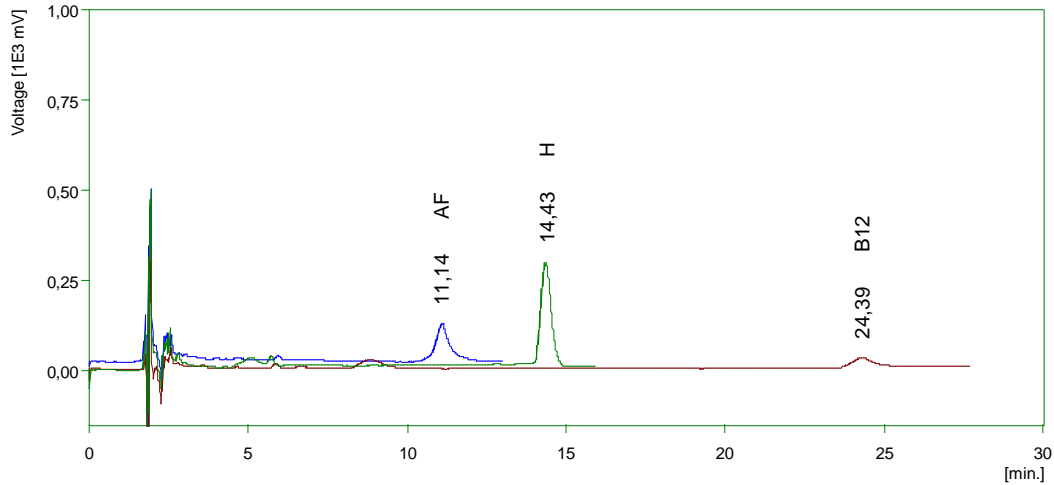
Obr. č. 19: Chromatografický záznam extraktu z vitamínového přípravku 2

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

Mobilní fáze č. 7

Do další mobilní fáze nebyl triethylamin vůbec přidán. Z výsledků jsme zjistili, že vliv triethylaminu na separaci kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12 je minimální, téměř zanedbatelný (viz obr. č. 20, tab. č. 7). Proto jsme nadále pracovali se složením mobilní fáze č. 7, tzn. bez triethylaminu, z důvodu nejmenší složitosti a nejjednodušší přípravy.



Obr. č. 20: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

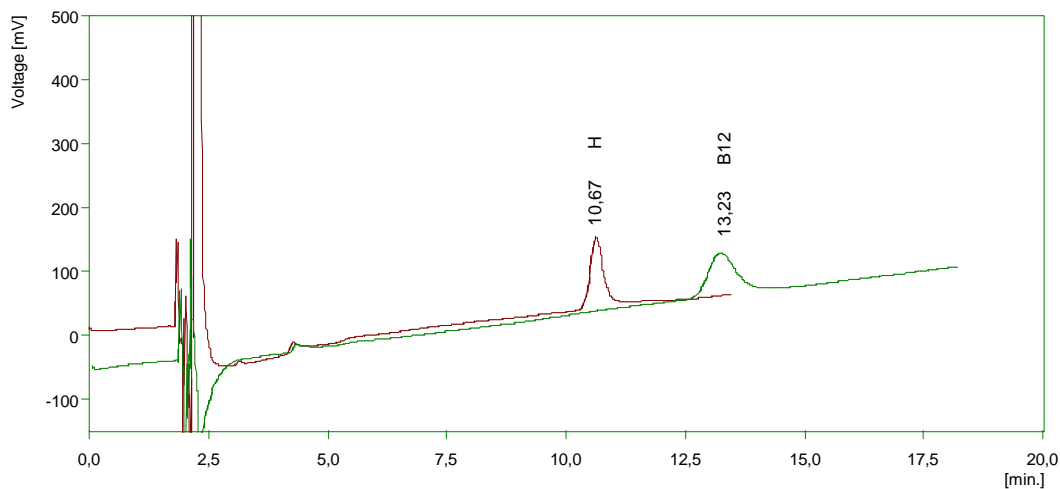
	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	24,39
BIOTIN	1	14,43
AF	0,2	11,14

Tab.č. 7: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 7

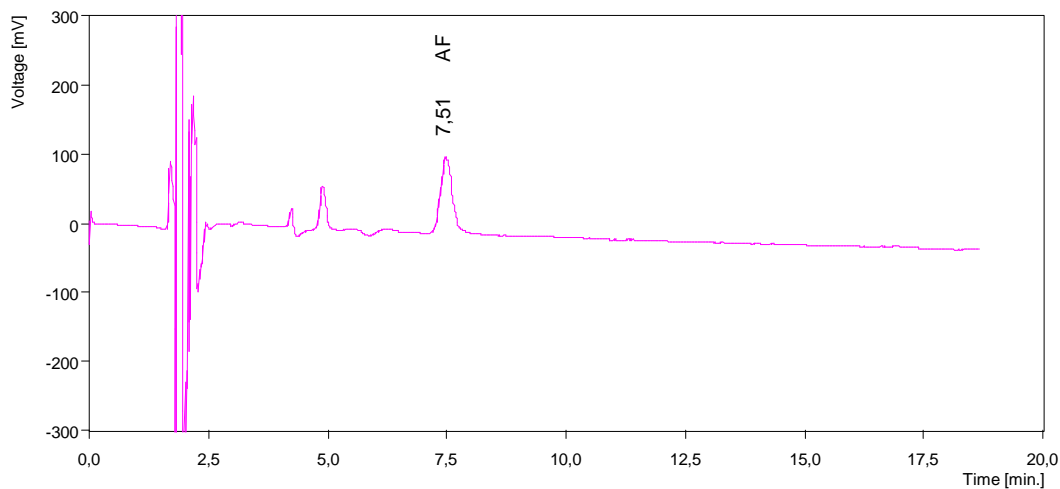
Mobilní fáze č. 8

V mobilní fázi č. 8 jsme zvýšili obsah methanolu na 25%, aby se zkrátila celková doba separace. Ostatní chromatografické podmínky zůstaly nezměněny.

Na chromatogramu (obr. č. 21) se vitamín B12 eluuje ve 13,23 min. Vzhledem k tomu, že se vitamín B12 eluuje jako poslední, byla by délka separace optimální. Pík biotinu je zaznamenán s retenčním časem 10,67 min. Kyselina listová se eluuje s retenčním časem 7,51 min (obr. č. 22), čímž se opět přiblížila startu (viz tab. č. 8). V další mobilní fázi jsme zkusili proto koncentraci methanolu snížit.



