

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy

Diplomová práce

Tereza Vašíčková

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.

Hradec Králové 2010

**Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

Autor práce: Tereza Vašíčková

Studijní program: Magisterský

Studijní obor: Farmacie

Imatrikulační ročník: 2004

Vedoucí práce: doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.

Oponent práce:

Datum obhajoby: 1. 6. 2010

Hodnocení:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Všechny zdroje, prameny a literatura, které jsem při vypracování používala nebo z nich čerpala, v práci řádně cituji s uvedením plného odkazu na příslušný zdroj.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Karlovu univerzitu je možné po písemném souhlasu této univerzity.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a souhlasím s tím, aby byla řádně vedena v evidenci vypůjčovatelů.

V Hradci Králové dne

podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych v první řadě ráda poděkovala vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc. za konstruktivní kritiku, která mě po celou dobu zpracování práce směřovala k závěrečným výsledkům. Dále bych chtěla poděkovat především Mgr. Kláře Petřů a PharmDr. Pavlovi Jáčovi, PhD., kteří mi pomohli s vypracováním této práce hlavně po technické stránce. Na závěr bych také chtěla poděkovat Mgr. Janu Honegrovi.

Abstrakt

V práci byla vyvinuta metoda kapilární zónové elektroforézy (CZE) s UV detekcí pro separaci a stanovení flavonoidů rutinu, hesperidinu a diosminu.

Analýza probíhala v křemenné kapiláře s efektivní délkou 50 cm, vnitřním průměrem 50 μm , při napětí -30 kV a teplotě 25°C. UV detekce byla provedena ve vlnových délkách 200 nm, 246 nm a 280 nm. Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 6 s. Celková doba analýzy < 6 minut.

Separace byla optimalizována testováním různých parametrů, jako je koncentrace základního elektrolytu, pH, přídavek organického rozpouštědla a cyklodextrinů.

Optimální složení základního elektrolytu bylo: 35 mM tetraboritan sodný s 2,5% methanolu, (pH* 9,0 bylo upraveno kyselinou boritou) a 1,5 mM α -CD. Kalibrační závislosti byly vypracovány v rozmezí koncentrací pro rutin 100,58 – 1005,80 $\mu\text{g/ml}$; $r = 0.9991$, pro hesperidin 90,33 – 903,29 $\mu\text{g/ml}$; $r = 0.9785$ a pro diosmin 45,56 – 455,60 $\mu\text{g/ml}$; $r = 0.9972$. Jako vnitřní standard byl použit propylparaben.

CZE byla aplikována na stanovení obsahu flavonoidů v potravním doplňku HEMOSTOP® PROBIO, tobolky. RSD hodnoty jsou v rozmezí 3,25% - 4,12%, $n = 3$.

Klíčová slova

Flavonoidy, rutin, hesperidin, diosmin, kapilární zónová elektroforéza, reverzní elektroosmotický tok, potravní doplněk.

Abstract

A method based on capillary zone electrophoresis (CZE) with UV detection was developed for simultaneous separation and determination of flavonoids rutin, hesperidin and diosmin.

The analysis was performed in a fused-silica capillary with effective length 50 cm, i.d. 50 μm , voltage – 30 kV and 25 $^{\circ}\text{C}$. UV detection was used at 200 nm, 246 nm and 280 nm. The samples were loaded hydrodynamically at a pressure of 50 mbar for 6 s. A single analysis took less than 6 minutes.

The separation was optimized by examining a number of experimental conditions, such as concentration of the electrolytic system, pH, addition of organic solvents and cyclodextrins.

The optimal background electrolyte consisted of 35 mM natrium tetraborate with 2.5% of methanol (adjusted to pH* 9.0 with boric acid) and 1.5 mM α -CD. The calibration graphs were linear for both rutin (100.58 – 1005.80 $\mu\text{g/ml}$; $r = 0.9991$), hesperidin (90.33 – 903.29 $\mu\text{g/ml}$; $r = 0.9785$) and diosmin (45.56 – 455.60 $\mu\text{g/ml}$; $r = 0.9972$). Propylparaben was chosen as the internal standard.

The method was applied to the assay of the flavonoids in a nutraceutical HEMOSTOP[®] PROBIO, capsules and characterized by RSD 3,25% (rutin), 4,12% (hesperidin) and 3,98% (diosmin), $n = 3$.

Keywords

Flavonoids, rutin, hesperidin, diosmin, capillary zone electrophoresis, reversed electroosmotic flow, nutraceuticals.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	10
3	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	Flavonoidy	11
3.1.1	Chemická struktura	12
3.1.2	Výskyt	12
3.1.3	Biologické účinky.....	13
3.1.4	Terapeutické využití	13
3.1.5	Analyzované flavonoidy.....	13
3.2	Elektroforéza	20
3.2.1	Elektroforéza na papíře	21
3.2.2	Elektroforéza v gelu	22
3.2.3	Elektroforéza v kapiláře - Kapilární elektromigrační metody	22
3.3	Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	27
3.3.1	Instrumentace	27
3.4	Základní elektroforetické charakteristiky	30
3.4.1	Elektroforetická pohyblivost.....	30
3.4.2	Elektroosmotický tok (EOF).....	31
3.4.3	Celková pohyblivost	33
3.4.4	Migrační čas.....	34
3.5	Děje ovlivňující separaci	35
3.5.1	Podélná molekulární difúze	35
3.5.2	Jouelovo teplo	35
3.5.3	Adsorpce.....	37
3.5.4	Elektromigrační disperze	37
3.5.5	Vliv cyklodextrinů	38
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4.1	Chemikálie a roztoky	39
4.2	Příprava roztoků	41
4.2.1	Roztoky standardů	41
4.2.2	Roztok pracovního elektrolytu	42
4.2.3	Zásobní roztoky.....	42
4.2.4	Kalibrační roztoky.....	42
4.2.5	Příprava vzorku z tablety	43
4.3	Přístroje a metodika měření	44

**Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

4.3.1	Použité přístroje	44
4.3.2	Metodika měření	45
4.4	Pracovní postup měření	46
4.4.1	Postup u přístroje PrinCE	46
4.4.2	Postup u přístroje Beckman	46
4.5	Výpočty	47
4.5.1	Limity	47
4.5.2	Opakovatelnost metody.....	47
4.5.3	Rozlišení (Rs)	48
4.5.4	Účinnost separace (počet teoretických pater).....	48
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	49
5.1.1	Optimalizace separačních podmínek.....	49
5.1.2	Vliv koncentrace BGE	50
5.1.3	Optimalizace pH.....	51
5.1.4	Vliv druhu organických rozpouštědel a jejich koncentrací.....	52
5.1.5	Vliv cyklodextrinů	54
5.1.6	Volba vnitřního standardu	55
5.1.7	Vliv teploty.....	55
5.1.8	Optimální podmínky separace.....	56
5.2	Kvantitativní analýza.....	58
5.2.1	Kalibrační závislost	59
5.2.2	Limity	62
5.3	Opakovatelnost metody.....	63
5.3.1	Rozlišení mezi píky dvou složek.....	65
5.3.2	Přídavek standardní látky za účelem identifikace složek	65
5.4	Analýza přípravku	66
5.5	Správnost metody.....	69
5.6	Srovnání výsledků DP.....	70
6	ZÁVĚRY	71
7	POUŽITÉ ZKRATKY	73
8	SEZNAM VELIČIN A JEDNOTEK	75
8.1	Použité veličiny a jejich jednotky.....	75
8.2	Vybrané vztahy použitých jednotek k základním jednotkám SI.....	75
9	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK.....	76
10	POUŽITÁ LITERATURA.....	78

1 ÚVOD

Brzy po objevu zdroje elektrického proudu - galvanických článků se lidé začali zajímat o to, co se při průchodu elektrického proudu děje v různých látkách. V roztocích a taveninách některých látek probíhají chemické reakce na rozhraní s materiálem, jímž se proud do roztoku přivádí. Tyto reakce byly nazvány elektrolýza a část chemie, která se jimi zabývá, se nazývá elektrochemie. Kromě reakcí na elektrodách se při průchodu proudu v roztocích přemísťují nabitě částice mezi elektrodami, například ionty nebo koloidní částice. Ukázalo se, že v roztocích má každý druh částic pohybujících se v elektrickém poli svou charakteristickou rychlost, což se dá využít pro analýzu či separaci směsí. Metoda, která se k tomu využívá, se nazývá elektroforéza¹.

Elektroforéza zahrnuje celý soubor procesů založených na migraci nabitých částic - iontů v stejnosměrném elektrickém poli. Po dlouhou dobu od chvíle, kdy Tiselius v roce 1937 poprvé použil elektroforézu jako analytickou metodu pro separaci bílkovin, byla efektivita separace značně omezena konvekcí a difúzí tepla. Proto byly první metody založené na separaci v takových materiálech (gelech), v jejichž prostředí byly tyto negativní procesy eliminovány. V době, kdy začaly být dostupné křemenné kapiláry s vnitřním průměrem menším než 100 μm a s prvními komerčními přístroji kapilární elektroforézy (dále jen CE), dochází k prudkému rozvoji CE metod a jejich aplikace nacházejí uplatnění v rozličných oblastech, jenž zahrnují průmyslovou, farmaceutickou, potravinářskou a biochemickou analýzu. Oproti ostatním analytickým metodám jsou výhodami CE metod vysoká separační účinnost ($N > 10^4$ až 10^6) při krátkém času analýzy, malý objem dávkovaného vzorku (1 – 50 μl), možnost volby mezi několika operačními módy (CZE, CITP, MEKC, CGE, CEC, CIEF – zkratky vysvětleny v příslušných kapitolách) a snadná optimalizace metod².

-
- 1 GAŠ, B. Kapilární elektroforéza: Separací analytická metoda pro věk mikročipů. Vesmír 80, 370-373, 2001. Dostupný z [www: http://www.cts.cuni.cz/vesmir](http://www.cts.cuni.cz/vesmir), [cit. 2010-01-01].
 - 2 DUŠEK, M. Využití kapilární elektroforézy v analýze potravin. Praha, dizertační práce, 2004. 141 s.

Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy

V této diplomové práci je řešen problém separace látek ze skupiny flavonoidů (konkrétně rutin, hesperidin a diosmin), které jsou obsaženy v komerčně vyráběném přípravku HemoStop ProBio. Přípravek se řadí k potravním doplňkům.

Diplomová práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část. V teoretické části jsou uvedeny základní charakteristiky flavonoidů obecně a stručný přehled jednotlivých analyzovaných bioflavonoidů. Dále jsou zde charakterizovány separační metody se zaměřením na metodu kapilární zónové elektroforézy (dále jen CZE). Na závěr teoretické části jsou uvedeny fyzikálně-chemické jevy doprovázející CZE spolu s výpočty, které jsou důležitým vodítkem pro výpočty v další experimentální části práce.

V experimentální části práce je řešena samotná problematika separace rutinu, hesperidinu a diosminu. Aby bylo možné jednotlivé flavonoidy kvalitativně i kvantitativně charakterizovat, bylo nutné najít optimální podmínky separace. Samotné měření bylo zahájeno hledáním optimálního pH a následovalo hledání vhodné koncentrace základního elektrolytu. Z výsledků vyplynulo, že analýza bude efektivnější při obráceném elektroosmotickém toku (dále jen EOF). Dále jsem zkoušela různá rozpouštědla a následně jsem hledala koncentraci, při které dochází k nejlepšímu rozdělení flavonoidů. Pro lepší tvar píků jsem zkoušela různé cyklodextriny a v různých koncentracích. Optimalizace metody končila hledáním vhodného vnitřního standartu. V závěrečné fázi jsem podrobila zkouškám samotný přípravek HemoStop ProBio.

V rámci kapitoly Výsledky a diskuze je řešen problém separace analytů, optimalizace a validace metody a její aplikace na analýzu potravního doplňku.

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem práce je vypracovat metodu vhodnou pro separaci a stanovení flavonoidů rutinu hesperidinu a diosminu pomocí kapilární zónové elektroforézy a její aplikace na potravní doplněk HemoStop ProBio.

3 TEORETICKÁ ČÁST

V teoretické části je uvedena stručná charakteristika flavonoidů - jejich chemická struktura, výskyt, biologické účinky, terapeutické využití a detailnější popis rutinu, hesperidinu a diosminu. Jsou zde také uvedeny výsledky rešerše o dosud publikovaných důležitých metodách pro analýzu studovaných analytů.

Současně teoretická část charakterizuje metodu, která byla použita k jejich separaci, tj. kapilární zónová elektroforéza. Pro ilustraci a srovnání jsou v textech uvedeny i příbuzné metody (ITP, CGE, MEKC, CEC, IEF - zkratky vysvětleny v příslušných kapitolách). Tato část diplomové práce pokračuje detailním rozбором kapilární zónové elektroforézy konkrétně v provedení s obráceným elektroosmotickým tokem. Jsou zde popsány základní části elektroforetického přístroje, fyzikálně – chemické veličiny CZE a jevy doprovázející separaci analyzovaných látek.

3.1 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří velmi početnou skupinu přírodních látek obsažených v různých částech vyšších rostlin, zejména v listech, květech a plodech. Jejich ubikvitární přítomnost v rostlinné říši je známa botanikům a rostlinným fyziologům po dobu několika století. Objev jejich chemické identity se datuje do první poloviny 19. století³.

Účinky těchto látek na zdraví byly spontánně využívány po staletí ve formě bylinných čajů nebo byly použity pro praktiky lidového léčitelství. Flavonoidy hrají mezi účinnými látkami přední roli, neboť jsou z přírodních sloučenin nejrozšířenější, nejpočetnější a vyskytují se ve všech rostlinách⁴.

Flavonoidních látek je v současné době známo více než 4000 a stále se nacházejí další sloučeniny. Slovo flavonoid vzniklo z latinského slova flavus, česky žlutý. Flavonoidy řadíme mezi rostlinná barviva rozpustná ve vodě. Jsou to důležité antioxidanty a jejich hlavní funkcí je ochrana rostliny před UV zářením a volnými radikály⁵.

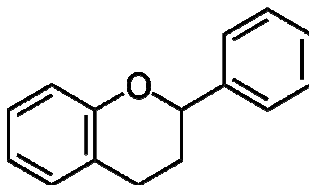
3 BÖHM, K. Die Flavonoide. Eine Übersicht über ihre Physiologie, Pharmakodynamik und therapeutische Verwendung. Auledorf i. Würth : Ed. Cantor KG, 1967. 1545 s.

4 ZLOCH, Z. Krátká historie bioflavonoidů. Přírodní antioxidanty a volné radikály. 2003. Dostupný z www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/LL_08AC.doc, [cit. 2010-01-01].

5 GÁBOR, M. Abriss der Pharmakologie von Flavonoiden. Budapest: Akademie Kiadó, 1975. 1355 s.

3.1.1 Chemická struktura

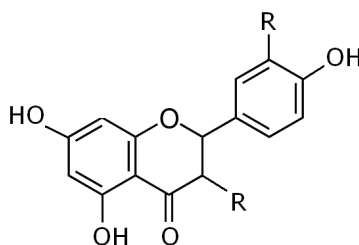
Flavonoidy jsou z chemického hlediska polyfenolické sloučeniny. Všichni zástupci mají společnou chemickou strukturu – jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu (C6-C3-C6), tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace⁶.



Obrázek č. 1 – Vzorec flavanu

Podle struktury dělíme flavonoidy do několika podskupin: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony, anthokyanidiny, flavanoly (katechiny a proanthokyanidiny)⁶.

Analyzované flavonoidy, tzn. rutin, hesperidin a diosmin jsou odvozeny od struktury 2-fenylchromanu.



Obrázek č. 2 – 2-fenylchroman

3.1.2 Výskyt

Flavonoidy jsou všeobecně rozšířené a pro některé čeledi typické. Vyskytují se v ovoci i zelenině, kde se akumulují v různých orgánech.

V rostlinách se vyskytují převážně jako β -glykosidy (obsahují ve své molekule aglykon a cukernou složku). Sacharidovou složkou je nejčastěji glukosa nebo rhamnosa, případně

6 VFU. Brno, 2001. Dostupné z [www: http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html](http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html), [cit. 2006-02-13].

glukuronová kyselina, galaktosa nebo jiný sacharid. Tato jejich forma je hydrofilní a proto se vyskytuje ve vakuolách buněk.

Volné aglykony – methoxylované nebo hydroxylované se vyskytují pouze zřídka. Tato jejich forma je lipofilní a vyskytuje se především v kutikule listů⁶.

3.1.3 Biologické účinky

Flavonoidy mají výraznou antioxidační aktivitu, snižují patologicky zvýšenou propustnost a lomivost kapilár, jsou antihemorhagické, antiedematozní, hypotenzivní a antithrombotické. Také působí protizánětlivé, antialergicky, hepatoprotektivně, spasmolyticky, diureticky, antibakteriálně, antivirově a cytostaticky (prokázáno pouze in vitro) a snižují hladinu cholesterolu. Ovlivňují také činnost srdce a potencují účinek vitamínu C⁶.

3.1.4 Terapeutické využití

Čisté látky se používají jako venofarmaka k léčbě kapilárních a žilních onemocnění, k léčbě lomivosti kapilár (kůže, dásně, sítnice), na hemoroidy a k léčbě žilní a lymfatické nedostatečnosti⁶.

Hemoroid (zkomoleně hemeroid) je onemocnění cévního systému, které spočívající v rozšíření a zánětu žíly v konečníku.

3.1.5 Analyzované flavonoidy

V rámci této diplomové práce jsem provedla separaci rutinu, hesperidinu a diosminu v přípravku HemoStop ProBio, kde jsou součástí tzv. bioflavonoidového hesperidinového komplexu. HemoStop ProBio je kombinovaný přípravek již zmiňovaného komplexu flavonoidů, probiotik a prebiotik. Přípravek je určen k léčbě zánětů, trhlinek a bolesti v oblasti konečníku a tlustého střeva. Díky obsahu flavonoidních látek působí na posílení a pružnost cévních stěn. V kombinaci s probiotiky a prebiotiky upravuje činnost tlustého střeva a tím celkově zlepšuje zažívání.