Obr. č. 21: Chromatografický záznam roztoků standardů biotinu a vitamínu B12
 Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo
 Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce



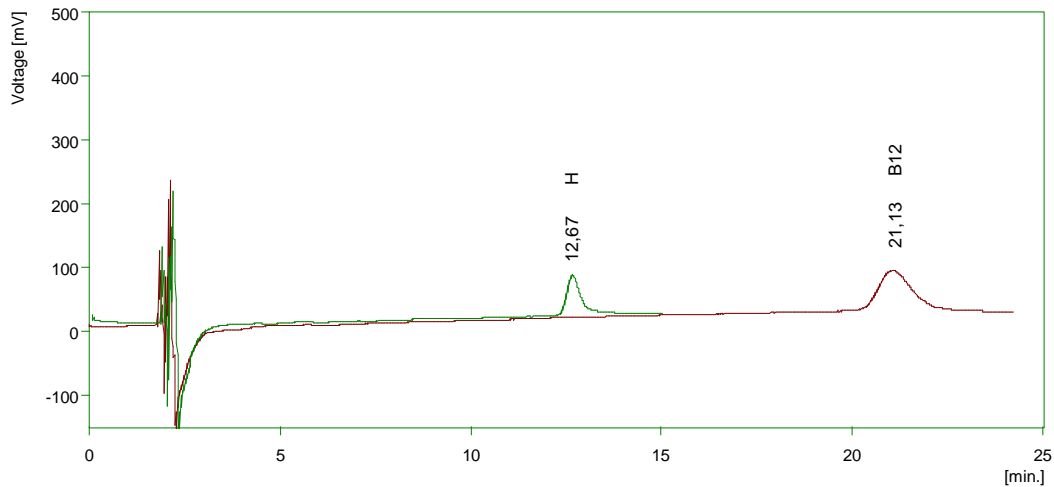
Obr. č. 22: Chromatografický záznam roztoku standardu kyseliny listové
 Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo
 Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	13,23
BIOTIN	1	10,67
AF	0,2	7,51

Tab.č. 8: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 8

Mobilní fáze č. 9

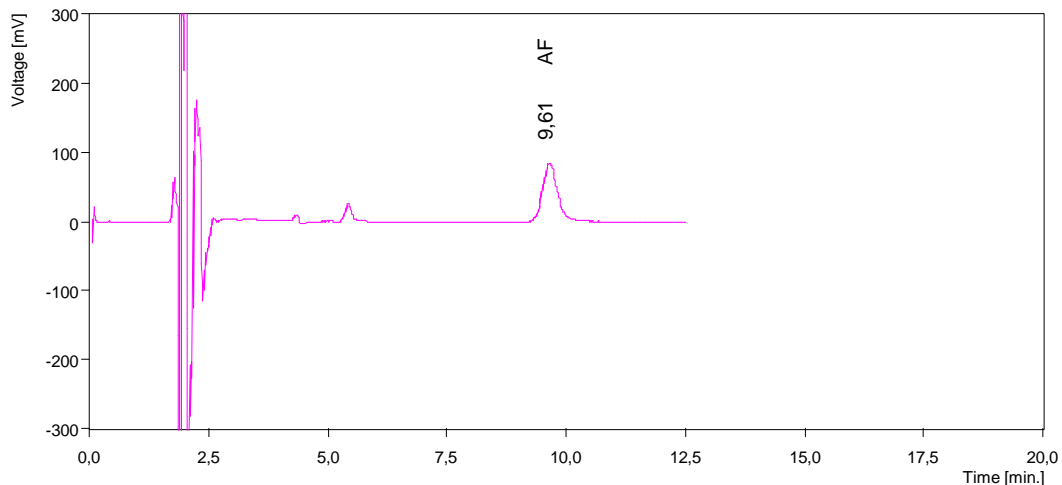
Mobilní fáze č. 9 obsahovala 23% methanolu. Vitamín B12 se eluuje s retenčním časem 21,13 min, což opět negativně ovlivňuje celkovou dobu separace. Doba eluce ostatních dvou vitamínů by byla vyhovující (viz obr. č. 23,24, tab. č. 9).



Obr. č. 23: Chromatografický záznam roztoků standardů biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce



Obr. č. 24: Chromatografický záznam roztoku standardu kyseliny listové

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

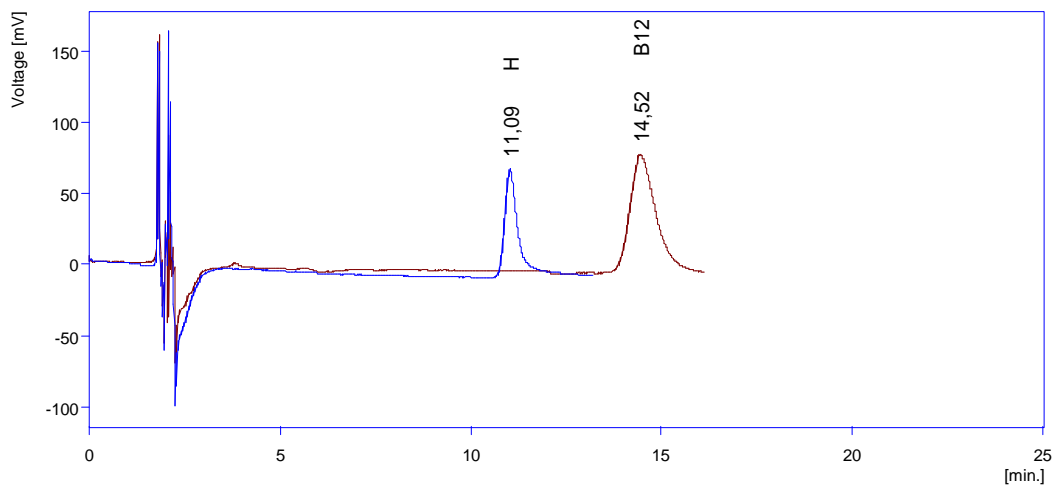
	C [$\mu\text{g/ml}$]	R _t [min]
B12	1	21,13
BIOTIN	1	12,67
AF	0,2	9,61

Tab.č. 9: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 9

Mobilní fáze č. 10

V dalším kroku jsme se opět vrátili k 25% methanolu a pH jsme snížili na 2,6. Snahou bylo zkrátit eluční čas vitamínu B12.