Rutin

Systematický název: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4,5-dihydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-
[(3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl)oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-
chromen-7-one

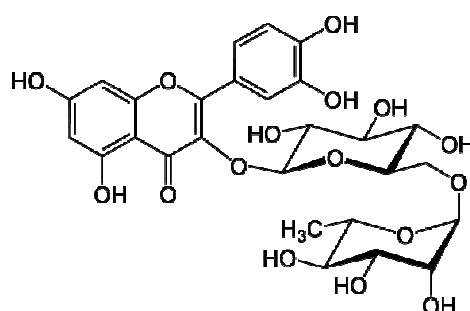
Sumární vzorec: $C_{27}H_{30}O_{16}$

Vzhled: světle žlutá pevná látka (při 25 °C, 100 kPa)

Identifikace: registrační číslo CAS 153-18-4

Molární hmotnost: 610,52 g/mol

pK_{a1} ; pK_{a2} ; pK_{a3} 7,1; 9,15; 11,65⁷



Obrázek č. 3 – Rutin

Rutin je látka světle žluté barvy, částečně rozpustná ve vodě. Jeho aglykon se nazývá quercetin a cukerná část rutinosa (β -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukosa).

Rutin byl objeven v roce 1842 v listech routy vonné. Mezi nejvýznamnější zdroje rutinu patří pohanka obecná, ruta vonná a jerlín japonský. Dále se rutin vyskytuje v chřestu, ve slupkách rajčat, v kůře citrusových plodů, v jablečné slupce, v broskvích, nektarinkách, lesních plodech, kiwi, banánech a také ve výluhu zeleného a černého čaje.

Má řadu pozitivních zdravotních účinků. Mezi jeho největší přínosy patří především schopnost léčit křehkost krevních kapilár a zvyšovat pružnost cév. Snižuje LDL cholesterol. Také je významná jeho antioxidační aktivita a s tím související antikarcinogenní účinky a schopnost zhaset volné radikály. Zesiluje účinek vitamínu C⁸.

7 JOVANOVIĆ, S. V., STEENKEN, S., TOSIĆ, M. et al: JOURNAL OF AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 116, 4846 - 4851, 1994.

8 Wikipedia: Otevřená encyklopedie. 2009. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Rutin>, [cit. 2009-07-23].

Metody pro stanovení rutinu:

Pro stanovení a separaci rutinu se nejčastěji používá vysoce účinná kapalinová chromatografie (dále jen HPLC) v různých módech s využitím různých způsobů detekce. Pro kombinaci HPLC s diode array detektorem (dále jen DAD) byly nastaveny tyto separační podmínky:

- Kolona: Agilent Eclipse XDB C-18 (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m).
- Podmínky separace: gradientová eluce 0.4% vodnou kyselinou fosforečnou a acetonitrilem (dále jen ACN).
- Detekce: vlnové délky 280 and 360 nm⁹.

Relativně nová metoda detekce rutinu v rostlinném materiálu je druh kapalinové chromatografie – Microemulsion Liquid Chromatography (dále jen MELC).

- Kolona: ASB C-18 (150 mm x 4.6 mm, i.d., 5 μ m).
- Podmínky separace: 1.0% (w/w) brij35-1.1% (w/w) n-butanol-0.1% (w/w) n-octanol-0.3% (v/v) triethylamine, pH = 2.5 (upraveno pomocí kyseliny fosforečné).
- Detekce: 340 nm¹⁰.

Další možnou metodou pro detekci je CZE. Analyzovaný materiál byl čínský bylinný čaj.

- Podmínky separace: fosfátový pufr s přidavkem β -CD, detekce trvala 20 minut.
- Detekce: ampérometrická¹¹.

9 HONG-JIANG, Ch., et al. Simultaneous Determination of Eleven Bioactive Compounds in Saururus chinensis from Different Harvesting Seasons by HPLC-DAD. JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS [online]., 5, 1142 - 1146, 2010. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=6&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=1, [cit. 2010-03-15].

10 NING, L., et al. Simultaneous Determination of Four Flavonoids in Extract of Hawthorn Leaves by Microemulsion Liquid Chromatography. CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY [online]. 12, 1791 - 1794, 2009. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=10&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=3[cit. 2010-03-15].

11 LANGZHU, Ch., et al. Simultaneous Determination of Flavonoids and Phenolic Acids in Chinese herbal tea by Beta-cyclodextrin Based Capillary Zone Electrophoresis. MICROCHIMICA ACTA [online]. 3-4, 179 – 185, 2009. Dostupný z www: <http://www.microchimica.com> <Simultaneous determination of flavonoids and phenolic acids in Chinese herbal tea by beta-cyclodextrin based capillary zone electrophoresis>, [cit. 2010-03-15].

Hesperidin (Hesperidinum)

Systematický název: (E)-3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-[2-hydroxy-6-methoxy-4-
[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-
trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyphenyl]prop-
2-en-1-one]

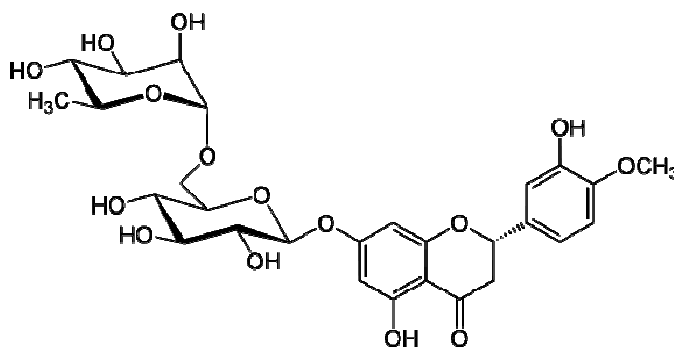
Sumární vzorec: $C_{28}H_{34}O_{15}$

Vzhled: světle žlutý prášek (při 25 °C, 100 kPa)

Identifikace: registrační číslo CAS 520-26-3

Molární hmotnost: 610.56056g/mol

pK_{a1} ; pK_{a2} ; pK_{a3} - pK_{a8} 9,56; 10,17; >12,36¹²



Obrázek č. 4 - Hesperidin

Hesperidin se hojně vyskytuje v citrusových plodech. Jeho aglykon se nazývá hesperetin. Současné studie odhalují jeho nové farmakologické vlastnosti. Při podávání krysám hesperidin snižuje hladinu cholesterolu, snižuje krevní tlak a snižuje ztrátu hustoty kostí. Na lidský organismus působí protizánětlivě, pomáhá k udržení integrity krevních kapilár a působí dokonce i sedativně (pravděpodobně díky adenosinovým nebo opioidním receptorům). V in vitro studiích bylo prokázáno jeho antioxidační působení¹³.

Z farmakologických vlastností (popsaných u lidí) můžeme zmínit např. pozitivní vliv na hladinu cholesterolu. Konkrétně – redukuje hladinu celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triacylglycerolů a naopak zvyšuje hladinu HDL cholesterolu. Hesperidin také normalizuje krevní tlak, zlepšuje mikrocirkulaci a pomáhá při hojení vředů. V praxi se nejčastěji používá k léčbě chronické žilní insuficience³.

12 SERRA,H., MENDES, T., BRONZE, M. R. et al: Prediction of Intestinal Absorption and Metabolism of Pharmacologically Active Flavones and Flavanones. BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY 16, 4009-4018, 2008.

13 Wikipedia: The Free Encyclopedia. 2009. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Hesperidin>, (přeloženo z anglického originálu), [cit. 2009-07-23].

Metody pro stanovení hesperidinu:

Při stanovování hesperidinu se nejčastěji používá HPLC a její různé obměny. Například kombinace HPLC-DAD-ESI-MS (High-Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detection - Mass Spectrometry Method with Electrospray Ionization Mode) byla použita k analýze plodů *Lycium barbarum* (Kustovnice obecná).

- Kolona: Vydac C18.
- Podmínky separace: gradientová eluce s mobilní fází o složení: 0.5% (v/v) kyselina formová ve vodě a vodný ACN (94:6, v/v), teplota 30°C.
- Detekce: 280 nm¹⁴.

Pomocí kombinace LC-PDA (Liquid Chromatography - Photodiode Array) a LC-MS (negative Electrospray Ionization - Tandem Mass Spectrometry) byl stanovován obsah hesperidinu v extraktu z pomerančovníku (*Citrus aurantium L.*).

- Kolona: A C18.
- Podmínky separace: gradientová eluce methanol-voda¹⁵.

Analýza jednotlivých složek citrusového džusu pomocí CE.

- Podmínky separace: 35 mM pufr sodium borate s obsahem 5% ACN (o pH 9,3), 21 kV a 23 °C, separace trvala 20 minut.
- Detekce: UV¹⁶.

14 INBARAJ, B. S., et al. Simultaneous Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS. JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS [online]. 3, 549 - 556, 2010. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=13&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=2, [cit. 2010-03-15].

15 LEE, S., et al. Liquid Chromatographic Determination of Narirutin and Hesperidin in Zhi Ke (*Citrus aurantium L.*) in the Form of the Raw Herb and of the Dried Aqueous Extract. JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL [online]. 3, 78- - 796, 2009. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=13&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=6, [cit. 2010-03-15].

16 CANCALON P.F. Analytical Monitoring of Citrus Juices by using Capillary Electrophoresis. JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL [online]. 1, 95 - 106, 1999. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=16&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=5&doc=41, [cit. 2010-03-15].

Diosmin (Diosminum)

Systematický název: 5-Hydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)- 7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one

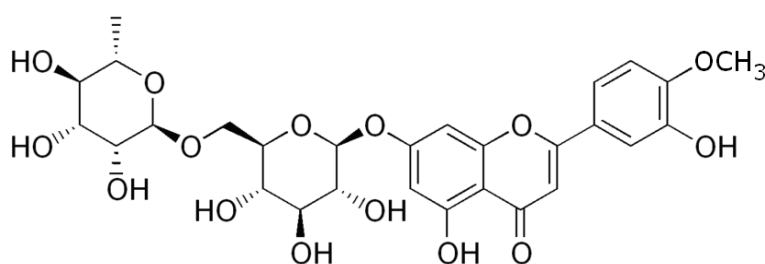
Sumární vzorec: $C_{28}H_{32}O_{15}$

Vzhled: žluto-hnědý prášek (při 25 °C, 100 kPa)

Identifikace: registrační číslo CAS 520-27-4

Molární hmotnost: 608.545 g/mol

pK_{a1} ; pK_{a2} ; pK_{a3} - pK_{a8} 9,39; 10,07; >12,36¹².



Obrázek č. 5 – Diosmin

Diosmin se vyskytuje volně v přírodě nebo se jednoduše získává syntézou z hesperidinu. Poprvé byl izolován v roce 1925 z krtičníku hlíznatého (*Scrophularia nodosa*). K terapii byl poprvé použit v roce 1969. Používá se k léčbě žilních onemocnění např. chronické žilní nedostatečnosti, k léčbě hemoroidů (akutních i chronických) a k léčbě lymfedému. Stejně jako ostatní flavonoidy má protizánětlivé, antioxidační a protirakovinné účinky. Působí prostřednictvím noradrenalinových receptorů ve stěnách cév jako vazokonstriktor. To znamená, že snižuje žilní objem, roztažitelnost a stázi. Nepřímo tímto mechanismem zvyšuje žilní návrat a snižuje žilní hypertenzi – to je důležité zejména pro pacienty trpící chronickou žilní nedostatečností¹⁷.

Diosmin dále zlepšuje odtok lymfy, ke kterému dochází díky zvýšené frekvenci a zesílení intenzity stahů lymfatických cév a redukci exprese některých adhezivních proteinů (VCAM-1, ICAM-1). Tím inhibuje adhezi, migraci a aktivaci leukocytů. To vede ke sníženému uvolňování mediátorů zánětu, hlavně volných kyslíkových radikálů a prostaglandinů³. V současné době je v některých zemích používán jako doplněk stravy.

¹⁷ Wikipedia: The Free Encyclopedia 2009. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Diosmin>, (přeloženo z anglického originálu) [cit. 2009-07-23].

Metody pro stanovení diosminu:

Jako u předchozích dvou flavonoidů i separace a stanovení diosminu se provádí nejčastěji pomocí HPLC. Konkrétně v provedení 2D-HPLC se stanovovaly obsahové látky rostliny *Lobelia chinensis*.

- Kolona: nejprve CN kolona pro jednorozměrnou HPLC a poté následovala ODS kolona.
- Detekce: nejprve pomocí PDA a poté byly výsledky porovnány s kvadrupólovým MS s ESI (Multimode Ion Source) a APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)¹⁸.

Další možností je separace pomocí MEKC (micellar electrokinetic chromatography).

- Podmínky separace: napětí 25 kV, teplota 25°C, pufr 15 mM borát, 30 mM sodium dodecyl sulfát (SDS) a 10% (v/v) ethanol při pH=10,5.
- Detekce: UV při 275 nm¹⁹.

18 ZHOU, Y., et al. Two-dimensional Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry for the Analysis of *Lobelia chinensis* Lour. using an ESI/APCI Multimode Ion Source. JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE [online]. 13, 2388 - 2394, 2008. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=24&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=2, [cit. 2010-03-15].

19 ZHANG, Y., et al. Simultaneous Determination of Flavonoids in *Ixeridium gracile* by Micellar Electrokinetic Chromatography. JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS [online]. 5, 742 - 746, 2007. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=24&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=3, [cit.2010-03-15].

3.2 Elektroforéza

Elektroforézu neboli migraci iontů v elektrickém poli poprvé zavedl do praxe ve Švédsku roku 1937 Arne Wilhem Kaurin Tiselius (1902 – 1971), švédský chemik a biochemik, který za výzkum elektroforézy a adsorpční analýzy, zvláště za objevy týkající se komplexní povahy sérových bílkovin získal v roce 1948 Nobelovu cenu.

Elektromigrační dělicí metody označované jako elektroforéza využívají rozdílné rychlosti putování (migrace) jednotlivých složek dělené směsi v elektrickém poli. Lze je aplikovat jen na látky povahy elektrolytů tvořené ionty ať už nízkomolekulárními nebo vysokomolekulárními (např. proteiny) a na systémy elektricky nabitých koloidních částic. Migračním prostředím je vodivý roztok elektrolytů, který je buď náplní kolony nebo je uspořádán plošně. Roztok je v kontaktu s přívodními elektrodami proudového zdroje.

Hybnou silou, která uvádí nabité částice do pohybu definovaným směrem, je intenzita elektrického pole E , vyjádřená spádem (gradientem) napětí v jednotkách $V.m^{-1}$. Sílu působící pohyb jednotlivé částice vystihuje součin intenzity pole a velikosti náboje částice.

Proti pohybu částic působí jako brzdivá síla tření v kapalném prostředí, podmíněné jeho viskozitou. Třecí síla při pohybu kulovité částice je přímo úměrná jejímu poloměru a viskozitě kapaliny (Stokesův zákon). V reálných podmínkách elektroforézy má pouze charakter korelace.

Je zřejmé, že hybná i brzdivá síla působí na jednotlivé druhy iontů diferencovaně podle jejich náboje a velikosti. Skutečná migrační rychlost je výsledkem interakce uvedených vlivů. Pokud je u jednotlivých složek směsi rozdílná, vede k jejich prostorovému oddělení²⁰.

²⁰ HARVEY, D. Modern Analytical Chemistry. McGraw – Hill Higher Education. Boston, 2000. 816 s. ISBN 0–07–116953–9.

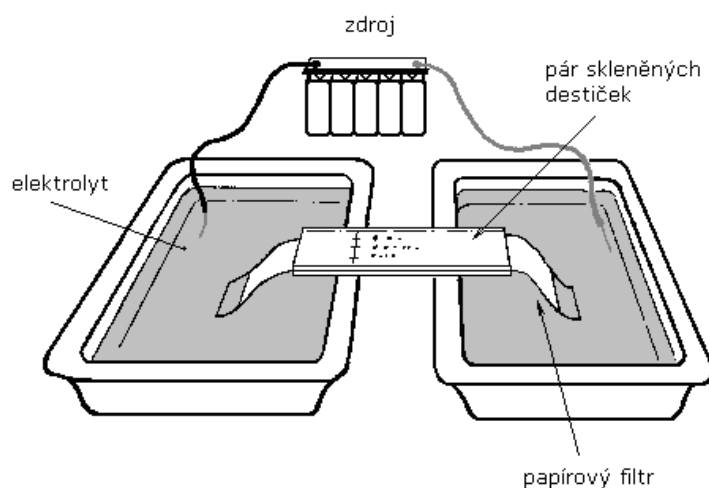
Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy

Elektroforéza nejčastěji probíhá:

- a) na papíře,
- b) v gelu,
- c) v kapiláře²¹.

3.2.1 Elektroforéza na papíře

Vzorek se ve formě tečky nanese na pruh papíru nebo acetátcelulosy, navlhčený pufr. Konce pruhu se ponoří do oddělených elektrodoých prostorů, obsahujících vhodný pufr. Po zapojení stejnosměrného proudu putují ionty vzorku určitou rychlostí k opačně nabitým elektrodám a vznikají zóny odpovídající jednotlivým složkám vzorku²⁰.