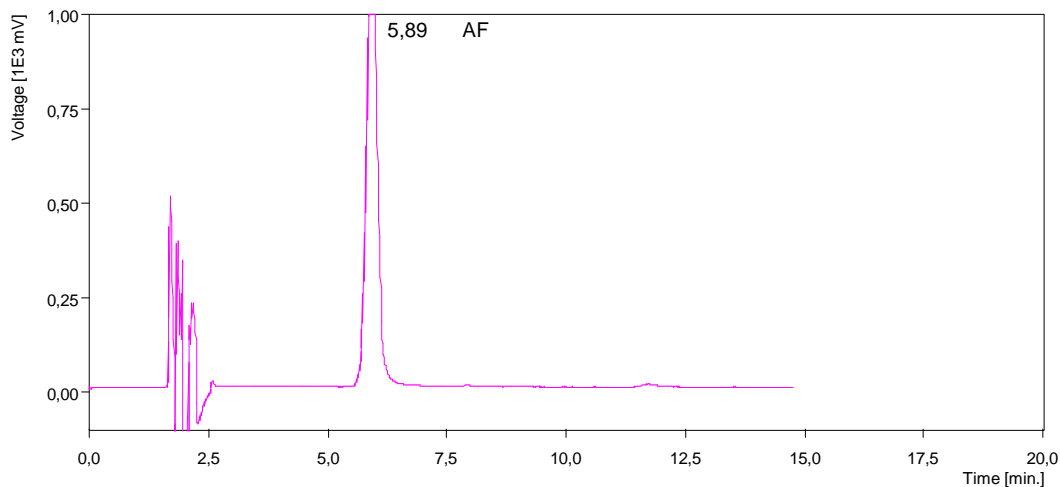
Na chromatogramu (obr. č. 25) se vitamín B12 eluuje ve 14,52 min. Vzhledem k tomu, že se vitamín B12 eluuje jako poslední, byla by délka separace optimální. Pík biotinu je zaznamenán s retenčním časem 11,09 min. Kyselina listová se eluuje s retenčním časem 5,89 min, čímž se příliš přiblížila startu. (obr. č. 26). Ve výsledku můžeme uvažovat, že změna pH má, kromě vitamínu B12, též velký vliv i na kyselinu listovou (viz tab. č. 10). Což se zde projevilo nevhodně.



Obr. č. 25: Chromatografický záznam roztoků standardů biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce



Obr. č. 26: Chromatografický záznam roztoku standardu kyseliny listové
 Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo
 Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

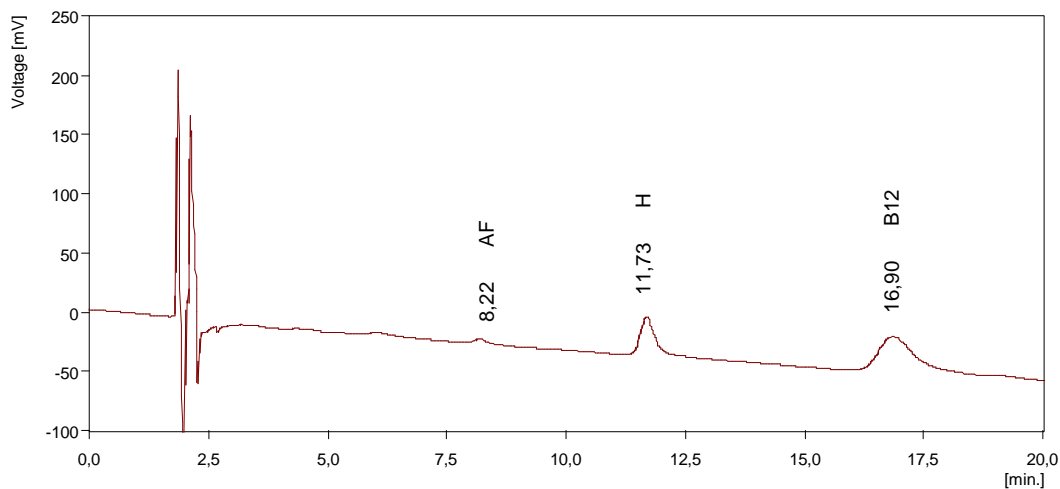
	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	14,52
BIOTIN	1	11,09
AF	0,2	5,89

Tab.č. 10: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 10

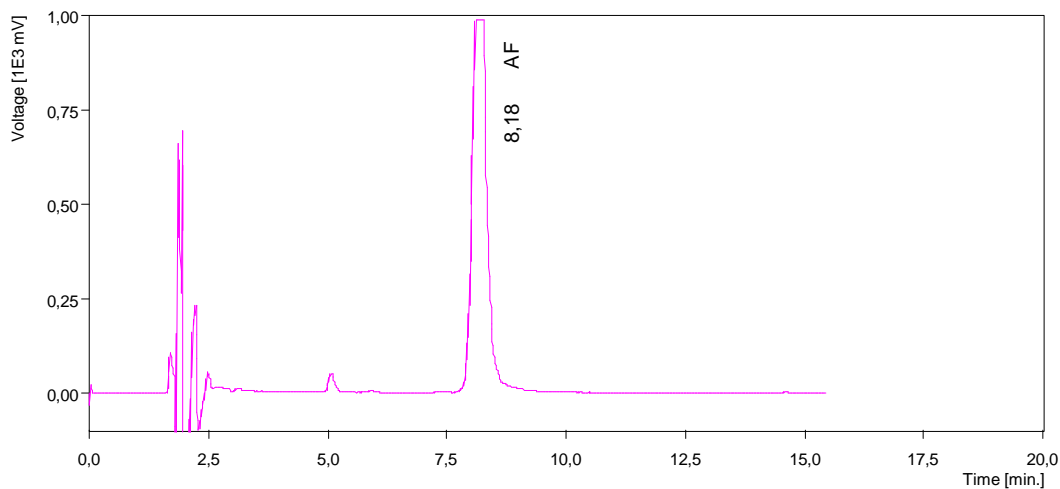
Mobilní fáze č. 11

Mobilní fáze č. 11 obsahovala 24% methanolu. Anorganická fáze byla opět tvořena fosfátovým pufrům o koncentraci 0,05M. pH bylo upraveno na 3,55.

Z chromatografických záznamů (obr. č. 27,28) je patrné, že mobilní fáze je vyhovující. Délka separace je optimální, časový odstup eluce kyseliny listové a biotinu je taktéž dostačující (viz tab. č. 11). Nadále jsme pracovali se složením mobilní fáze č. 11.



Obr. č. 27: Chromatografický záznam roztoků standardů biotinu a vitamínu B12
 Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo
 Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce



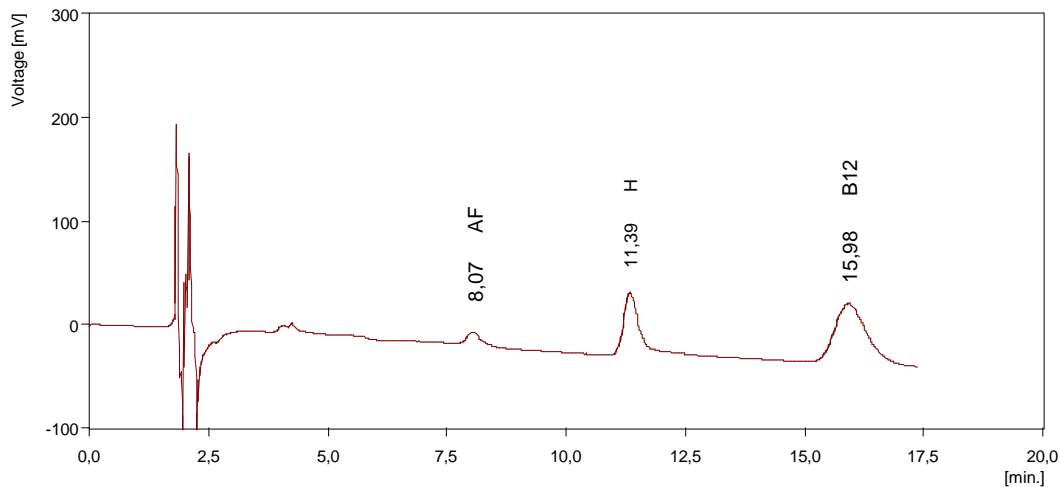
Obr. č. 28: Chromatografický záznam roztoku standardu kyseliny listové
 Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo
 Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	16,90
BIOTIN	1	11,73
AF	0,2	8,18

Tab.č. 11: Retenční časy separace při použití mobilní fáze 11

5.2 VLIV ZMĚNY pH NA CELKOVOU SEPARACI

Následně jsme zkoušeli, do jaké míry má změna pH vliv na celkovou separaci. Použito bylo složení mobilní fáze 11. V prvním případě bylo pH upraveno na 3,3 pomocí kyseliny fosforečné 85% (obr. č. 29, tab. č. 12), následně na 3,7 pomocí 25% amoniaku (obr. č. 30, tab. č. 13). Z výsledků je patrné, že vliv pH v tomto malém rozmezí nemá na separaci téměř žádný vliv.



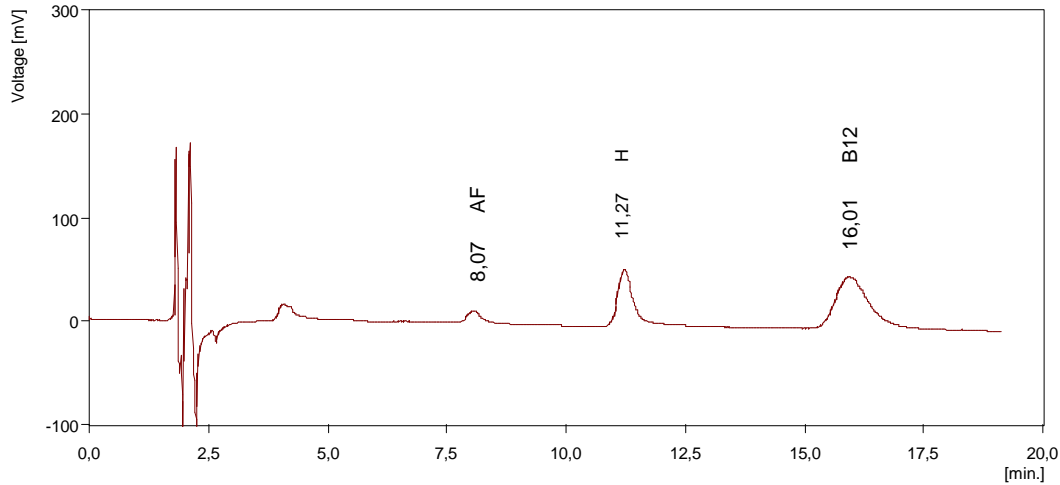
Obr. č. 29: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	15,98
BIOTIN	1	11,39
AF	0,2	8,07

Tab.č. 12: Retenční časy separace při pH = 3,3



Obr. č. 30: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

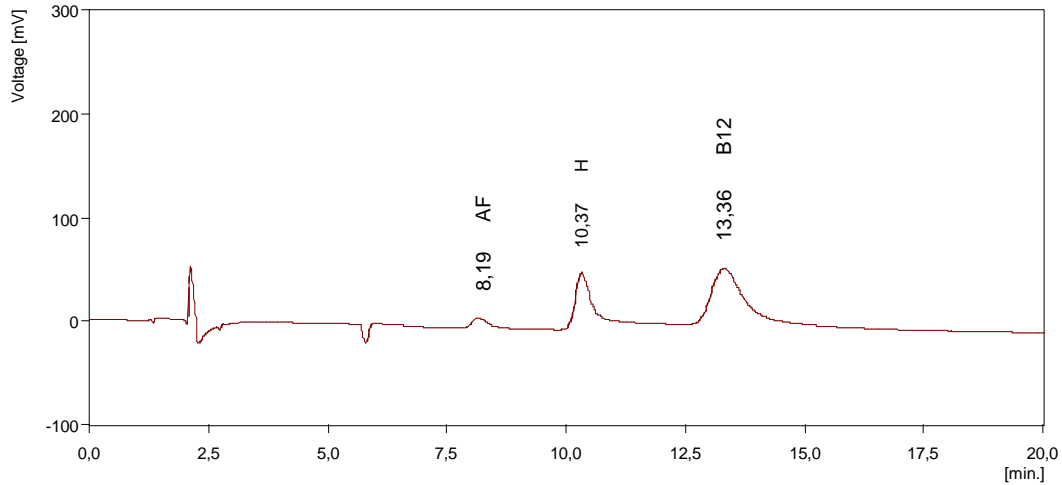
Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	16,01
BIOTIN	1	11,27
AF	0,2	8,07

Tab.č. 13: Retenční časy separace při pH = 3,7

5.3 VLIV ZMĚNY TYPU, KONCENTRACE A pH PUFRU

V další fázi byl vyzkoušen vliv typu pufru na celkovou separaci. Fosfátový pufr o koncentraci 0,05M byl zaměněn za pufr acetátový, jehož pH nebylo upraveno. Hodnota pH zůstala 3,3. (obr. č. 31, tab. č. 14). Na následujícím záznamu (obr. č. 32, tab. č. 15) bylo pH upraveno pomocí 25% amoniaku na 3,5. Vitamin B12 se svým retenčním časem přiblížil retenčnímu času biotinu.