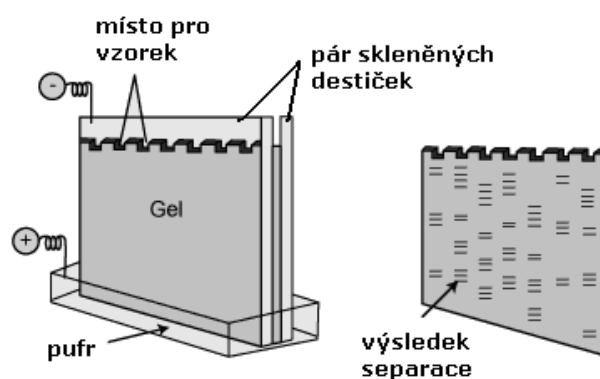


Obrázek č. 6 – Schéma elektroforézy na papíře

21 Elektroforetické techniky. 2005. Dostupné z: www.sci.muni.cz/LMFR/proteomika2005/Bi8202_2005_ELFO.pdf, [cit. 2009-12-08].

3.2.2 Elektroforéza v gelu

Mechanismus gelové elektroforézy je velmi podobný jako mechanismus elektroforézy probíhající na papíře. Nejčastěji se používají gely polyakrylamidové, používané hlavně pro separaci nebo analýzu proteinů, agarosové, sloužící pro separaci nebo analýzu DNA, a směsi polyakrylamidu a agarosu, díky nimž lze spolehlivě separovat proteiny o vysokých M_r (200 kDa a víc)²².

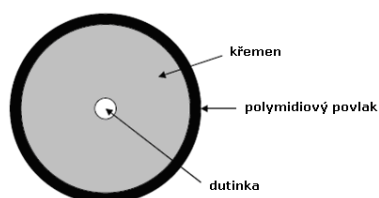


Obrázek č. 7 – Schéma elektroforézy v gelu

3.2.3 Elektroforéza v kapiláře - Kapilární elektromigrační metody

Separace nejčastěji probíhá v kapilárách vyrobených z taveného křemene a to díky jeho chemické a elektrické neutralitě, propustnosti UV záření, flexibilitě a nízké ceně. Vnitřní průměr kapilár se pohybuje v rozmezí od 25 do 100 μm .

Oba konce kapiláry jsou ponořeny do nádobek s elektrolytem (do tzv. vialek). Ve vialkách jsou kromě konců kapilár ponořeny i elektrody vysokonapěťového zdroje. Tím je v kapiláře vytvořeno elektrické pole, které je hybnou silou separace.



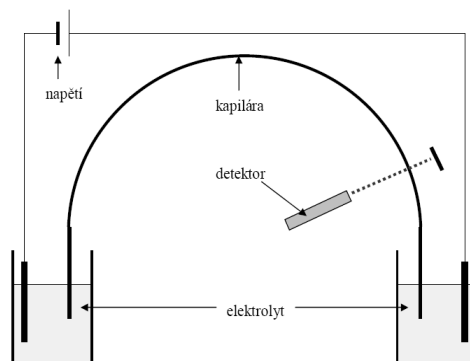
Obrázek č. 8 – Příčný řez kapilárou

22 FRÉBORT, I. Elektroforéza proteinů. 2000 Dostupné z [www: http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/1.%20Elektroforeza%20proteinu.pdf](http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/1.%20Elektroforeza%20proteinu.pdf) [cit. 2010-03-18].

Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy

K rozdělení analytů dochází v kapiláře, která dosahuje délky několik desítek centimetrů. Na počátek kapiláry je nastříknut vzorek analytů a ty potom putují k elektrodám, kde je přítomen detektor a záznamové zařízení²³.

Mezi výhody kapilární elektroforézy patří její vysoká efektivita, velmi nízká spotřeba vzorku, možnost automatizace a nízká spotřeba reagensů. Lze ji také využít ke kvantitativní analýze²⁴.



Obrázek č. 9 – Schéma CZE

V průběhu několika let se ze základní metody kapilární elektroforézy oddělilo několik variant. Mezi ty základní patří:

- isotachoforéza (ITP),
- kapilární gelová elektroforéza (CGE),
- micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC),
- kapilární elektrochromatografie (CEC),
- kapilární isoelektrická fokusace (IEF),
- kapilární zónové elektroforéza (CZE) – viz samostatná kapitola.

Separční principy jednotlivých variant jsou odlišné a proto metody jako CZE, ITP a IEF lze využít pouze pro separaci iontů, kdežto metody typu MEKC a CEC lze s výhodou využít i pro separaci nenabítených částic. Tyto metody se také široce uplatňují v chemických, farmaceutických i biologických analýzách. Dále se tyto metody mohou využít ke stanovení důležitých fyzikálně – chemických konstant, jakými jsou disociační konstanty, konstanty stability, limitní pohyblivosti atd.²⁵.

23 PLAČEK, L. Základy kapilární elektroforézy (CE, HPCE). 2004. Dostupné z [www: <placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CEzakl.pdf>](http://www.placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CEzakl.pdf), [cit. 2009-08-12].

24 DOLNÍK, V. Úvod do kapilární elektroforézy. Brno: AV ČR a společnost Chromspec, 1994.

25 MIKUŠ, P.; VALÁŠKOVÁ, I.; HAVRÁNEK, E. Talanta 65 . 2005: 1031 s.

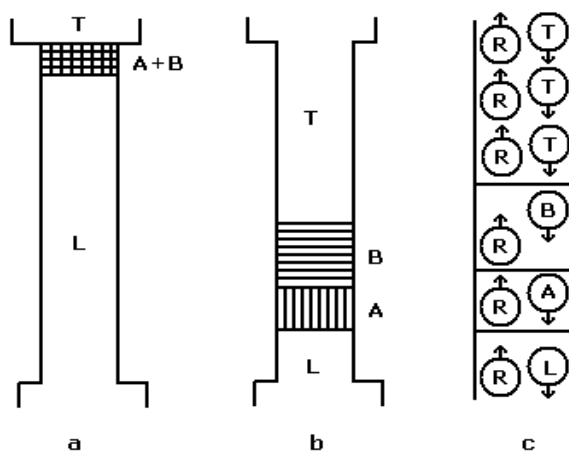
3.2.3.1 Kapilární izotachoforéza (C) ITP = (Capillary) Isotachopheresis

CTIP dělí ionty na základě jejich rozdílných elektroforetických mobilit, kdy roztok dělených iontů je dávkován jako rozhraní dvou rozdílných pufrů (elektrolytů).

První pufr – před vzorkem – se nazývá vedoucí (leading). Obsahuje iont mající stejný náboj a větší elektroforetickou pohyblivost než všechny separované ionty. Druhý pufr – za vzorkem – se nazývá uzavírající (terminating) a obsahuje iont stejného znaménka jako separované ionty, ale má nejmenší elektroforetickou pohyblivost.

Každý separovaný iont vytváří během analýzy svoji vlastní zónu. Zóny všech dělených iontů jsou tedy uzavřeny mezi vedoucí a uzavírající elektrolyt a jsou seřazeny bezprostředně za sebou podle jejich klesající elektroforetické pohyblivosti.

CTIP je použitelná pouze pro molekuly s nábojem (ionty). Během jednoho experimentu lze dělit a detekovat pouze jeden druh iontů (kladné nebo záporné)²⁶.



a - počáteční stav: A + B - dělená směs, L – vedoucí (leading), T – koncový ion (terminating),
b - ustálený stav (jsou patrné jednotlivé zóny),
c - rozložení a migrace iontů v zónách v ustáleném stavu; R – protiion s pufráčním účinkem.

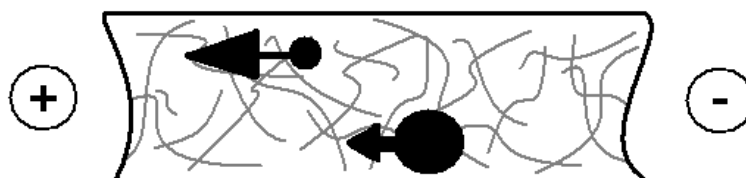
Obrázek č. 10 – Schéma ITP

26 COUFAL, P. Capillary Electro-separations, CES. 2004. Dostupný z [www: http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.html](http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.html), [cit. 2009-03-30].

3.2.3.2 Kapilární gelová elektroforéza (C)GE = (Capillary) Gel Electrophoresis

Jak již z názvu vyplývá, při této metodě jsou kapiláry naplněny gelem, který zvyšuje rozdíly mezi elektroforetickými rychlostmi jednotlivých iontů různých tvarů, jež jsou nuceny migrovat daným směrem póry gelu. Přítomnost gelu zabraňuje vzniku EOF a proto jen jeden druh kladných či záporných iontů putuje směrem k detektoru.

Z výše uvedeného je zřejmé, že CGE je použitelná pouze pro ionty a v praxi se využívá zejména pro velké ionty, jakými jsou např. peptidy, bílkoviny, sacharidy, štěpy DNA a RNA. Gelová elektroforéza je také často využívána ke stanovení čistoty a stupně degradace izolované DNA²⁵.



Obrázek č. 11 – Schéma CGE

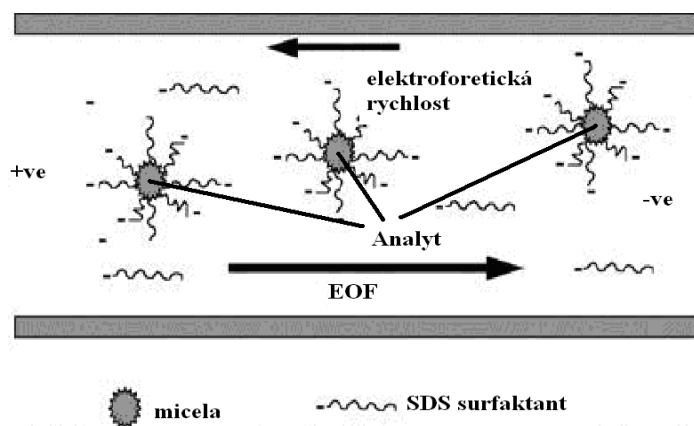
3.2.3.3 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC) MECC = Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

MEKC dělí nabitě a především neutrální (hydrofobní a hydrofilní) molekuly na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi vodní a micelární fázi.

Do vodného pufru (vodná fáze) je přidána povrchově aktivní látka (detergent, např. SDS = sodium dodecylsulphate = dodecylsírán sodný), která vytváří v pufru micely, které tvoří tzv. micelární, pseudostacionární fázi. Povrchově nabitě micely migrují uvnitř pufru vlastní elektroforetickou rychlostí a unášejí molekuly a ionty separovaných sloučenin, které jsou více či méně přítomny uvnitř hydrofobních dutin (kavit) micel. Všechny micely migrují stejnou rychlostí, ale stupeň interakce molekul s micelami udává rychlost unášení těchto molekul micelami. Elektroosmotický tok pufru unášejí micely a molekuly/ionty všech separovaných látek směrem k detektoru.

Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy

MEKC je použitelná pro neutrální molekuly a ionty¹⁷.



Obrázek č. 12 – Schéma MECC

3.2.3.4 Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (C)EC = (Capillary) Electrochromatography

CEC je hybridní technologie kombinující principy CE a HPLC. Jako kolony jsou používány kapiláry (50 – 100 mm I.D.), které jsou plněny mikročásticemi stacionární fáze o rozměrech 1,5 – 5 mm. Pro posun mobilní fáze kolonou není používáno čerpadlo, jako je tomu u HPLC, ale aplikace stejnosměrného napětí, které vyvolává elektroosmotický tok. V koloně probíhá separace na stejných principech jako v HPLC.

CEC je metoda vhodná pro separaci neutrálních částic, ale i pro separaci nabitých částic různé chemické povahy²⁷.

3.2.3.5 Kapilární izoelektrické fokusování (C) IEF = (Capillary) isoelectric focusing

CIEF je metoda, která slouží pro separaci amfolytů (aminokyseliny, peptidy, proteiny), které existují ve formě kationtů, anionů nebo elektricky neutrálních látek v závislosti na pH prostředí. Při izoelektrické fokusaci dochází k oddělení látek v migračním prostředí s pH gradientem na základě rozdílných hodnot izoelektrických bodů. V místě, kde je pH prostředí rovno pI analytu se látka stane elektroneutrální, dále se v elektrickém poli nepohybuje. Tvoří zkoncentrované zóny, fokusuje²⁶.

27 KLOUDA, P. Moderní analytické metody. 2003. 132 s.

3.3 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Metoda byla vyvíjena od počátku 80. let (Jorgensen a Lukacs) a první komerční přístroj pro tuto metodu se začal používat v roce 1988.

CZE je nejjednodušší formou kapilární elektroforézy. Je pro ni typické použití jediného pracovního elektrolytu (BGE, background). V celé kapiláře je tedy konstantní elektrické pole. Vzorek se dává jako roztok, do určitého místa migračního prostoru, ve formě úzké zóny. Po nadávkování vzorku do kapiláry se oba její konce ponoří do nádobek s elektrolytem, ke kterým se připojí stejnosměrné vysoké napětí. Za normálních podmínek se konec kapiláry obsahující nadávkovaný vzorek připojuje k anodě a konec s detektorem ke katodě. Analyty se pohybují ke katodě různými rychlostmi, které jsou závislé na jejich elektroforetické pohyblivosti a pohyblivosti elektroosmotického toku. Zároveň se kationty oddělují od aniontů a vzniká tak řada prostorově odlišených zón jednotlivých složek původní směsi. Tyto zóny si však bohužel nezachovávají původní šířku a ostré rozhraní. Vlivem difúze se časem rozšiřují a jejich okraje ztrácejí na ostroty. Tím se koncentrace v zónách snižuje a stává se nerovnoměrnou. Jakmile dojde k rozdělení na jednotlivé zóny, může dojít k analytickému vyhodnocení pomocí detekčního zařízení. Látky migrují kapilárou dále, až všechny projdou určitým místem, kde je detekční cela. Záznam analýzy, jenž se nazývá elektroforeogram, reprezentuje závislost odezvy určitého detektoru na čase²¹.

3.3.1 Instrumentace

V laboratořích můžeme vidět mnoho elektroforetických přístrojů od různých výrobců. Jejich princip je vždy stejný a je až obdivuhodně jednoduchý.



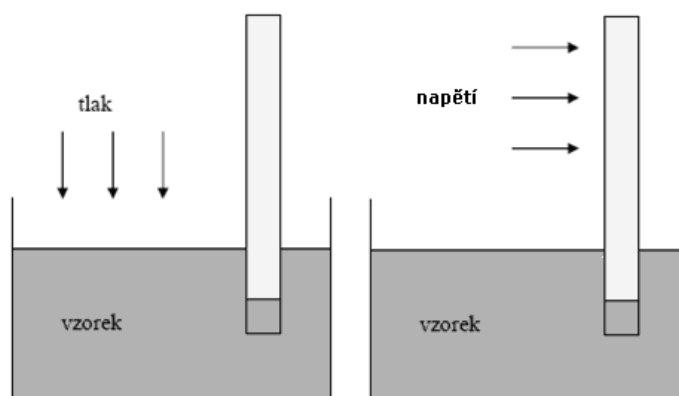
Obrázek č. 13 - Používané přístroje: Beckman Coulter, PrinCE

3.3.1.1 Kapiláry

Nejběžnějším používaným materiálem pro výrobu kapilár je tavený křemen, a to díky své chemické a elektrické neutralitě, propustnosti UV záření, flexibilitě a nízké ceně. Jelikož je kapilára z taveného křemene velmi křehká, proto bývá pokrývána vrstvou polyamidu. Vnitřní průměr kapilár se pohybuje v rozmezí 10 – 100 μm , obvykle však 25 – 75 μm . Nejčastější vnější průměr je 350 – 400 μm . Běžná délka kapilár se pohybuje v rozmezí 50 – 75 cm ²³.

3.3.1.2 Nástřik vzorku

Nástřik vzorku se nejčastěji provádí dvojím způsobem. Vždy se jeden konec kapiláry (ten, co je dál od detektoru) zasune do roztoku s analyty a tlakem (hydrodynamicky), nebo vloženým napětím (elektrokineticky) se nadávkuje krátká zóna vzorku do kapiláry. Kapilára se poté znovu ponoří do vialky s elektrolytem²³.



Obrázek č. 14 - Mechanismy dávkování vzorku

3.3.1.3 Vkládané napětí

Na oba konce kapiláry se vkládá stejnosměrné elektrické pole, které je realizováno konstantním napětím nebo konstantním proudem. Jednotlivé složky vzorku, nadávkované na počátek kapiláry, migrují při vhodně zvoleném napětí. Polarita napětí nabývá kladných nebo záporných hodnot. Kladnou hodnotu má v případě, je-li katoda blíže detektoru. Naopak záporná hodnota vypovídá o tom, že blíže detektoru je anoda. Jednotlivé složky v závislosti na velikosti napětí a polaritě putují k detektoru různou rychlostí. Zóny složek se rozdělí, ale jsou zároveň částečně rozmývány²³.

3.3.1.4 Detektor

Pro detekci analytů v CZE je v současné době používáno mnoho metod. Jako detekční systém se používá nejčastěji zdroj UV záření, jehož svazek paprsků je veden přes kapiláru na monochromátor a na detekční a vyhodnocovací zařízení, které generuje závislost absorpce na vlnové délce a čase. Drtivá většina analyzovaných látek v kapilární elektroforéze je schopna absorbovat záření v UV nebo viditelné oblasti spektra²⁶.

Takové detektory zpravidla měří absorpenci při několika fixních či nastavitelných vlnových délkách, popř. lze využít detektor s diodovým polem (DAD), díky kterému lze získat absorpční spektrum roztoku. UV/VIS detekci lze úspěšně využít v módech přímé i nepřímé detekce.

Jiné používané způsoby detekce jsou:

- vysoce senzitivní fluorescenční detekce,
- detekce založená na vysoce univerzální elektrické vodivosti,
- velmi citlivé metody hmotnostní spektrometrie,
- LIF (Laser Induced Fluorescence) nebo
- amperometrická detekce²³.

Záznam neboli elektroferogram (elektroforegram, elektroforeogram) je tedy závislost absorpce při dané vlnové délce na čase (viz obrázek č. 6). Čas, kdy dojde analyt k detektoru, se nazývá migrační čas.

3.4 Základní elektroforetické charakteristiky

3.4.1 Elektroforetická pohyblivost

Princip separace nabitých částic v roztoku pomocí elektroforézy je závislý na jejich rozdílném pohybu v elektrickém poli. Rychlost částice v elektrickém poli lze vyjádřit rovnicí:

$$v_{ef} = \mu_{ef} \cdot E$$

Kde je:

v_{ef} elektroforetická rychlost [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$],

E intenzita elektrického pole [$\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$],

μ_{ef} konstanta úměrnosti nazývaná elektroforetická pohyblivost [$\text{m}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$], pro tuto konstantu platí rovnice:

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi \cdot \eta \cdot r}$$

Kde je:

q náboj částice [C],

η viskozita kapaliny [$\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$],

r poloměr částice [m].

Elektroforetická pohyblivost se primárně dělí na absolutní pohyblivost (μ_a) a efektivní pohyblivost (μ_{ef}). Absolutní pohyblivost je hodnota vyjadřující pohyb částice v nekonečně zředěném roztoku. V reálném roztoku se ovšem částice vzájemně ovlivňují, proto jsou hodnoty jejich pohyblivosti rozdílné od absolutní pohyblivosti. Mluvíme tedy o efektivní pohyblivosti. Její číselná hodnota je vždy menší než hodnota absolutní pohyblivosti (je to dáno již zmiňovanými interakcemi mezi částicemi).

Efektivní pohyblivost lze ovlivnit složením migračního prostředí (tedy roztoku, ve kterém se částice pohybují – migrují). V roztocích silných elektrolytů považujeme hodnotu efektivní pohyblivosti za konstantu (při dané teplotě a pH). V roztocích slabých elektrolytů je hodnota efektivní pohyblivosti závislá na stupni disociace (α). Platí tedy vztah:

$$\mu_{ef} = \mu_a \cdot \alpha$$

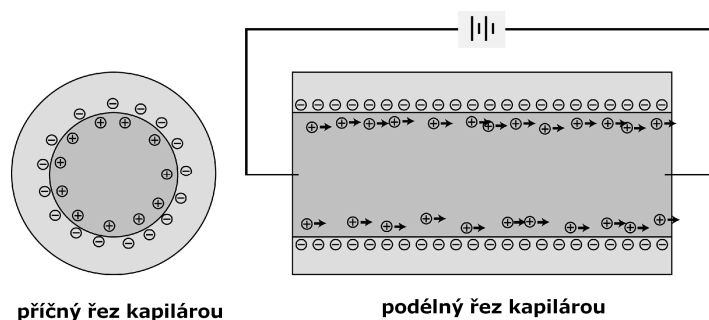
Předchozí tři rovnice můžeme shrnout takto:

- Elektroforetická pohyblivost je přímo úměrná náboji částice a nepřímo úměrná poloměru částice a viskozitě prostředí.
- Elektroforetická pohyblivost je rychlost, jakou se ionty vlivem elektrického pole pohybují (neionizované částice mají tedy nulovou pohyblivost)²⁸.

3.4.2 Elektroosmotický tok (EOF)

Elektroosmotický tok (nebo také elektroosmóza) je děj, který způsobuje pohyb elektrolytu v kapiláře směrem ke katodě působením elektrického pole.

Vzniká díky náboji na vnitřní stěně kapiláry. Vnitřní povrch kapiláry je vyroben z taveného křemene a obsahuje velké množství silanolových skupin (Si-OH), které v závislosti na pH pracovního elektrolytu disociují na záporně nabitě ionty (Si-O)⁻. Díky tomu jsou kationty z roztoku pufru (většinou kovové kationty) přitahovány k těmto iontům. Některé jsou přitahovány tak pevně, že vytvoří tzv. vnitřní (pevnou) vrstvu. Další ionty jsou také přitahovány, ale již menšími silami - tvoří druhou, vnější (mobilní) vrstvu, která bývá většinou širší. V odborné literatuře můžeme pro tuto vrstvu najít pojem Guy-Chapmanova vrstva. Obě tyto vrstvy dohromady jsou nazývány Sternova dvojvrstva. Na rozhraní těchto dvou vrstev se tvoří elektrokinetický (ζ - zeta) potenciál. Kationty z vnější mobilní vrstvy jsou taženy směrem ke katodě, a protože jsou solvatovány, strhávají s sebou i molekuly rozpouštědla a tím způsobují elektroosmotický tok.



Obrázek č. 15 – Grafické znázornění EOF

Analyza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy

Pro EOF je charakteristická jeho rychlost a pohyblivost. Rychlost EOF (v_{eof}) je dána vztahem:

$$v_{eof} = \mu_{eof} \cdot E$$

Kde je:

μ_{eof} elektroosmotická pohyblivost tlumivého roztoku [$m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$],

E intenzita elektrického pole [$V \cdot m^{-1}$].

Pohyblivost EOF (μ_{eof}) je definována vzorcem:

$$\mu_{eof} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4\pi \cdot \eta}$$

Kde je:

ε dielektrická konstanta základního elektrolytu,

ζ zeta potenciál,

η viskozita roztoku pufru [$N \cdot s \cdot m^{-2}$].

Velmi důležitou charakteristikou EOF je zeta potenciál (ζ), který je přímo úměrný náboji, jenž nese kapilární stěna (tento náboj je závislý na pH). Lze tedy shrnout, že velikost EOF je velmi silně závislá na pH. Při velmi nízkém pH (menším než 2) je vnitřní povrch kapiláry nenabitý, což vede k tomu, že ζ potenciál a rychlost EOF se limitně blíží nule a analýza tudíž neprobíhá. Jak pH postupně vzrůstá, roste ζ potenciál, rychlost EOF a analýza se postupně zrychluje. Dále je ζ potenciál přímo úměrný šířce dvojvrstvy. Zvýšení iontové síly roztoku pufru (zvýšení pH) přináší větší koncentraci kationtů v roztoku a tím dochází k zúžení dvojvrstvy. Následkem toho se sníží EOF.

Ovlivnění elektroosmotického toku je jedna ze základních možností, jak lze ovlivnit separaci. Prvním faktorem je pH. Při vysokém pH je EOF příliš rychlý, což má za následek krátký čas pro separaci analytů. Druhým faktorem ovlivňující EOF je iontová síla pufru, která ovlivňuje disociační rovnováhy elektrolytu i silanolových skupin na vnitřním povrchu kapiláry. Z dalších faktorů lze jmenovat teplotu (která mění viskozitu), organický modifikátor (selektivně mění zeta potenciál a viskozitu) nebo surfaktant²⁸.

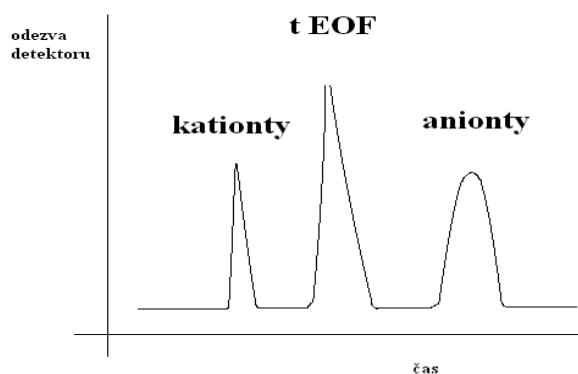
3.4.3 Celková pohyblivost

Celková rychlost (v_{tot}) látky je výslednicí její elektroforetické rychlosti a rychlosti elektroosmotického toku.

$$v_{tot} = v_{ef} + v_{eof}$$

Za normálních podmínek a při klasickém uspořádání kapilární elektroforézy nejrychleji migrují kationy, protože k jejich mobilitě se přičítá mobilita EOF. Přitom malé, vysoce nabitě kationty migrují před většími, méně nabitými kationty. Neutrální látky migrují jako jediná zóna, přičemž jejich rychlost a mobilita je rovna rychlosti a mobilitě EOF. Nejpomaleji migrují kapilárou anionty, neboť vektor jejich rychlosti je opačný proti vektoru EOF, tedy vlastně migrují proti toku. Zdánlivě nejpomalejší tedy budou malé vysoce nabitě anionty. V případě, že μ_0 (aniontu) je větší než μ_{eof} , anionty vymigrují z kapiláry a nedojdou vůbec k detektoru¹³.

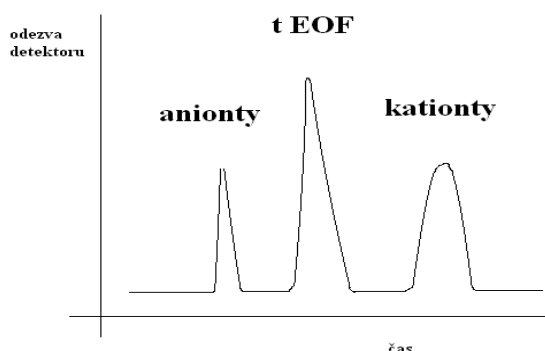
Schematické znázornění pořadí migrujících analytů vypadá takto:



Obrázek č. 16 – Schéma migrace při CZE s normálním EOF

Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy

V tak zvaném reverzním uspořádání elektroforézy je pořadí migrace iontů opačné. Směr EOF je tedy opačný. Toho docílíme přidávkem kationaktivních tenzidů, jako např. CTAB (cetyltrimethylammonium bromid) nebo didodecyldimethylamonium bromid. Kromě tenzidů se používají i kationaktivní polyelektrolyty (např. polybrene). Mechanismus účinku spočívá v tom, že se tenzidy svým pozitivně nabitým koncem molekuly kovalentně naváží na disociované silanolové skupiny kapiláry a na jejich uhlíkatý skelet se hydrofobní interakcí naváže druhá vrstva tenzidu, jejíž pozitivně nabitý konec tvoří novou – tentokrát kladně nabitou – vrstvu na vnitřním povrchu kapiláry²⁸.



Obrázek č. 17 – Časové schéma migrace při reverzní CZE

3.4.4 Migrační čas

Elektroforetickou pohyblivost analytu ani elektroosmotickou pohyblivost nemůžeme měřit přímo experimentálně, ale musíme je zjistit nepřímo pomocí migračního času t_m .

$$t_m = \frac{l}{v_{tot}}$$

Kde je:

l efektivní délka kapiláry,

v_{tot} celková rychlost.

Zkrácení migračního času a tudíž i zkrácení celé analýzy lze dosáhnout například zvýšením napětí nebo zkrácením kapiláry nebo ovlivněním EOF (viz výše).

Kvalitativní charakteristiky elektroforézy jsou migrační čas a elektroforetická pohyblivost. Naopak plocha výsledného píku odráží kvantitativní analýzu²⁶.

3.5 Děje ovlivňující separaci

Při elektromigraci se v kapiláře uplatňují další jevy, které významně ovlivňují průběh separace. Mezi nejdůležitější z nich patří:

- Podélná molekulární difúze.
- Jouelovo teplo.
- Adsorpce.
- Elektromigrační disperze.
- Vliv cyklodextrinů.

3.5.1 Podélná molekulární difúze

Podstatou podélné molekulární difúze (česky rozmývání) je různá rychlost molekul analytu v jednotlivých zónách. Rychlost disperze je nepřímo závislá na velikosti molekuly – tzn. čím menší je molekula, tím vyšší je její disperzní koeficient a tím rychleji je vymývána za zóny. Díky tomuto jevu se rozšiřují (rozmývají) zóny analytů a tudíž se deformují výsledné píky. Disperze tedy významně ovlivňuje jak citlivost kapilárních elektromigračních metod, tak účinnost elektroforetického systému. Je přirozenou součástí CZE a nelze ji odstranit.

3.5.2 Jouelovo teplo

S rostoucím napětím podle Ohmova zákona roste i elektrický proud:

$$I = \frac{U}{R}$$

Kde je:

I elektrický proud [A],

U elektrické napětí [V],

R elektrický odpor [Ω].

Pokud elektrický proud nekoná mechanickou nebo chemickou práci, energie se bez užítu přeměňuje na teplo:

$$P = U \cdot I$$

Kde je:

P příkon [W],

U elektrické napětí [V],

I elektrický proud [A]

a zároveň platí:

$$W = P \cdot t = U \cdot I \cdot t = I^2 \cdot R \cdot t$$

Kde je:

P příkon [W],

t čas, za který byla energie spotřebována [s],

U elektrické napětí [V],

I elektrický proud [A],

R elektrický odpor [Ω],

W práce vykonaná při přenosu energie - tzv. Jouleovo teplo [J].

Průchod elektrického proudu kapilárou způsobuje proto zahřívání jejího obsahu. Tento ohřev je limitujícím faktorem pro používání vysokých elektrických napětí při snaze o zrychlení analýzy. Jouleovým ohřevem se zvyšuje střední teplota zón, což má za následek jak ovlivnění mobility migrujících analytů. Tak může dojít k destrukci termolabilních látek, případně k vypařování organické části tlumivého roztoku, což vede k přerušení analýzy.

Další problémy plynou z toho, že teplo vzniká v celém průměru kapiláry, ale odváděno je pouze na okrajích, kde se elektrolyt stýká se stěnami kapiláry. Tím je dáno, že vnitřní část sloupce elektrolytu v kapiláře má vyšší teplotu než jeho okrajové části. Přítomnost teplotních gradientů má za následek nehomogenitu mobility, hustoty, pH atd. Vzhledem k teplotní závislosti mobilit je vliv ohřevu na rozmývání zřejmý¹³.

3.5.3 Adsorpce

Vzhledem k tomu, že na upravených stěnách křemenných kapilár (ale i teflonových a obzvláště pak skleněných kapilár) jsou vždy po naplnění elektrolytem přítomny ionizované skupiny, dochází k hromadění opačně nabitých analytů v blízkosti stěn separační kapiláry. Stěny se pak vůči separovaným iontům chovají jako ionex, což vede ke zvýšené sorpci obzvláště u makromolekul s malými difúzními koeficienty. Tato sorpce vede obvykle k rozmývání separovaných zón, projevující se silným chvostováním píků. Sorbované látky mohou změnit rozložení náboje podél stěn separační kapiláry a tím lokálně ovlivnit elektroosmotický tok. To vede k rozmývání zón separovaných látek a případně až k znemožnění analýzy. Tyto jevy lze ovlivnit změnou pH pracovního elektrolytu anebo lépe deaktivací stěn kapiláry¹³.

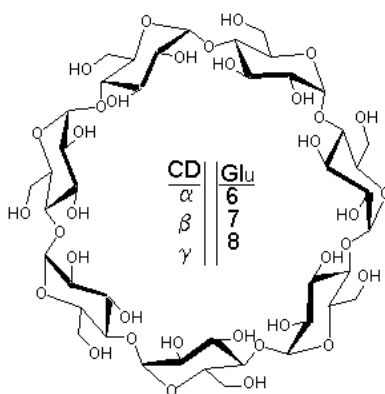
3.5.4 Elektromigrační disperze

Rozdíl v pohyblivosti analytu a iontu pracovního elektrolytu způsobuje asymetrii elektroforetického píku. Má-li analyt větší pohyblivost, je v jeho zóně nižší intenzita elektrického pole. Pokud ionty na čelním rozhraní opouštějí difúzní zónu, dochází k jejich urychlení a čelní rozhraní je plošší, než by odpovídalo prostému vlivu elektromigrační disperze (tzv. fronting). Pokud ionty ze zadního rozhraní opustí zónu, jsou urychleny a vráceny zpět.

Podobným mechanismem vzniká asymetrie (tzv. chvostování, tailing) při migraci analytu pomalejšího než co-ion pracovního elektrolytu. Zóna analytu o stejné elektroforetické pohyblivosti (jako ion BGE) není elektromigrační disperzí ovlivněna¹³.

3.5.5 Vliv cyklodextrinů

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy skládající se z několika (nejčastěji z šesti až osmi) α -1,4D-glukopyranózových jednotek. Vznikají enzymatickou degradací škrobu. Jejich výhoda spočívá v tom, že díky speciálnímu tvaru tvoří inkluzivní komplexy, tzn. tvoří kavity (dutinky), do kterých jsou vázány organické i anorganické molekuly. Tímto jevem selektivně ovlivňují rychlost migrace dané látky. Cyklodextriny se přidávají do roztoku vzorku.



Obrázek č. 18 – Prostorové uspořádání CD

Závěrem této kapitoly bych se chtěla zmínit o některých změnách základních parametrů, kterých lze při CE měnit hned několik. Jediným cílem těchto změn je dosažení dokonalejší separace. Optimální hodnoty jsou totiž vždy důsledkem kompromisu. Pro ilustraci uvádím některé z používaných změn v základních parametrech CE.

- Zmenšení průměru kapiláry umožňuje použití vyššího napětí (lepší odvod tepla). Zvýší se rozlišení a sníží doba analýzy. Snížením průměru se ale sníží tloušťka optické dráhy detektoru, tím poklesne citlivost detekce.
- Prodloužení kapiláry umožňuje opět použití vyššího napětí, avšak prodlouží se doba analýzy, vyšší difúze.
- Důležitá je volba vhodného pufru; s rostoucí iontovou silou roste vodivost, ale i produkce tepla.
- Rozlišení roste s vloženým napětím, ale je limitováno možností odvádění generovaného tepla.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části diplomové práce jsou zaznamenány postupy pro separaci rutinu, hesperidinu a diosminu a aplikaci CZE na analýzu přípravku HemoStop ProBio.