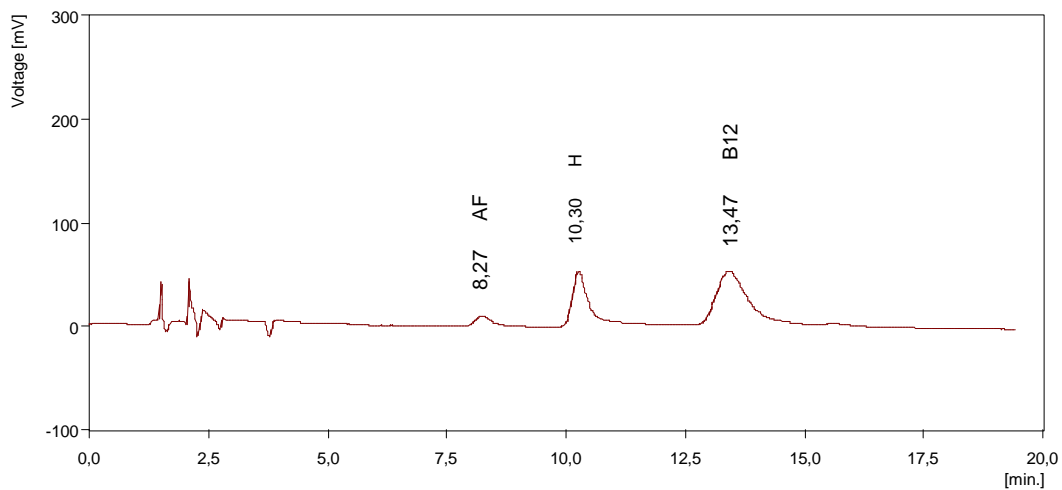
Obr. č. 31: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

	C [µg/ml]	R _t [min]
B12	1	13,36
BIOTIN	1	10,37
AF	0,2	8,19

Tab.č. 14: Retenční časy separace při pH = 3,3



Obr. č. 32: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

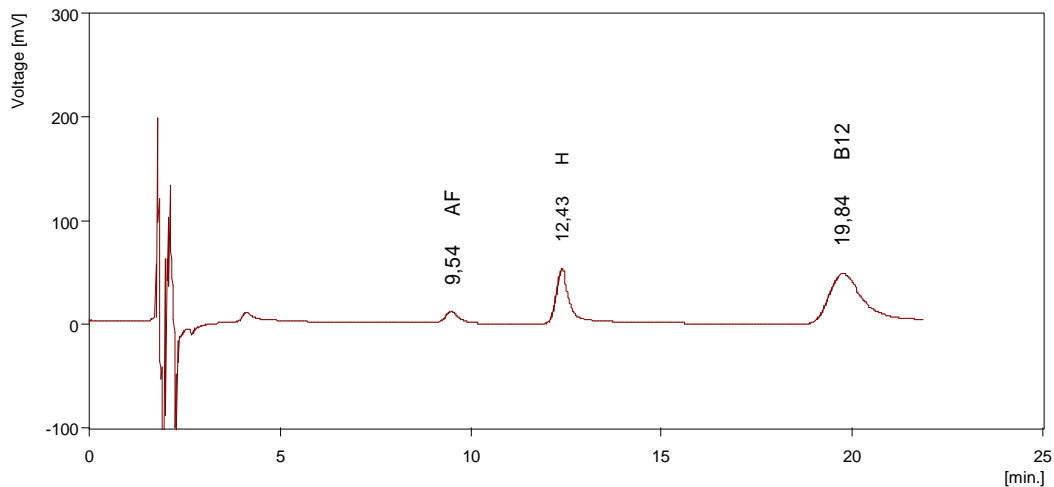
Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

	C [$\mu\text{g/ml}$]	R _t [min]
B12	1	13,47
BIOTIN	1	10,30
AF	0,2	8,27

Tab.č. 15: Retenční časy separace při pH = 3,5

Následně jsme se vrátili k původnímu složení mobilní fáze č.11, pouze s tím rozdílem, že v anorganické fázi byla použita poloviční koncentrace fosfátového pufru, a to 0,025M.

Na chromatogramu (obr. č. 33, tab. č. 16) je vidět, že snížení koncentrace pufru vede k prodloužení jednotlivých retenčních časů. Vitamín B12 se eluuje až v 19,84 min. Pík biotinu je zaznamenán s retenčním časem 12,43 min. Kyselina listová se eluuje s retenčním časem 9,54 min.



Obr. č. 33: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

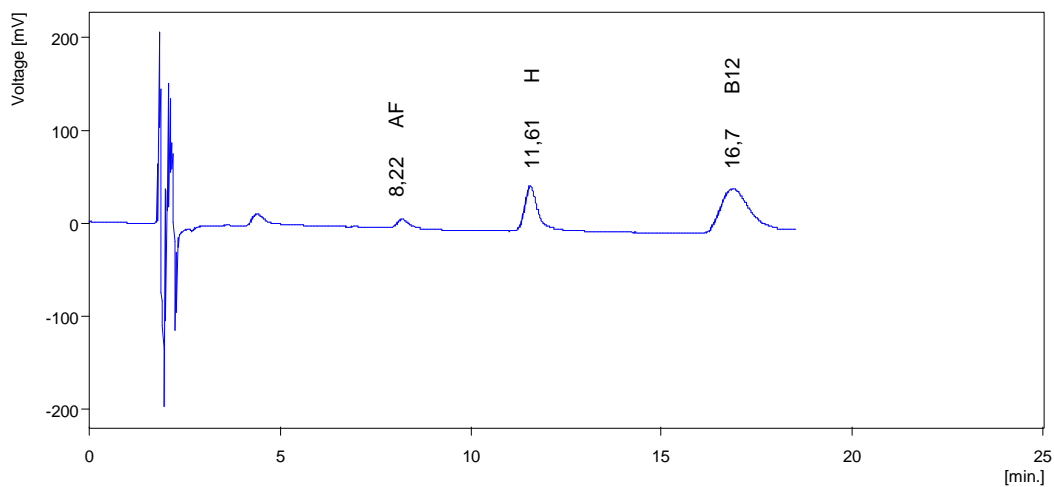
Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