4.1 Chemikálie a roztoky

Analyty:

- Diosmin 95%, Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., ($M_r = 608,56$),
- Hesperidin 80%, Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., ($M_r = 610,57$),
- Rutin hydrate 95 %, Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., ($M_r = 610,52$),
- HemoStop ProBio, Da Vinci Academia, Výrobce: Simply you, a.s., CZ, složení: 405 mg diosminu, 45 mg hesperidinu, 20 mg rutinu, inulin 100 mg, vitamín C 107 mg, vitamín E (α -TE) 3,4 mg, Lactobacillus acidophilus $1,5 \cdot 10^8$, Bifidobacterium bifidum $4,5 \cdot 10^8$, Bifidobacterium longum $4,5 \cdot 10^8$ (v jedné tobolce).
Navážky standardů při přípravě roztoků byly korigovány čistotou suroviny.

Složky BGE:

- Kyselina boritá p.a., Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., ($M_r = 61,83$),
- Tetraboritan sodný p.a., Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., ($M_r = 381,7$).

Vnitřní standardy (IS):

- Propylparaben p.a., Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., ($M_r = 180,2$),
- Methylparaben p.a., Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., ($M_r = 152,15$),
- Kyselina benzoová p.a., Fluka, ($M_r = 122,12$),
- Kyselina sorbová p.a., Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., ($M_r = 112,12$),
- Kyselina 2-naftoxyoctová p.a., Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., ($M_r = 186,21$).

Cyklodextriny (CD):

- α -cyklodextrin p.a., Fluka, ($M_r = 972,86$),
- β -cyklodextrin p.a., Fluka, ($M_r = 1135,00$),
- γ -cyklodextrin p.a., Fluka, ($M_r = 1297,14$).

**Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

Rozpouštědla:

- Methanol p.a., Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., (Mr = 32,04),
- Ethanol p.a., Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., (Mr = 46,07),
- Dimethylsulfoxid p.a., Sigma-Aldrich, Praha s.r.o., (Mr = 78,13),
- Isopropylalkohol p.a., Penta a.s., Praha, (Mr = 60,10).

Ostatní chemikálie:

- NaOH p.a., Ing. Petr Švec, Penta a.s., Praha,
- Hexadimethrine bromide p.a., Sigma-Aldrich, Praha s.r.o.

4.2 Příprava roztoků

Pro přípravu všech roztoků byla použita ultračistá voda připravená zařízením Millipore MileQRG.

4.2.1 Roztoky standardů

Do 50 ml odměrné baňky jsem navážila přesně asi 100 mg rutinu, přidala jsem 5,0 ml dimethylsulfoxidu (DMSO), doplnila jsem po rysku methanolem (MeOH) a nechala jsem vzniklý roztok cca 10 minut rozpouštět na ultrazvukové lázni ($c = 2 \text{ mg RU/ml}$).

Stejný postup jsem použila při přípravě standardního roztoku hesperidinu ($c = 2 \text{ mg HE/ml}$).

Na přípravu standardního roztoku diosminu jsem navážila přesně 50 mg diosminu, přidala jsem 25,0 ml DMSO a po rysku jsem doplnila ethanolem. Roztok jsem cca 10 minut nechala rozpouštět na ultrazvukové lázni ($c = 1 \text{ mg DI/ml}$).

Složení zásobních roztoků standardů shrnuje následující tabulka:

Tabulka 1 – Složení zásobních roztoků standardů ($V=50 \text{ ml}$)

Rozpouštědlo (OR)	Rutin (n=100 mg) % (V/V) OR	Hesperidin (n=100 mg) % (V/V) OR	Diosmin (n=50 mg) % (V/V) OR
DMSO	5,0 ml 10	5,0 ml 10	25,0 ml 50
MeOH	45 ml 90	45 ml 90	X 0
EtOH	X 0	X 0	25,0 ml 50

Z těchto roztoků jsem připravila pracovní roztok standardů ve složení 5 ml standardního roztoku diosminu, 2,5 ml standardního roztoku hesperidinu, 2,5 ml standardního roztoku rutinu a do 10 ml odměrné baňky. Tento roztok sloužil jako vzorek při optimalizaci metody. Pracovní roztok standardů obsahoval 0,5 mg/ml DI, 0,5 mg/ml HE, 0,5 mg/ml RU a 30% (V/V) DMSO, 45% (V/V) MeOH, 30% (V/V) EtOH.

Všechny výše zmíněné standardní roztoky jsem uchovávala v lednici.

4.2.2 Roztok pracovního elektrolytu

Podle požadované koncentrace jsem navázila odpovídající množství tetraboritanu sodného, přidala jsem ultračistou vodu a nechala cca 10 minut rozpouštět na ultrazvukové lázni. Poté jsem přidala odpovídající množství methanolu, hexadimethrinu, cyklodextrinu a nakonec jsem upravila pH* na požadovanou hodnotu pomocí kyseliny borité.

4.2.3 Zásobní roztoky

Pro obrácení toku bylo nutné připravit si zásobní roztok hexadimethrinu. Navázila jsem přibližně 0,1 g hexadimethrinu a vodou jsem doplnila po rysku do 100 ml odměrné baňky. Vznikl 0,1% zásobní roztok.

Připravila jsem si zásobní roztok vnitřního standardu. Navázila jsem přibližně 0,02 g propylparabenu (PP) a doplnila ho slepým roztokem po rysku ve 100 ml odměrné baňce a 10 minut jsem roztok rozpouštěla na ultrazvukové lázni [c(IS) = 0,2 mg/ml].

Dále bylo nutné připravit slepý roztok. Do 100 ml odměrné baňky jsem napipetovala 30 ml DMSO, 45 ml MeOH a 25 ml EtOH.

4.2.4 Kalibrační roztoky

Do 50 ml odměrné baňky jsem navázila 0,07506 g rutinu, 0,0674 g hesperidinu a 0,03040 g diosminu, přidala jsem 0,5 ml odměrného roztoku 1M NaOH, 1 ml roztoku vnitřního standardu a po rysku jsem doplnila slepým roztokem a nechala jsem 10 minut rozpouštět na vodní lázni. Vznikl základní roztok standardů (ZR ST), který jsem dále ředila (viz Tabulka č. 4). Koncentrace analytů byly 1,5012 mg/ml RU, 1,3482 mg/ml HE a 0,6800 mg/ml DI.

Postupným ředěním ZR ST slepým roztokem vznikla série pěti kalibračních roztoků s koncentrací 100,6 – 1005,8 µg/ml rutinu, 90,3 – 903,3 µg/ml hesperidinu a 45,6 – 455,6 µg/ml diosminu. Koncentrace vnitřního standardu byla ve všech roztocích shodná [c(IS) = 20µg/ml].

**Analyza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

Tabulka 2 – Testované kalibrační roztoky

	1	2	3	4	5
ZR (ml)	0,67	1,6	3	5	6,7
IS (ml)	1	1	1	1	1
cRU (µg/ml)	100,58	240,19	450,36	750,60	1005,80
cHE (µg/ml)	90,33	215,71	404,46	674,10	903,29
cDI (µg/ml)	45,56	108,80	204,00	340,00	455,60
clS (µg/ml)	20	20	20	20	20

Tabulka 3 – Složení kalibračních roztoků v ml

	Roztok č. 1	Roztok č. 2	Roztok č. 3	Roztok č. 4	Roztok č. 5
V _{IS} (ml)	1	1	1	1	1
V _{zákl.roztoku} (ml)	0,67	1,60	3,00	5,00	6,67
V _{blank} (ml)	8,33	7,40	6,00	4,00	2,33

4.2.5 Příprava vzorku z tablety

Z deseti tobolek přípravku HemoStop ProBio jsem zjistila průměrnou hmotnost obsahu jedné tobolky (činil přibližně 0,7469 g). Ke stanovení flavonoidů v přípravku jsem odvážila přibližně přesně množství odpovídající průměrné hmotnosti obsahu jedné tobolky, přidala jsem 10 ml základního roztoku IS, 1,0 ml odměrného roztoku 1M NaOH a ve 100 ml odměrné baňce jsem doplnila po rysku slepým roztokem. Na ultrazvukové lázni jsem nechala roztok 30 minut odvzdušnit, poté ho nechala odstát při laboratorní teplotě a doplnila jsem roztok opět po rysku slepým roztokem. Vznikl základní roztok Hemostopu, Roztok sloužil pro stanovení obsahu rutinu a hesperidinu, v případě diosminu byl roztok před měřením ředěn v poměru 1:20 slepým roztokem.

4.3 Přístroje a metodika měření

4.3.1 Použité přístroje

Pro optimalizaci a validaci metody byly v rámci diplomové práce použity následující přístroje:

- Kapilární elektroforetický systém PrinCE 750, Holandsko,
- Beckman Coulter P/ACE™MDQ Capillary Electrophoresis Systém, USA,
- Laboratorní digitální pH metr PNM 220, Radiometr Kopenhagen, Dánsko, přístroj byl kalibrován za použití standardních pufrů (pH 7,000 a 10,012),
- Ultrazvuková lázeň Badelin Sonorex RK 31, Německo,
- Automatické analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo,
- Elektromagnetická míchačka MM 2A, Laboratorní přístroje Praha, ČR,
- Kombinovaná pH elektroda Red Rod,
- Centrifuga Schoeller EBA 21, Hettrich Zentrifugen.

Laboratoř bylo nutné (zvláště v letním období) temperovat na konstantní teplotu, která nepřesáhla 22°C.

Kapilární elektroforetický systém PrinCE 750

Přístroj je vybaven PDA (Photo Diode – Array) detektorem (UV detektor). Separace probíhala v křemenné kapiláře, potažené vrstvou polyimidu. Celková délka kapiláry byla 67,2 cm a efektivní délka byla 60,0 cm. Vnitřní průměr (ID) byl 50 µm. Naměřená data byla přímo zpracovávána na obslužném PC programem DAX 3D verze 7.3 od společnosti Van Mierlo Software Consultancy²⁹.

²⁹ Prince Technologies. www.princetechnologies.eu [online]. 2004-2010.. Dostupné z [www:http://www.princetechnologies.eu/index.php?page=ce-systems](http://www.princetechnologies.eu/index.php?page=ce-systems), [cit. 2010-03-19].

Beckman Coulter P/ACE™MDQ Capillary Electrophoresis Systém

Na tomto přístroji jsem pracovala zhruba od poloviny své práce, protože přístroj PrinCE měl problémy s detektorem. Všechna měření z přístroje PrinCE jsem ověřila i na přístroji Beckman Coulter P/ACE™.

Tento přístroj je vybaven detektorem DAD. Separace probíhala ve stejné křemenné kapiláře, potažené vrstvou polyamidu, ale měla jiné rozměry: celková délka – 57,5 cm, efektivní délka – 50 cm. ID zůstal stejný – tj. 50 µm.

Naměřená data byla přímo zpracovávána na obslužném PC prostřednictvím programu Karat 32 od společnosti Inc. System Gold™³⁰.

4.3.2 Metodika měření

V obou programech (DAX 3D verze 7.3 i Karat 32) se vytvářejí metody, kde se v jednotlivých krocích nastavují podmínky analýzy (požadované napětí, teplota, čas, tlak apod.). Více metod za sebou tvoří sekvenci.

³⁰ Beckman Coulter. www.beckmancoulter.com [online]. 1998 - 2010. Dostupné z [www:http://www.beckmancoulter.com/resourcecenter/labresources/ce/celeadership.asp](http://www.beckmancoulter.com/resourcecenter/labresources/ce/celeadership.asp), [cit. 2010-03-19].

4.4 Pracovní postup měření

4.4.1 Postup u přístroje PrinCE

Promývání

Na začátku každého měření jsem spustila PC a následně elektroforetický systém. Každá analýza začínala (i končila) promytím kapiláry po dobu 10 minut 0,1M NaOH, 10 minut 1,0M NaOH a 10 minut ultračistou vodou pod tlakem 1500 mPa.

Analýza

Pro zajištění lepší opakovatelnosti a lepší separační účinnosti jsem kapiláru před samotným měřením promývala 2 minuty 0,1M NaOH, 2 minuty ultračistou vodou a 5 minut roztokem BGE a pod tlakem 1500 mPa. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky pod tlakem 50 mbar nejprve po dobu 6 s. následně po dobu 9,6 s. Přístroj byl vytemperován na teplotu 25°C a separace probíhala při napětí -30 kV. Pro detekci analytů byly použity vlnové délky 207, 270 a 284 nm.

4.4.2 Postup u přístroje Beckman

Promývání

Nejprve bylo promývání stejné jako u přístroje PrinCE (tzn. 10 minut 0,1M NaOH, 10 minut 1,0M NaOH a 10 minut ultračistou vodou pod tlakem 1500 mPa). Později bylo změněno na 10 minut 0,1% H₃PO₄, 10 minut ultračistou vodou a 10 minut 0,1M NaOH.

Analýza

Promývání kapiláry: 2 minuty 0,1% H₃PO₄, 2 minuty ultračistou vodou, 3 minuty 0,1M NaOH a 2 minuty BGE. Vzorek byl dávkován hydrodynamicky pod tlakem 50 mbar po dobu 6 s. Přístroj byl vytemperován na teplotu 25°C a separace probíhala při napětí -30kV. Pro detekci analytů byly použity vlnové délky 200, 246 a 280 nm.

Pracovní elektrolyt a vzorek bylo nutné před každou analýzou odplynit na ultrazvukové lázni po dobu 10 minut.

4.5 Výpočty

4.5.1 Limity

Detekce (LOD)

LOD je nejnižší koncentrace analyzované látky přítomné ve vzorku, kterou lze detekovat, ale nelze ji s dostatečnou přesností stanovit kvantitativně. Vyjadřuje se jako koncentrace analytu při daném poměru signálu k šumu (poměr je většinou 3:1). Pro výpočet LOD jsem použila vztah:

$$\text{LOD} = 3,3 \cdot (\text{SD}/S)$$

Kde je:

SD ... směrodatná odchylka úseku na ose Y,

S ... směrnice rovnice regresní přímky.

Kvantifikace (LOQ)

LOQ je nejnižší koncentrace analytu ve vzorku, která může být stanovena s přijatelnou přesností při stanovených podmínkách dané metody. Pro výpočet LOQ jsem použila vztah:

$$\text{LOQ} = 10 \cdot (\text{SD}/S)^{31}$$

4.5.2 Opakovatelnost metody

Pro zjištění opakovatelnosti metody jsem proměřila celkem šestkrát měrný roztok o složení: IS = 0,02%, rutin = 1 díl (80 g/ml), hesperidin = 2,25 dílu (180 g/ml) a diosmin = 20,25 dílu (1620 g/ml). Z výsledných hodnot jsem podle následujících vztahů vypočítala jejich směrodatnou (s) a relativní směrodatnou odchylku (RSD).

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

31 SHABIR, G. Validation of High-Performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 987, 57-66, 2003.

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Kde je:

n ... počet měření,

x_i ... výsledek jednotlivého měření.

4.5.3 Rozlišení (R_s)

R_s mezi píky dvou složek s podobnými výškami se vypočítá pomocí vztahu:

$$R_s = \frac{1,18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

Kde jsou:

$t_{R1,2}$... migrační časy (nebo také vzdálenosti základní linie mezi bodem nástřiku a kolmicemi spuštěnými z vrcholů dvou sousedních píků) a platí $t_{R2} > t_{R1}$,

$w_{h1,2}$... šířky píků v polovině jejich výšky³².

4.5.4 Účinnost separace (počet teoretických pater)

Počet teoretických pater (N) se vypočítá podle vztahu:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

Kde je:

t_R ... migrační čas,

w_h ... šířka píku v polovině jeho výšky³⁰.

32 Český lékopis 2009, Grada Publishing, Praha 2009. 3 sv. (s 1174, 2672, 3942). ISBN 978-80-247-2994-7.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1.1 Optimalizace separačních podmínek

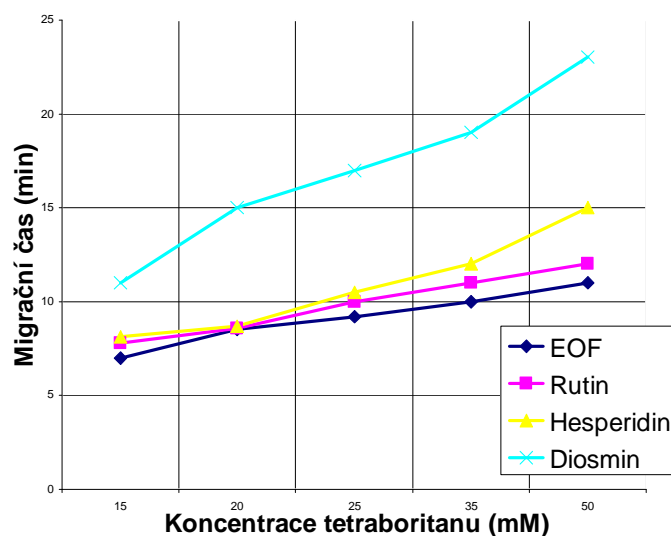
Cílem této práce je optimalizovat podmínky separace tří flavonoidů (rutin, hesperidin a diosmin) pomocí CZE. Látky musí být dokonale separovány, jejich píky by měly být co nejvíce symetrické a měly by mít co největší plochu. Z tohoto důvodu jsou do optimálního BGE přidávány cyklodextriny, které mohou tvar píku zlepšit. Důležitým aspektem je čas celé analýzy. Z tohoto hlediska se jevílo jako nejvíce výhodné použít CZE s obráceným tokem. Optimalizovaná metoda se poté použije ke kvalitativní i kvantitativní analýze přípravku HemoStop ProBio.

Optimalizace metody nejprve probíhala na přístroji PrinCE, kdy v průběhu práce při hledání vhodné koncentrace MeOH na kvalitu separace nastala porucha UV detektoru. Po domluvě s vedoucím diplomové práce jsem pokračovala v měření na přístroji Beckman Coulter, na kterém jsem ověřila platnost původních výsledků naměřených na přístroji PrinCE. Všechny hodnoty uvedené v diplomové práci jsou z přístroje Beckman Coulter.

5.1.2 Vliv koncentrace BGE

Z dostupné literatury^{33 34} jsem zjistila, že pro separaci hesperidinu a diosminu je nejvhodnější borátový pufr. Bylo však nutné zjistit jeho optimální koncentraci, aby analýza proběhla v co nejkratším čase a zároveň v dostatečné kvalitě. Zkoušela jsem koncentrace 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM a 50 mM.

Při nízkých koncentracích (20 mM a 25 mM) se oddělil pouze rutin a píky hesperidinu a diosminu nebyly separovány. Doba analýzy se pohybovala kolem 15 minut. Ve vyšších koncentracích (40 mM a 50 mM) se doba analýzy výrazně prodlužovala (až na 25 minut), ale všechny píky byly oddělené. Směrem k vyšším koncentracím se však zhoršoval jejich tvar. K dalšímu použití jsem proto vybrala kompromis mezi celkovým časem analýzy a kvalitou separace a tvarem píků, tj. 35 mM.



Obrázek č. 19 – Vliv koncentrace tetraboritanu na separaci (CZE, katodický EOF)

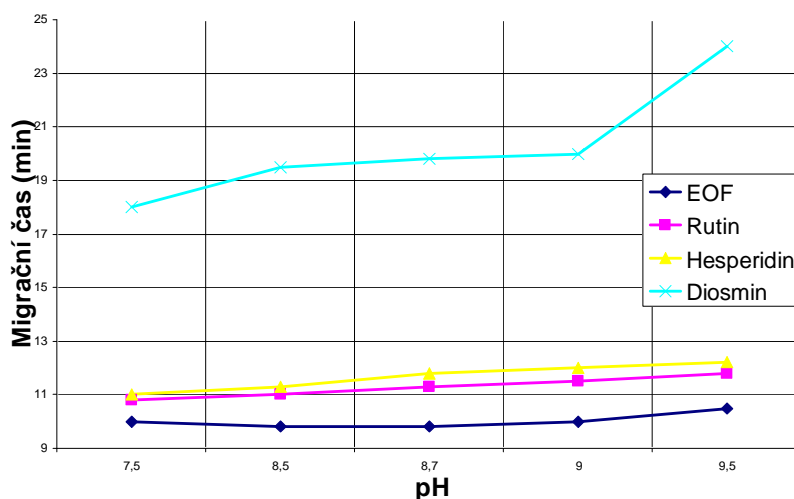
33 HONEGR, J. Využití elektroforetických metod v analýze látek přírodního původu. Hradec Králové, diplomová práce, 2007. 68 s. UNIVERZITA KARLOVA.

34 NOVOTNÁ, M. Kapilární elektroforéza v analýze bioflavonoidů a fytofarmak. Hradec Králové, diplomová práce, 2008. 51 s. UNIVERZITA KARLOVA.

5.1.3 Optimalizace pH

Další v pořadí testovanou veličinou bylo pH pracovního elektrolytu. pH je velmi důležitým parametrem separace, protože na pH závisí počet negativně nabitých silanolových skupin na vnitřní straně kapiláry a disociace analyzovaných látek. Všechny analyzované látky jsou slabě kyselé látky (přítomnost fenolických hydroxylových skupin v molekule). Pro dostatečnou disociaci těchto skupin byla nutná práce v alkalické oblasti pH.

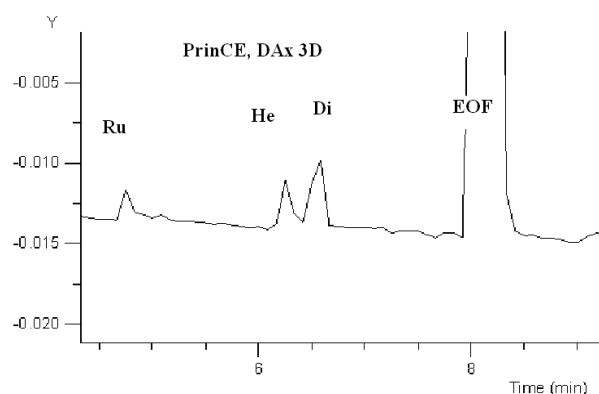
Rozmezí zkoušených pH základního elektrolytu pokrývalo pH 7,5; 8,5; 8,7; 9,0 a 10,0. Jako optimální jsem vybrala pH=9,0. Při nižších hodnotách pH byly migrační časy kratší, avšak analyty nebyly dostatečně oddělené. Čím vyšší bylo pH, tím analýza trvala déle. Při pH vyšším než 9,5 byla separace špatně reprodukovatelná, a proto pH 10 není dokumentováno.



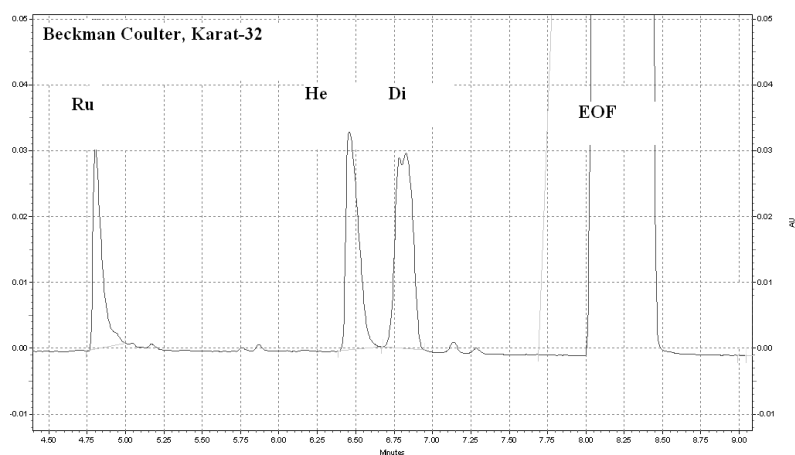
Obrázek č. 20 – Vliv pH roztoku BGE

Vzhledem ke stále se prodlužujícímu průběhu celé analýzy jsem se rozhodla pro obrácení EOF. Na následujících dvou obrázcích je záznam analýzy s obráceným EOF z přístroje PrinCE a z Beckmana Coulter. Migrační časy analytů se oproti normálnímu uspořádání, kdy celková doba analýzy byla cca 30 minut, zkrátily přibližně na polovinu. Celková doba analýzy pak byla přibližně 15 minut. Tímto měřením skončila práce na přístroji PrinCE, od této chvíle jsem prováděla měření pouze na přístroji Beckman Coulter.

Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy



Obrázek č. 21 – PrinCE: 35mM tetraboritan (BGE) s obráceným EOF



Obrázek č. 22 – Beckman Coulter: 35mM tetraboritan (BGE) s obráceným EOF

5.1.4 Vliv druhu organických rozpouštědel a jejich koncentrací

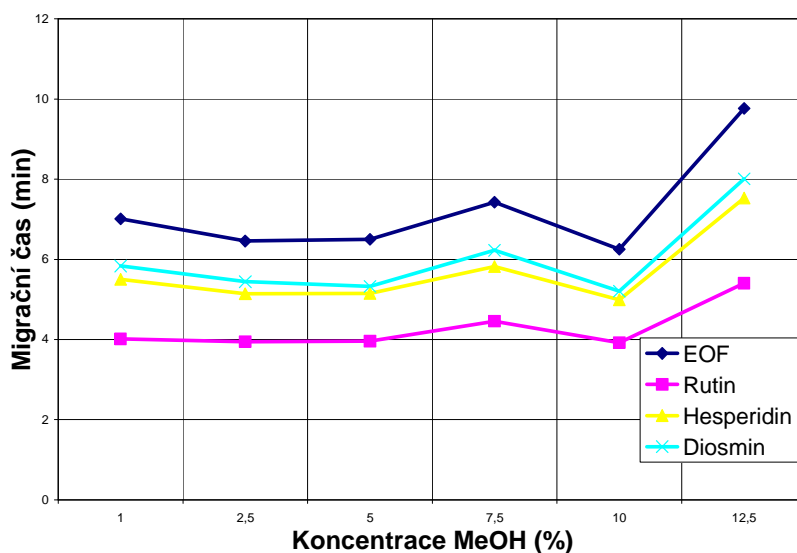
Organická rozpouštědla v BGE velmi silně ovlivňují separaci a to změnou ζ -potenciálu, změnou viskozity a snížením EOF. Podle předchozích zkušeností kolegů na pracovišti jsem zúžila okruh zkoušených organických rozpouštědel na tři – MeOH, EtOH a isopropylalkohol.

Jako první jsem zkoušela BGE s obsahem 10% isopropylalkoholu. Výsledky všech tří měření s tímto rozpouštědlem byly velmi podobné - silně zašumělá základní linie, ale dobré rozlišení píků. Proto jsem zkoušela připravit ještě 20% a 35% roztok. Zde se ukázal problém s rozpustností analyzovaných látek. Od dalšího zkoušení jsem proto upustila.

Analyza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy

Jako druhý v pořadí jsem zkoušela přidavek 10% EtOH. Po třech měřeních jsem zjistila velmi špatné rozlišení píků.

Naopak přidavek 10% MeOH se jevil jako velmi úspěšný. Samotný vzorek byl také rozpuštěn v MeOH. Zašumění základní linie bylo minimální a rozlišení píků bylo uspokojivé. Zbývalo najít vhodnou koncentraci MeOH. Připravila jsem sérii šesti borátových pufrů o koncentraci 70 mM, do kterých jsem přidávala MeOH tak, že vznikla série pufrů o konstantní koncentraci borátu a různé koncentraci MeOH – 5%, 10%, 15%, 20%, 25% a 30%. Čím nižší byla koncentrace MeOH, tím lepší bylo rozlišení píků. Proto jsem připravila další roztoky o koncentracích 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0% a 4,5% MeOH. V koncentračním rozmezí 1,0 – 2,0% MeOH byly výsledky špatně reprodukovatelné. Od 5,0% koncentrace a výše byl pík diosminu náchylnější k rozštěpení. Jako nejvhodnější se ukázala koncentrace 2,5% MeOH.



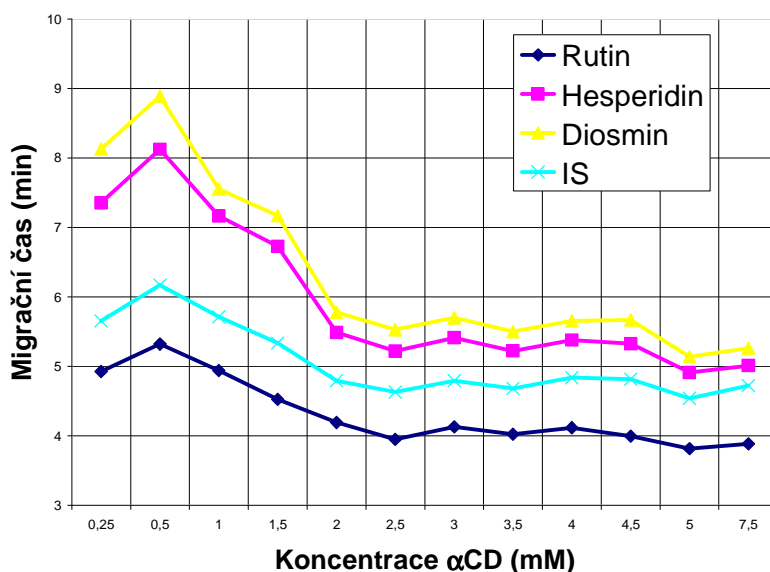
Obrázek č. 23 – Různé koncentrace metanolu

5.1.5 Vliv cyklodextrinů

K separaci jsem použila tyto elektroneutrální cyklodextriny:

- α -cyklodextrin (α -CD),
- β -cyklodextrin (β -CD),
- γ -cyklodextrin (γ -CD).

Všechny uvedené cyklodextriny jsem zkoušela v koncentracích 2,5 mM, 5,0 mM a 7,5 mM. V případě α -CD se separace výrazně zlepšila – tvary píků byly znatelně lepší. Dále jsem zkoušela β -CD, který opakovaně způsoboval štěpení píku odpovídající diosminu. Proto bylo od jeho dalšího testování upuštěno. Poslední γ -CD se zpočátku jevil jako nejlepší. Píky byly výrazně vyšší a štíhlé. Analýza se sice zpomalila, ale problémy nastaly v kapiláře. γ -CD způsoboval opakované ucpání kapiláry, které se projevovalo zvyšováním proudu a následným kolapsem analýzy. Podobné zkušenosti s γ -CD bylo na pracovišti pozorováno již dříve. Proto jsem byla nucena od této varianty také ustoupit. Dalšímu testování jsem podrobila α -CD. Do odměrných baněk jsem si udělala sérii roztoků o koncentracích: 0,5 mM; 1,0 mM; 1,5 mM; 2,0 mM; 3,0 mM; 3,5 mM; 4,0 mM a 4,5 mM. Z provedených měření vyplynulo, že vyšší koncentrace prodlužovaly analýzu a nižší naopak méně ovlivňovaly tvar píku. Jako kompromis jsem proto zvolila koncentraci 1,5 mM.



Obrázek č. 24 – Různé koncentrace α -CD

5.1.6 Volba vnitřního standardu

Jako vnitřní standard (IS) jsem zvolila tyto látky (přidávané do vzorku):

- methylparaben (MP),
- propylparaben (PP),
- kyselina benzoová,
- kyselina sorbová,
- kyselina 2-naftoxyoctová.

Všechny výše vyjmenované látky jsem zkoušela v koncentraci 0,25 mg/ml (tzn. v poloviční koncentraci jako rutin a hesperidin). Všechny kyseliny (tzn. benzoová, sorbová a naftoxyoctová) migrují až za analyzovanými látkami, což se vzhledem k vhodnějším migračním časům parabenů jeví jako méně výhodné. MP a PP má migrační čas mezi rutinem a hesperidinem. MP a PP jsem zkoušela o koncentracích 0,20 mg/ml, 0,50 mg/ml a 0,70 mg/ml a výsledky ukázaly, že MP má podobný migrační čas jako rutin. Proto jsem dále pokračovala s PP. Vybraná koncentrace byla 0,20 mg/ml.

5.1.7 Vliv teploty

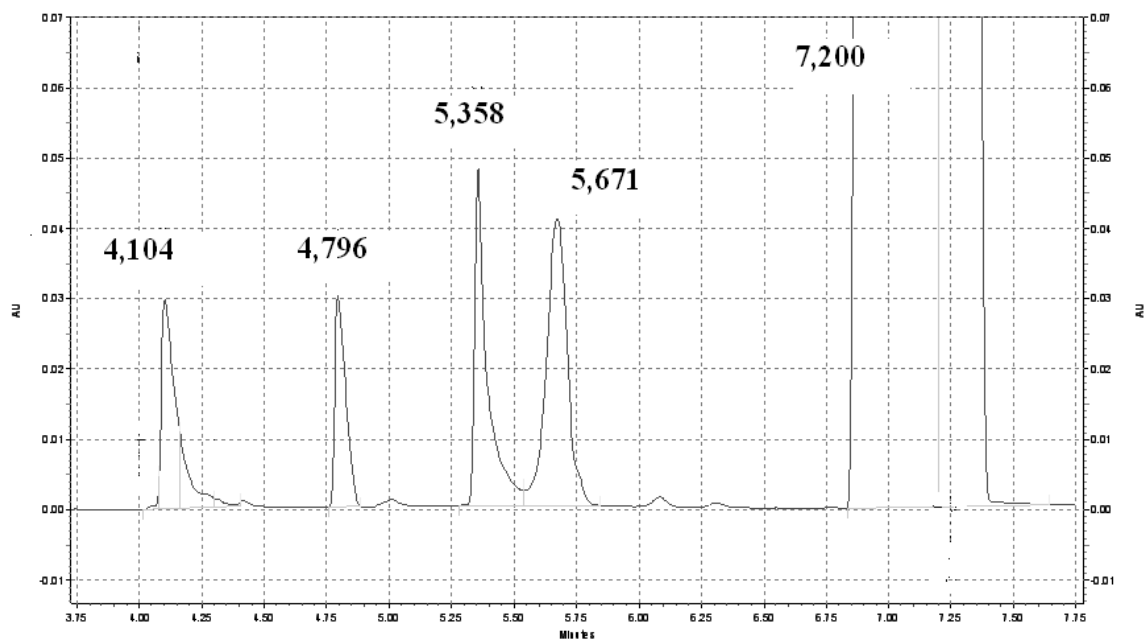
Přestože je kapilára v přístroji Beckmann termostatována, docházelo v průběhu analýz často k jejich přerušování. Zjistila jsem, že příčina je v nedostatečném termostatování prostoru kapiláry. Vzhledem k vysokým teplotám (hlavně v letním období) v laboratoři nebyl elektroforetický chladicí systém schopen udržet teplotu na požadované hodnotě 25°C a při přestoupení této teploty docházelo v kapiláře pravděpodobně k lokálnímu přehřívání a k teplotní nehomogenitě s následkem kolapsu analýzy. Z tohoto důvodu bylo nutné v laboratoři permanentně používat klimatizaci. Jiná teplota testována nebyla.

5.1.8 Optimální podmínky separace

Tabulka 4 – Optimální podmínky separace

BGE (tetraboritan sodný)	35 mM
Organické rozpouštědlo v BGE	2,5% (V/V) methanol
Modifikátor EOF	0,001% hexadimethrin
Cyklodextrin	1,5 mM α -CD
IS	PP (0,20 mg/ml)
pH*	9,0
Napětí	-30 kV
Teplota	25°C
Dávkování	6 s., tlak 50 mbar
Detekce	UV při 200, 246 a 280 nm
Kapilára	Křemenná ID = 50 μ m, efektivní délka = 50 cm, celková délka = 57,5 cm

Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy



Obrázek č. 25 – Separace za optimálních podmínek při vlnové délce 200 nm (čísla = migrační časy v minutách)

Analyzované látky migrují v pořadí: rutin, PP, hesperidin, diosmin a EOF. Identifikace píků byla provedena přidavkem standardu.