	C [$\mu\text{g/ml}$]	R _t [min]
B12	1	19,84
BIOTIN	1	12,43
AF	0,2	9,54

Tab.č. 16: Retenční časy separace při použití pufru o koncentraci 0,025M

Při použití fosfátového pufru o koncentraci 0,075M došlo opět k posunutí retenčních časů všech vitamínů směrem k čelu (obr. č. 34, tab. č. 17).



Obr. č. 34: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

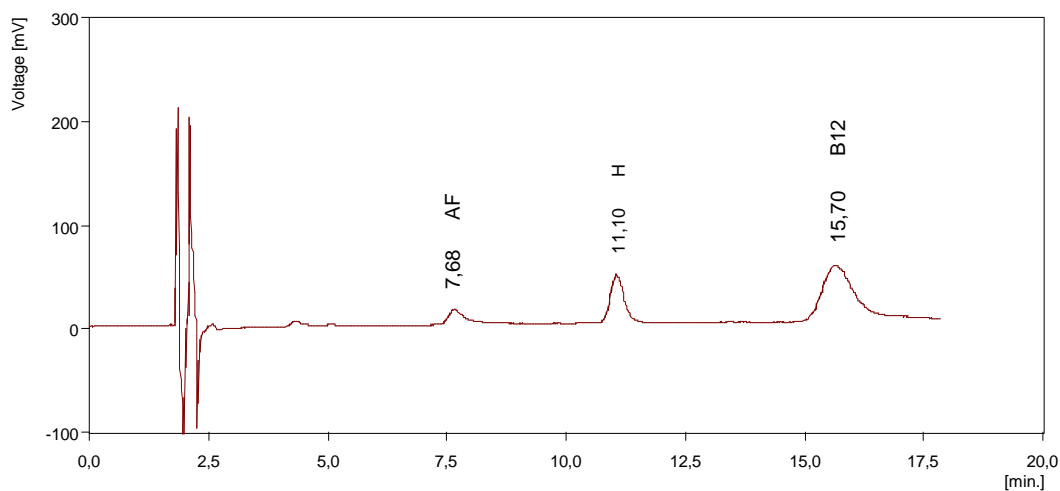
	C [$\mu\text{g/ml}$]	R _t [min]
B12	1	16,7
BIOTIN	1	11,61
AF	0,2	8,22

Tab.č. 17: Retenční časy separace při použití pufru o koncentraci 0,075M

5.4 VLIV ZMĚNY NAPĚTÍ VLOŽENÉHO NA PRACOVNÍ ELEKTRODY

Na dalších chromatografických záznamech můžeme pro srovnání vidět, jak se projeví snížení vloženého napětí na pracovní elektrody. Je patrné, že píky jsou znatelně menší a méně symetrické (obr. č. 35, 36).

$E_1 = 600 \text{ mV}$, $E_2 = 900 \text{ mV}$

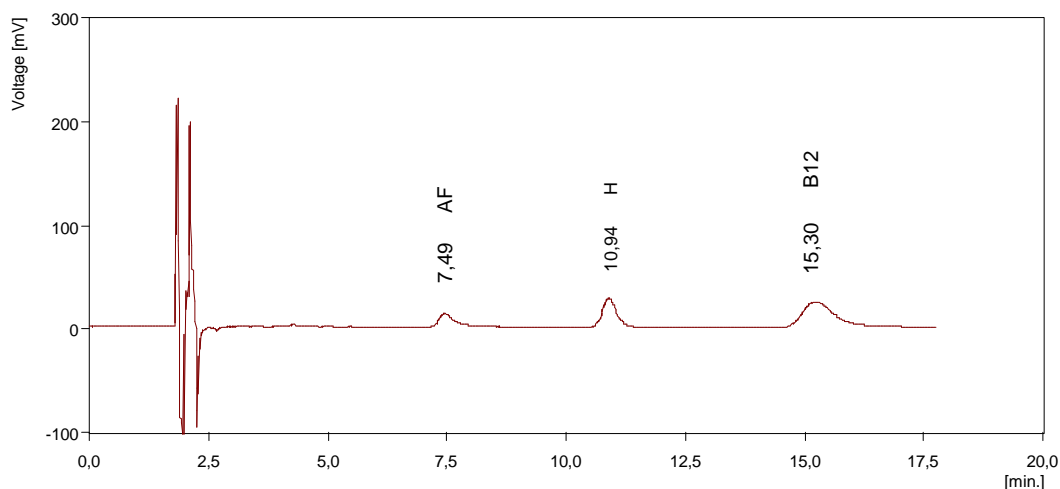


Obr. č. 35: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

$E_1 = 500 \text{ mV}$, $E_2 = 800 \text{ mV}$



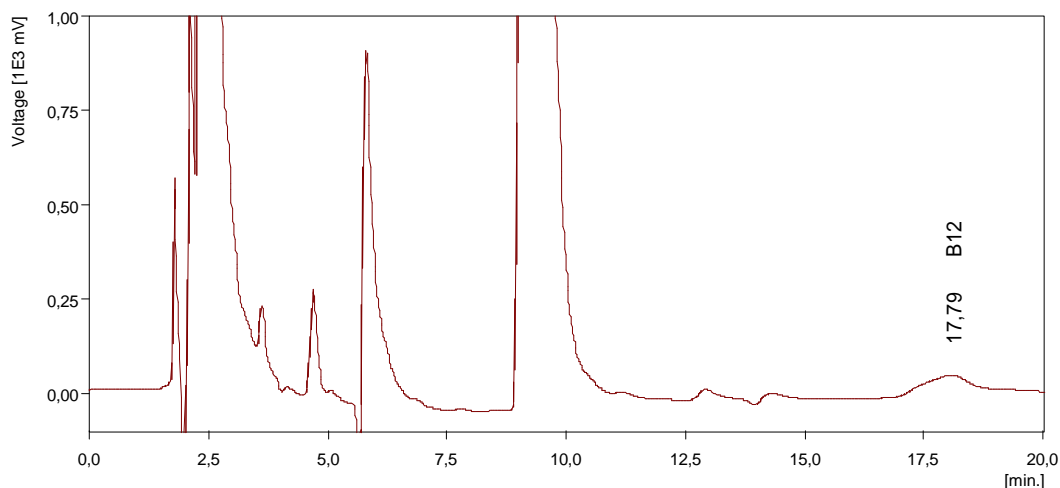
Obr. č. 36: Chromatografický záznam roztoků standardů kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

5.5 POKUSNÁ ZKOUŠKA IZOLACE VITAMÍNŮ Z VYBRANÝCH VITAMÍNOVÝCH PŘÍPRAVKŮ

Na chromatogramu (obr. č. 37) se vitamín B12 z vitamínového přípravku 5 o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ eluuje ve 17,79 min.

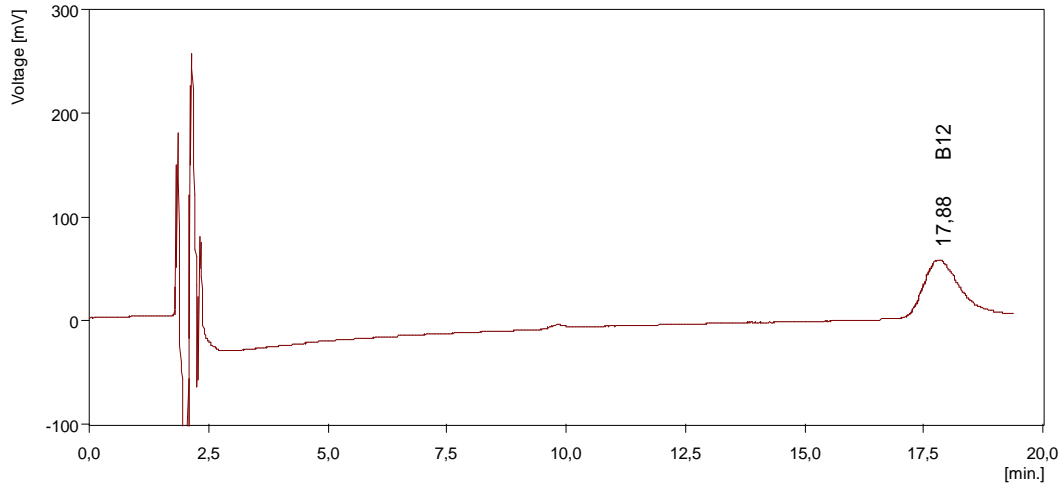


Obr. č. 37: Chromatografický záznam roztoku z vitamínového přípravku 5.

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

Na chromatogramu (obr. č. 38) se vitamín B12 z vitamínového přípravku 6 po naředění o koncentraci 50 µg/ml eluuje ve 17,88 min.

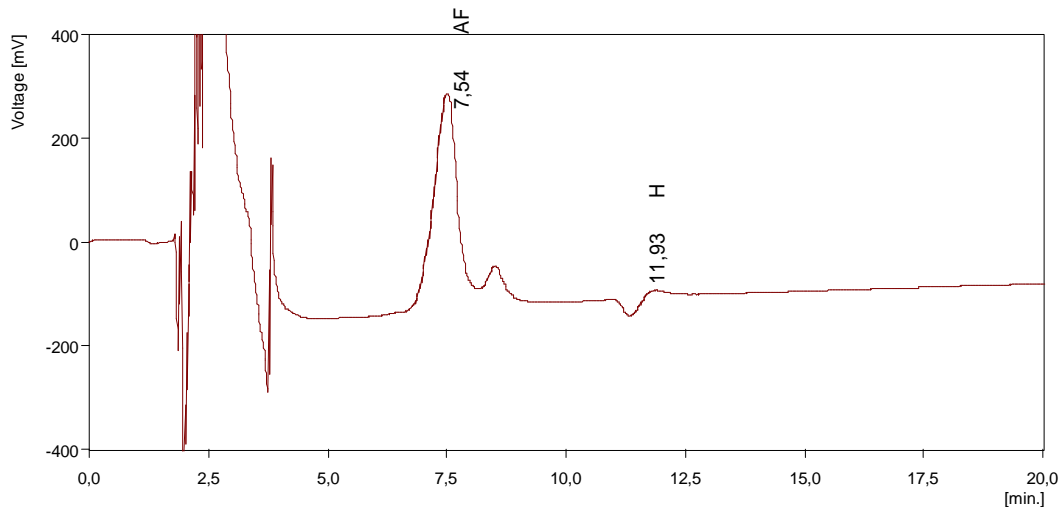


Obr. č. 38: Chromatografický záznam roztoku z vitamínového přípravku 6

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

Na dalším obrázku č. 39 vidíme chromatogram se záznamem separace extraktu z vitamínového přípravku 1. Kyselina listová se eluuje v retenčním čase 7,54 min, biotin pak v 11,93 minutě. Vitamín B12 vzhledem k velmi nízké koncentraci není zobrazen.



Obr. č. 39: Chromatografický záznam extraktu z vitamínového přípravku 1

Kolona : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Německo

Rychlost průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min, amperometrická detekce

6 ZÁVĚR

Za neoptimálnější mobilní fázi byla zvolena mobilní fáze č. 11, která obsahovala 24% methanolu, menší koncentrace organické složky snižovala eluční sílu a prodlužovala se celková doba separace. Anorganická fáze byla tvořena fosfátovým pufrům o koncentraci 0,05M a pH bylo upraveno na 3,55. Jednotlivé píky byly dostatečně odděleny, nebyla pozorována interference se studovanou maticí.

Nižší koncentrace pufru opět vedla k prodloužení eluce všech studovaných vitamínů. Záměna fosfátového pufru za acetátový se projevila menší symetričností píků.

Byl vyzkoušen i vliv pH na studované vitamíny. Z uvedeného vyplývá, že nejcitlivější na změnu pH je vitamín B12 a kyselina listová. Čím je pH mobilní fáze kyselejší, tím se uvedené látky eluují blíže startu. Také předpoklad hodnot potenciálů vložených na elektrody se ukázal jako správný ($E_1 = 600 \text{ mV}$, $E_2 = 900 \text{ mV}$).