Pořadí analytů souvisí s komplexací flavonoidů s borátovým pufrům, resp. s B (III). Rutin z analyzovaných flavonoidů s borátem komplexuje v cukerné i v aglykonové části molekuly. Jeho rychlost v borátovém pufru a v módu reverzního EOT je nejvyšší – z kapiláry migruje jako první. Hesperidin a diosmin s borátovým pufrům komplexují pouze v cukerné části molekuly a komplexy vykazují menší elektroforetickou pohyblivost³⁵.

35 MORIN, F., et al. Borate Complexation of Flavonoid-O-Glycosides in Capillary Electrophoresis, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 628, 153-160, 1993.

5.2 Kvantitativní analýza

Pro měření kalibrační závislosti jsem používala pracovní elektrolyt o složení, které shrnuje Tabulka č. 4. Jako kvantitativní parametr (T) jsem použila hodnoty získané poměrem plochy píku analyzované látky ve vztahu k ploše píku IS. Hodnoty ploch píků byly získány softwarem Karat 32.

$$T = \frac{AUC_{analyt}}{AUC_{IS}}$$

Pro každou koncentraci rutinu, hesperidinu a diosminu jsem provedla celkem tři měření a výsledky jsem pro každou koncentrační hodnotu zprůměrovala. Kalibrační závislost byla hodnocena pomocí lineární regrese. Obecný tvar přímky je:

$$y = kx + q$$

Kde je:

y ... plocha píku analytu/plocha píku IS (T),

x ... koncentrace látky ($\mu\text{g/ml}$),

k ... směrnice přímky,

q ... absolutní člen (posunutí).

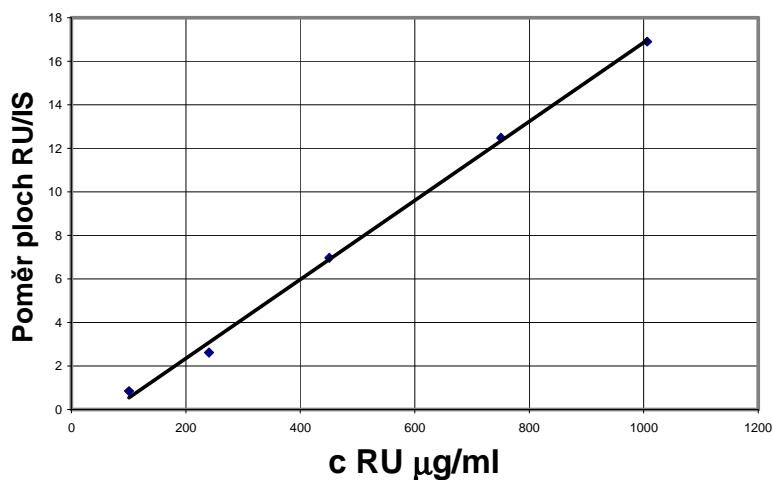
5.2.1 Kalibrační závislost

5.2.1.1 Rutin

Vlnová délka, kde má rutin maximum, je 200 nm. Koncentrace, plochy píků a migrační časy, které jsem použila pro změření kalibrační závislosti, shrnuje následující tabulka:

Tabulka 5 – Kalibrační koncentrace pro rutin

Rutin (200 nm)					
Bod kalibrační křivky	Koncentrace (µg/ml)	Plocha píku Ru	Plocha píku IS	Poměr ploch Ru/IS	Migrační čas Ru (s)
1	100,58	5226,0	6233,7	0,8417	4,3
2	240,19	17594,3	6730,0	2,6182	4,2
3	450,36	46653,7	6707,0	6,9621	4,3
4	750,60	94896,7	7613,0	12,4889	4,2
5	1005,80	115791,3	6841,0	16,9041	4,3



Obrázek č. 26 – Kalibrační závislost rutinu

Parametry lineární regrese:

rovnice přímky: $y = 0,181x - 1,2835$ (s_k je 0,0004 a s_q je 0,2728)

- korelační koeficient je 0,9991,
- reziduální odchylka je 0,3323.

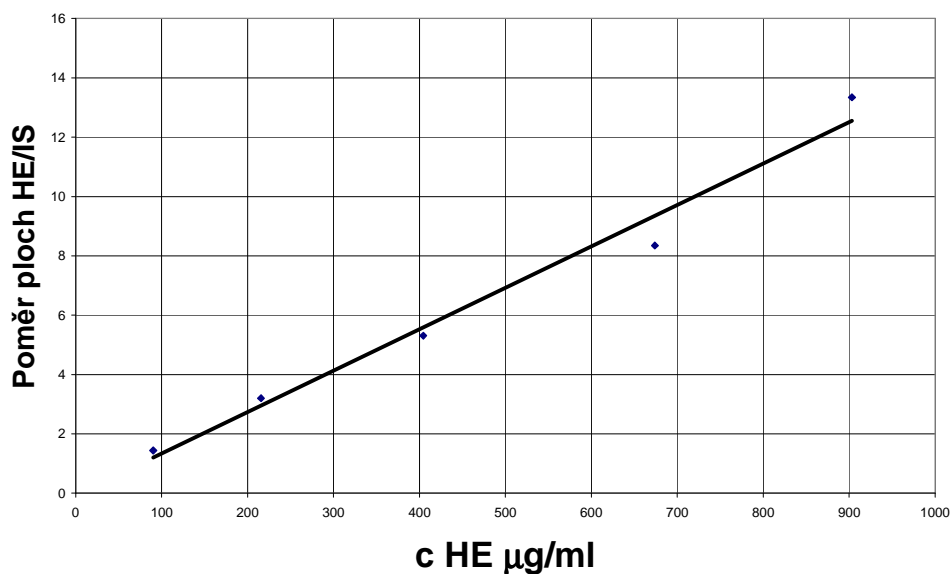
Kalibrační závislost je ve sledované koncentraci rutinu lineární.

5.2.1.2 Hesperidin

Vlnová délka, kde má hesperidin maximum, je 246 nm. Koncentrace, plochy píků a migrační časy, které jsem použila pro změření kalibrační závislosti, shrnuje následující tabulka:

Tabulka 6 – Kalibrační koncentrace pro hesperidin

Hesperidin (246 nm)					
Bod kalibrační křivky	Koncentrace (µg/ml)	Plocha píku He	Plocha píku IS	Poměr ploch He/IS	Migrační čas He (s)
1	90,33	2776,7	1931,0	1,4393	5,5
2	215,71	6012,7	1878,7	3,2044	5,5
3	404,46	9592,0	1809,3	5,3074	5,6
4	674,10	14901,3	1955,3	8,3463	5,5
5	903,29	25231,0	1882,7	13,3457	5,7



Obrázek č. 27 – Kalibrační závislost hesperidinu

Parametry lineární regrese:

rovnice přímky: $y = 0,0136 x - 0,0453$ (s_k je 0,0012 a s_q je 0,6430)

- korelační koeficient je 0,9785,
- reziduální odchylka je 0,7832.

Kalibrační závislost je ve sledované koncentraci hesperidinu lineární.

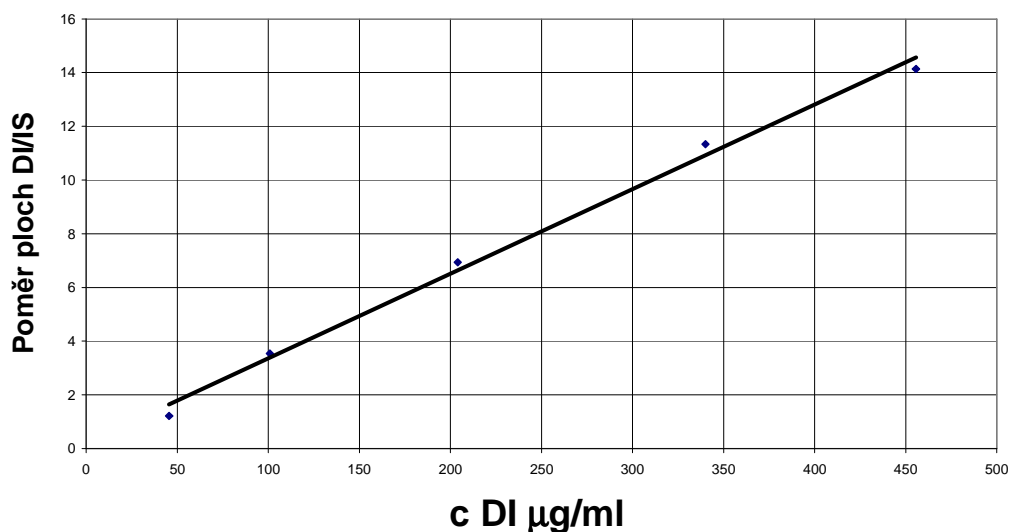
**Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

5.2.1.3 Diosmin

Vlnová délka, kde má diosmin maximum, je 280 nm. Koncentrace, plochy píků a migrační časy, které jsem použila pro změření kalibrační závislosti, shrnuje následující tabulka:

Tabulka 7 – Kalibrační koncentrace pro diosmin

Diosmin (280 nm)					
Bod kalibrační křivky	Koncentrace (µg/ml)	Plocha píku Di	Plocha píku IS	Poměr ploch Di/IS	Migrační čas Di (s)
1	45,56	6733,7	5565,3	1,2127	5,7
2	100,80	20554,0	5813,0	3,5391	5,7
3	204,00	38833,0	5599,3	6,9346	5,7
4	340,00	68307,3	6030,0	11,3364	5,8
5	455,60	82590,7	5843,0	14,1413	5,9



Obrázek č. 28 – Kalibrační závislost diosminu

Parametry lineární regrese:

rovnice přímky: $y = 0,0315 x + 0,207$ (s_k je 0,0014 a s_q je 0,3778)

- korelační koeficient je 0,9972,
- reziduální odchylka je 0,4653.

Kalibrační závislost je ve sledované koncentraci hesperidinu lineární.

**Analyza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

Následující tabulka shrnuje parametry regresní přímky jednotlivých látek (koncentrace analytů jsou v $\mu\text{g/ml}$):

Tabulka 8 – Kalibrační parametry

	Rovnice regresní přímky	Korelační koeficient	S_k	S_q
Rutin	$y = 0,181x - 1,2835$	0,9991	0,0004	0,2728
Hesperidin	$y = 0,0136x - 0,0453$	0,9785	0,0012	0,6430
Diosmin	$y = 0,0315 + 0,207$	0,9972	0,0014	0,3778

Kalibrační závislosti byly vyhodnoceny pro rutin při vlnové délce 200 nm, pro hesperidin při 246 nm a v případě diosminu při 280 nm. Při těchto vlnových délkách byla analýza pro dané analyty nejcitlivější a také byly získané nejvyšší hodnoty korelačních koeficientů. Nicméně by bylo možné provést kalibraci všech tří analytů při vlnové délce 200 nm.

5.2.2 Limity

LOD a LOQ byly zjištěny výpočtem podle vzorce $\text{LOD} = 3,3 (s_q/k)$, resp. $\text{LOQ} = 10 (s_q/k)$. Jako s_q byla dosazena směrodatná odchylka y-intervalu rovnice regresní přímky³¹. Hodnoty jsou následující: rutin-LOD; LOQ 5,0; 15,1 ($\mu\text{g/ml}$); hesperidin- LOD; LOQ 156,0; 472,8 ($\mu\text{g/ml}$); diosmin- LOD; LOQ 39,6; 119,9 ($\mu\text{g/ml}$). Je zřejmé, že v případě HE a DI jsou LOQ vyšší než nejnižší kalibrační koncentrace, což souvisí pravděpodobně s vysokou hodnotou směrodatné odchylky „posunutí“ na ose y. Jestliže bychom zjistili u HE a DI LOD odhadem, získali bychom hodnoty $\text{LOD} = 80 \mu\text{g/ml}$ pro HE a $10 \mu\text{g/ml}$ pro DI, které jsou příznivější. Takto odhadnuté limity však nebyly z časových důvodů experimentálně ověřeny.

5.3 Opakovatelnost metody

K ověření opakovatelnosti metody, tj. opakovatelnost migračních časů a ploch píků, jsem provedla celkem čtyři měření při koncentracích 204,00 µg/ml diosminu, 404,46 µg/ml hesperidinu a 450,36 µg/ml rutinu. Výpočet směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky jsem provedla podle rovnice (viz kapitola 4.5.2). Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

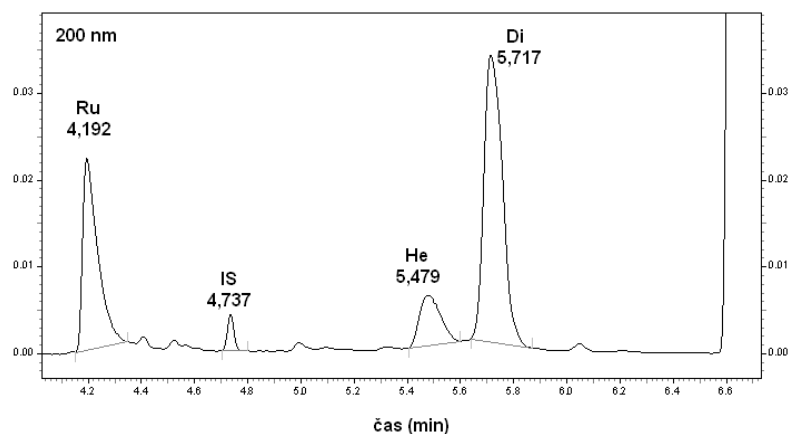
Tabulka 9 – Opakovatelnost metody (RSD,s); n = 4

	Migrační čas (min)			Poměr ploch Analyt/IS		
	průměrná hodnota (min)	s	RSD (%)	průměrná hodnota	s	RSD (%)
Rutin c = 240,19 µg/ml	4,246	0,078	1,83	2,9455	0,0833	2,83
Hesperidin c = 215,71 µg/ml	5,521	0,116	2,11	3,0581	0,0933	3,05
Diosmin c = 100,8 µg/ml	5,724	0,133	2,32	3,5779	0,1424	3,98

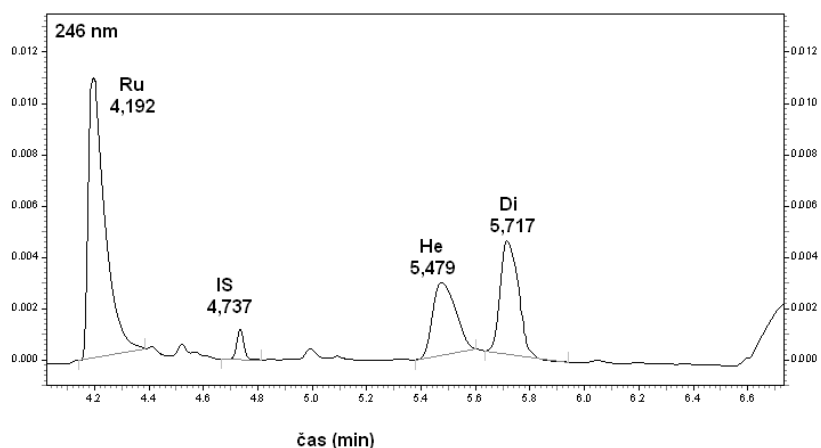
Z výše uvedeného je zřejmé, že lépe opakovatelné jsou migrační časy. Nejlepší hodnoty opakovatelnosti migračního času má rutin a naopak nejhorší má diosmin. Opakovatelnost poměrů ploch analytu a IS také klesá v pořadí rutin-hesperidin-diosmin.

**Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

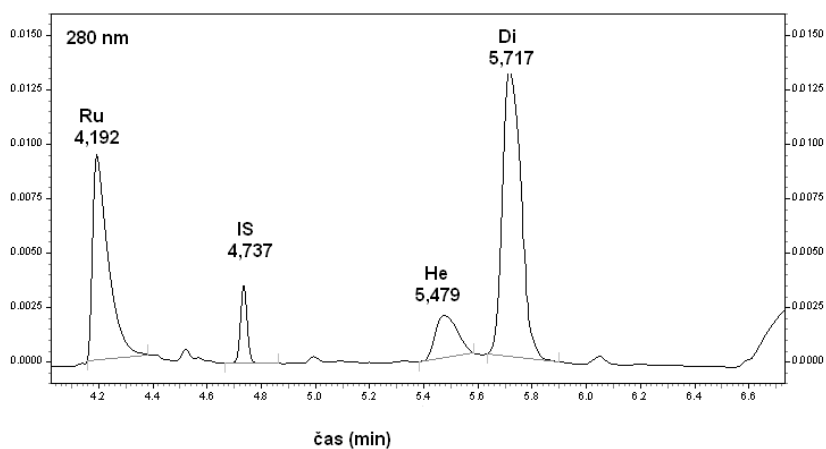
Pro ilustraci zde uvádím záznam měření. Migrační čas 4,192 minut odpovídá rutinu, 4,737 minut IS, 5,479 minut hesperidinu a 5,717 minut diosminu.



Obrázek č. 29 – Záznam měření pro rutin ($c = 240,19 \mu\text{g/ml}$, vlnová délka 200 nm)



Obrázek č. 30 – Záznam měření pro hesperidin ($c = 215,71 \mu\text{g/ml}$, vlnová délka 246 nm)



Obrázek č. 31 – Záznam měření pro diosmin ($c = 100,80 \mu\text{g/ml}$, vlnová délka 280 nm)

5.3.1 Rozlišení mezi píky dvou složek

Hodnoty rozlišení byly zjištěny softwarově (USP) a jsou uvedeny v tabulce 11. Rozlišení je dostatečné. Nejmenší rozlišení je u dvojice HE-DI (HE je dehydrogenovaný DI).