Stále je ovšem potřeba dopracovat extrační techniku, která by umožňovala realizovat analýzu z vitamínových přípravků. Obsahují totiž značné množství kationtů a aniontů, které snadno podléhají oxidaci (redukci) a znesnadňují tak analýzu látek nacházejících se v daném přípravku v nižší koncentraci. Na základě námi provedených experimentů lze využít extrakce na tuhou fázi za využití vhodných katexů (popř. anexů) k zachycení daných iontů. Je vhodné však ověřit, zda je možné tyto postupy dostatečně standardizovat a validovat.

7 ABSTRAKT

Vitamíny jsou přírodní látky, které se nacházejí v rostlinách i živočiších. Až na několik výjimek si je lidské tělo nedokáže samo syntetizovat. Proto musí být dodávány potravou nebo potravinovými doplňky. Vitamíny jsou spolu s bílkovinami, tuky a sacharidy nezbytné pro růst, vitalitu, prevenci a léčbu mnoha zdravotních potíží a nemocí.

Denní potřeba vitamínů je velmi nízká (jen několik miligramů či mikrogramů). Tudíž metody pro separaci či stanovení vitamínů např. z potravinových doplňků musí být vysoce citlivé. Mezi takové patří i vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí.

Diplomová práce se zabývá naleznutím optimálních podmínek pro separaci kyseliny listové, biotinu a vitamínu B12. Jedná se o vitamíny skupiny B, rozpustné ve vodě. Nejčastějšími zdroji je maso, vejce, pivovarské kvasnice nebo luštěniny.

Při separaci byla použita chromatografická kolona Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μ m) od firmy Merck. Analýza probíhala s využitím elektrochemického detektoru Coulochem III. Průtoková rychlost byla 1 ml/min a napětí na pracovních elektrodách bylo 600mV a 900 mV. Citlivost detektoru byla 1 μ A.

Byla zvolena mobilní fáze obsahující 24% methanolu. Anorganická fáze byla tvořena fosfátovým pufrem o koncentraci 0,05M. pH bylo upraveno na 3,55.

8 ABSTRACT

Vitamins are natural substances found in plants and animals. With few exceptions, the human body cannot synthesize them. Consequently, they must be supplied by the diet or by dietary supplements. Vitamins are essential for the normal growth, vitality, and for the prevention and cure of many health problems and diseases together with other essential nutrients such as proteins, fatty acids and carbohydrates.

Vitamins are required only in tiny amounts by organism (micrograms or milligrams per day). Therefore, the methods for their separation and determination should be very sensitive. One possible method is the high performance liquid chromatography equipped with the electrochemical detection.

This Diploma Thesis is focused on finding of optimal conditions for separation of folic acid, biotin and vitamin B12. These water-soluble substances belong to the B group vitamins. Their main sources are meat, eggs, brewer's yeast or pulses.

The separation was carried out on chromatography column Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4.0 mm i.d., 5 μ m) obtained from Merck. The analysis was achieved by using the electrochemical detector Coulochem III with sensitivity of 1 μ A. The flow rate was set to 1 ml/min and the current inserted on the working electrodes was 600 mV and 900 mV.

The mobile phase number 11 containing 24% of methanol was established as the most suitable. The appropriate inorganic phase was composed of 50 mM phosphate buffer, pH was adjusted to 3.55.

9 POUŽITÁ LITERATURA

-
- ¹ J. Duchoň a kol., Lékařská chemie a biochemie: učebnice pro lékařské fakulty, Avicenum, Praha, 1985
 - ² Ministerstvo Zdravotnictví ČR, Český lékopis 2005, Grada Publishing, Praha, 2005
 - ³ I.N. Acworth, P. H. Gamache, The Coulometric Electrode Array For Use in HPLC Analysis, Part 1: Theory, American Lab., 1996
 - ⁴ Bonjour J-P. Biotin. In: Machlin, LJ, ed., Handbook of vitamins. Nutrition, Biochemical and Clinical Aspects. New York, NY: Marcel Dekker, Inc; 1984:403-435
 - ⁵ D.Voet, J. Voetová, Biochemie, Victoria Publishing, Praha, 1995
 - ⁶ A. Fantó, Vitamíny a prevence, Dona, České Budějovice, 1993
 - ⁷ The British Medical Association, Léky a jejich použití, Gemini, Bratislava, 1993
 - ⁸ J. Churáček et al., Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod, Academica, Praha 1993
 - ⁹ R. Karlíček a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005
 - ¹⁰ J. Klimeš a kol., Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha, 2002
 - ¹¹ Valach M., Šturdík E., Chem. Listy, 100 (2006), 330-336

-
- 12 I. N. Actworth, M. Naoi, H. Parvez, Progress in HPLC-HOCE 6 Coulometric Electrode Array Detectors for HPLC, VSP, Utrecht, The Netherlands, 1997
- 13 Parvez H., Bastart-Malsot M., Parvez S., Nagatsu T. and Carpentier G., Electrochemical Detection in Medicine and Chemistry, Progress in HPLC-HPCE, 1999
- 14 A. Zerzaňová, V. Žižkovský, R. Kučera, J. Klimeš, I. Jesenský, J. Dohnal, D. Barrón, J. Pharm. Biomed. Anal., 45 (2007) 730-735.
- 15 A. Lebiezińska, M. L. Marszałł, J. Kuta, P. Szefer, J. Chromatogr. A, 1173 (2007) 71-80
- 16 M. L. Marszałł, A. Lebiezińska, W. Czarnowski, P. Szefer, J. Chromatogr. A, 1094 (2005) 91-98
- 17 C. Vignaud, L. Rakotozafy, A. Falguières, J. Potus, J. Nicolas, J. Chromatogr., 1031 (2004) 125-133
- 18 J. Trontelj, T. Vovk, M. Bogataj, A. Mrhar, Pharmacol. Res, 52 (2005) 334-339
- 19 X. Z. Zhang, Y. R. Gan, F. N. Zhao, Anal. Chim. Acta, 489 (2003) 95-101
- 20 M. J. González de la Huebra, G. Bordin, A. Rosa Rodríguez, Anal. Chim. Acta, 517 (2004) 53-63
- 21 F. Zhao, X. Zhang, Y. Gan, J. Chromatogr. A, 1055 (2004) 109-114