Tabulka 10 – Rozlišení mezi píky (R_s), 200 nm

Analyty	R_s (n=4)
Rutin-IS	6,79
IS-hesperidin	7,25
Hesperidin-diosmin	3,85

Faktor asymetrie (podle USP) a počet teoretických pater (N) byly také zjištěny pomocí softwaru a jsou uvedeny v následující tabulce. Tato data slouží k představě o ideálnosti symetrie píků, resp. o účinnosti separace.

Tabulka 11 – Ostatní elektroforetická data, n=4

Analyty	Asymetrie (dle USP)	Počet teoretických pater (N)
Rutin	2,2	28 312
IS	1,1	177 257
Hesperidin	1,7	32 488
Diosmin	1,1	34 786

5.3.2 Přídavek standardní látky za účelem identifikace složek

Identifikace analytů byla provedena metodou přídavku standardů k modelové směsi za optimálních podmínek. Do vzorku o složení rutin 80 μ g/ml, hesperidin 180 μ g/ml, diosmin 1620 μ g/ml a IS 2000 μ g/ml jsem poprvé přidala 1 ml standardního roztoku rutinu o koncentraci 125 μ g/ml (tj.12,5%) a sledovala jsem, který z píků se výrazně zvětší. V druhém měření jsem do vzorku přidala standardní roztok hesperidinu o koncentraci 125 μ g/ml (tj.12,5%) a opět jsem analyzovala a zjišťovala, který z píků se zvětší. Nakonec jsem přidala standardní roztok diosminu o koncentraci 500 μ g/ml (tj.50,0%) a následující postup byl stejný.

5.4 Analýza přípravku

Poslední měření v rámci této diplomové práce spočívá v analýze přípravku HemoStop ProBio pomocí optimalizované metody kapilární zónové elektroforézy s obráceným tokem. Celkem čtyřikrát jsem změřila přípravek HemoStop ProBio – postup viz experimentální část (teoretické koncentrace $c_{\text{rutinu}} = 0,2 \text{ mg/ml}$, $c_{\text{hesperidinu}} = 0,45 \text{ mg/ml}$ a $c_{\text{diosminu}} = 4,05 \text{ mg/ml}$). Výpočet množství stanovovaných látek jsem počítala podle vztahů:

$$m(x) = \frac{A_{vz} \cdot c_{st} \cdot \phi m_{tob}}{A_{st} \cdot 10 \cdot m_{PD}}$$

Kde je:

$m(x)$... hmotnost stanovované látky [mg/1tobolka],

c_{st} ... koncentrace měřeného roztoku standardu [mg/ml],

A_{vz} ... poměr plochy píku analytu k ploše píku IS v roztoku potravního doplňku,

A_{st} ... poměr plochy píku analytu k ploše píku IS v měřeném roztoku standardů,

m_{tob} ... průměrná hmotnost obsahu tobolky [g],

m_{PD} ... navážka potravního doplňku [g].

$$\% = \frac{m(x) \cdot 100}{m}$$

Kde je:

$\%$... obsah účinné látky v %,

m ... deklarovaný obsah účinné látky v tobolce [mg].

Výsledky viz následující tabulka:

Tabulka 12 – Stanovení účinných látek v doplňku stravy HemoStop ProBio (n = 3)

	Deklarovaný obsah mg/tobolka	Zjištěný obsah CZE mg/tobolka; %	RSD (%)
Rutin	20	20,84; 104,18	2,70
Diosmin	405	11,27; 2,78	4,12
Hesperidin	45	55,33; 122,96	3,28
Diosmin/hesperidin	450	121,93; 27,10	

Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy

Stanovení obsahu flavonoidů v potravním doplňku HemoStop ProBio je shrnuto v tabulce č. 13. V případě rutinu byl zjištěný obsah v toleranci $\pm 10\%$. Velmi problematická se jeví stanovení obsahu hesperidinu a diosminu. Z důvodu zjištěného zásadně menšího množství diosminu než je deklarované, pro stanovení tohoto flavonoidu nebylo provedeno ředění před CZE měřením, jak je uvedeno v experimentální části (viz kapitola 4.2.5). V průvodních materiálech přitom není jednoznačně uváděno, v jakém množství jsou oba flavonoidy, tj. hesperidin a diosmin, v přípravku závazně obsaženy. Na obalu přípravku uvádí výrobce složení: diosmin/hesperidin v poměru 90:10 = 450 mg v tobolece. V systému AISLP parafarmaceutik a také na internetových zdrojích (internetové lékárny) je většinou uváděn obsah diosmin/hesperidin = 450 mg v tobolece bez uvedení vzájemného poměru. Dále je třeba uvést okolnost, kterou jsem načerpala z literatury. Flavonoidní koncentrát se získává z oplodí různých citronníků, které vzniká jako odpad při průmyslové produkci citrusových šťáv a snadná dostupnost odpadní suroviny vede k velké produkci daných látek ve velkém množství. Flavonoidní preparáty tak mohou obsahovat v závislosti na výchozí surovině více-méně čistý hesperidin a také methoxylované deriváty. Diosmin patří mezi flavony a komerčně se vyrábí z hesperidinu³⁶.

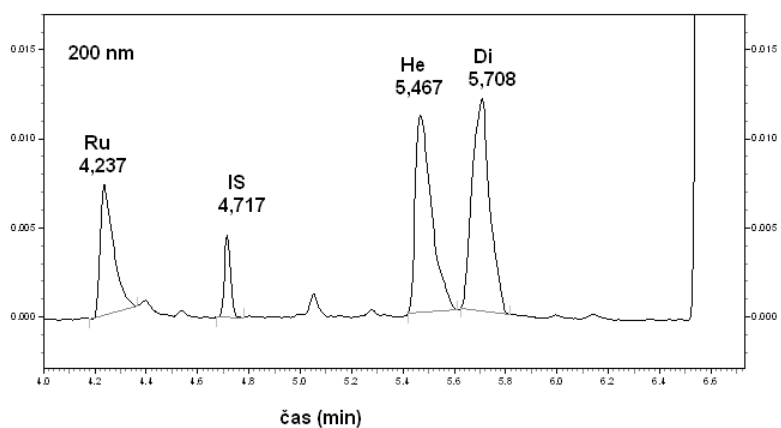
Diosmin je prakticky nerozpustný ve vodě a s jeho rozpustností byly problémy již při přípravě standardů, kdy roztok byl připravován s obsahem 50 % DMSO a 50 % ethanolu. Při stanovení diosminu v potravním doplňku je možné, že kvůli své špatné rozpustnosti se neextrahoval kvantitativně a pravděpodobně mohlo dojít k jeho zachycení při filtraci (viz EČ, příprava přípravku). Problémy s rozpustností diosminu nebylo možné korigovat díky obsahu nerozpustného podílu ostatních (pomocných) látek v extrakční tekutině, např. stearanu hořečnatého, želatiny, oxidu titaničitého aj. Z nedostatku času extrakční procedura nebyla blíže studována a optimalizována.

Navrhovanou CZE metodou bylo zjištěno, že testovaný přípravek, který patří k doplňkům stravy, obsahuje v jedné tobolece 20,84 mg rutinu, 55,33 mg hesperidinu a 11,27 mg diosminu. Výsledky nebyly ověřeny provedením testu správnosti CZE metody.

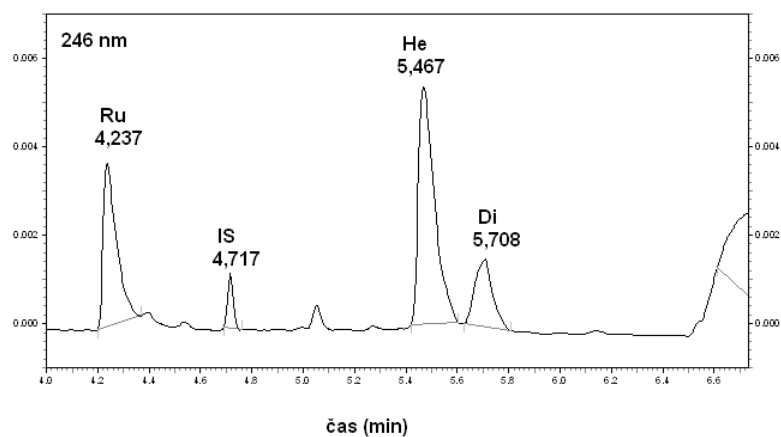
36 OPLETAL, I., ŠIMERDA, B.: Flavonoidy ve výživě zvířat. Dostupné z [http://www.vuzv.cz/sites/Flavonoidy\(2\).pdf](http://www.vuzv.cz/sites/Flavonoidy(2).pdf), [cit. 2010-05-19].

**Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

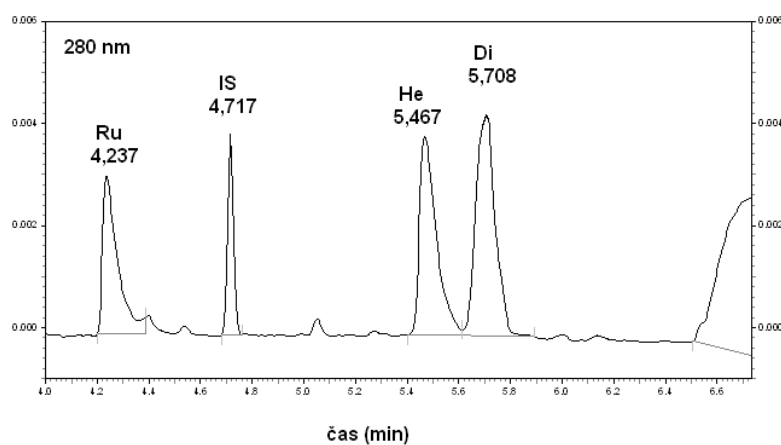
Na následujících obrázcích jsou záznamy měření přípravku při různých vlnových délkách.



Obrázek č. 32 – Záznam měření přípravku HemoStop ProBio (vlnová délka 200 nm)



Obrázek č. 33 – Záznam měření přípravku HemoStop ProBio (vlnová délka 246 nm)



Obrázek č. 34 – Záznam měření přípravku HemoStop ProBio (vlnová délka 280 nm)

5.5 Správnost metody

Správnost metody představuje většinou závěrečný validační test při vývoji analytické metody. Bohužel tento parametr již nebyl dokončen, protože nastaly velké potíže s elektroforetickou instrumentací. Docházelo k častému lámání kapilár v průběhu analýzy a přes přivolanou servisní pomoc nebyl problém uspokojivě vyřešen v čase určeném pro diplomovou práci (dále jen DP). Z důvodu velké časové tísně není tedy tento parametr v DP uveden, i když princip testování zůstal začleněn v Experimentální části této DP.

Tato diplomová práce vycházela tematicky z DP M. Novotné³⁴, která se zabývala stanovením hesperidinu a diosminu v přípravku Detralex. Přípravek Hemostop, analyzovaný v této DP, obsahuje v bioflavonoidní frakci (hesperidin a diosmin), další flavonoid rutin a dále probiokomponentu inulin a antioxidační složky vitamín C a vitamín E. CZE metoda pro analýzu Detralexu je v klasickém modu s normálním EOF a analýza trvala okolo 15 minut. Předmětem této DP bylo stanovit obsah bioflavonoidů, které jsou odpovědné za hlavní farmakologický účinek. I když oba vitamíny C a E absorbují v UV oblasti, stanovení flavonoidů neruší. Přípravek obsahuje 3,4 mg vitamínu E v 1 tobolce a v daném BGE migruje pravděpodobně v koncentraci pod mezí detekce, protože nebyl zaznamenán žádný pík v přední části záznamu. Vitamín C je v přípravku v množství 107 mg/tobolka a v systému s obráceným tokem migruje před rutinem. Identifikace tohoto píku byla provedena s využitím DAD podle shody UV spektra tohoto píku a vitamínu C. Vitamíny C a E nebyly do systému přidávány za účelem zjištění jejich případné polohy na elektroforeogramu z důvodu již zmíněné časové tísně a jejich analýza nebyla předmětem zkoumání této DP. Pravděpodobný pík vitamínu C není dokumentován na elektroforeogramech, protože záznam začíná v čase 4 minuty a uvedený pík je umístěn v nedokumentované přední části elektroforeogramu. Komplexní problematika stanovení všech účinných látek v daném potravním doplňku bude tématem pro další DP řešenou na katedře analytické chemie.

5.6 Srovnání výsledků DP

Na základě srovnání výsledků vypracované metody s některými dosud publikovanými metodami analýzy studovaných flavonoidů^{9-11, 14-16, 18-19} lze konstatovat následující závěry:

- CZE metoda má hlavní výhodu v krátkém čase analýzy v důsledku zvolení systému s obráceným EOF. Tento mód se s výhodou používá pro analýzu aniontů. Např. HPLC analýza jedenácti flavonoidů včetně rutinu⁹ trvá u rutinu ~ 17 minut. V případě CZE v klasickém módu EOF trvá analýza rutinu < 17 minut¹⁰.
- HPLC analýza hesperidinu trvala 20 min¹³, resp. 65 min, zde však byl hesperidin zvolen jako IS pro HPLC analýzu 53 fenolických kyselin a flavonoidů¹². Retenční čas diosminu při HPLC analýze byl 25 min a dále následovala ještě identifikace MS¹⁶.

Citlivost vypracované CZE metody je na takové úrovni, že umožňuje stanovení analytů v potravním doplňku, protože analyty jsou zde obsaženy v relativně dostatečném množství a naopak před vlastním měřením se musí analyzovaný roztok ředit. Citlivost publikovaných HPLC a CZE metod je buď srovnatelná s předloženou CZE metodou, ale většinou je větší a odpovídá cílům studií, tj. jedná se často o aplikaci na stanovení vybraných konstituentů v extraktech z rostlinných drog.

V některých případech však autoři se zaměřili na identifikaci látek bez odpovídající a náročnější kvantifikace¹⁶. V podobném trendu je možné zhodnotit přesnost srovnávaných metod. Je možné konstatovat, že při aplikaci módu s reverzním EOF se dosahuje menší opakovatelnosti výsledků, což souvisí pravděpodobně s ne vždy konstantní rychlostí EOF. Všeobecně z ekologického hlediska jsou příznivější elektromigrační metody, kdy roztoky elektrolytů jsou vodné nebo jen s malým obsahem organického rozpouštědla (5-10%). V HPLC jsou součástí mobilních fází organická rozpouštědla s větším procentuálním obsahem a navíc je velká spotřeba těchto fází při provádění analýz ve srovnání s roztoky BGE při elektroforéze.

6 ZÁVĚRY

- Byla provedena analýza rutinu, hesperidinu a diosminu pomocí CZE. Při analýze byl využit princip komplexace flavonoidů s kyselinou boritou.
- Optimální podmínky separace byly zjišťovány testováním tří parametrů: koncentrace základního elektrolytu (15 – 50 mM), změna pH (7,5 – 10,0) a druh organického rozpouštědla (methanol, ethanol a isopropylalkohol). Zvolený methanol byl podrobněji testován v rozmezí koncentrací 1,0 – 30,0 %.
- Optimální složení pracovního elektrolytu je: 35 mM tetraboritan sodný, 2,5% MeOH o pH* 9,0 (upraveno kyselinou boritou).
- Přídavek α -CD o koncentraci 1,5 mM měl pozitivní vliv na tvar píků.
- Jako vnitřní standard pro kvantitativní analýzu byl vybrán propylparaben v koncentraci 0,20 mg/ml.
- Separace probíhala v křemenné kapiláře s efektivní délkou 50 cm a vnitřním průměrem 50 μ m. UV detekce byla provedena při vlnové délce 200 nm (rutin), 246 nm (hesperidin) a 280 nm (diosmin). Vzorky byly dávkovány hydrodynamicky tlakem 50 mbar po dobu 6 s.
- Identifikace flavonoidů byla provedena přídavkem standardů.
- Při kvantitativní analýze byla využita metoda s vnitřním standardem. Koncentrační rozmezí pro rutin je 100,58 – 1005,80 μ g/ml, pro hesperidin 90,33 – 903,29 μ g/ml a pro diosmin 45,56 – 455,60 μ g/ml.
- Byla ověřena opakovatelnost metody pro koncentrace rutinu 240,19 μ g/ml, hesperidinu 215,71 μ g/ml a diosminu 100,80 μ g/ml. Hodnoty RSD jsou: 1,83 %; 2,11 % a 2,32 % (migrační časy), resp. 2,83 %; 3,05 % a 3,98 % (poměry ploch píků).
- Průměrné migrační časy flavonoidů jsou: Ru = 4,2 min., IS = 4,7 min., He = 5,5 min. a Di = 5,7 min.

- Rozlišení mezi jednotlivými píky byla v rozmezí 3,85 – 7,25. Analyty byly dokonale separovány. Asymetrie píků se pohybovala v rozmezí 1,1 – 2,2 a počet teoretických pater v hodnotách od 28 312 – 177 257.
- Optimalizovaná CZE metoda byla použita pro stanovení vybraných účinných látek v potravním doplňku HemoStop ProBio cps. Zjištěné obsahy látek v jedné tobolce byly: 20,84 mg (rutin), 55,13 mg (hesperidin) a 11,27 mg (diosmin). Obsah hesperidinu a diosminu není v souladu s deklarovaným množstvím v jedné tobolce, udávané výrobcem. V práci jsou diskutovány pravděpodobné příčiny získaných výsledků. Správnost metody z důvodu časové tísně pro vypracování diplomové práce nebyla testována (dlouhodobá porucha elektroforetického systému).

7 POUŽITÉ ZKRATKY

2D-HPLC	Dvourozměrná HPLC
ACN	Acetonitril
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BGE	Základní elektrolyt (background, pufr)
CD	Cyklodextrin
CE	Kapilární elektroforéza
CEC	Elektrochromatografie v naplněných kapilárách (Capillary Electrochromatography)
CGE	Kapilární gelová elektroforéza (Capillary Gel Electrophoresis)
CIEF	Kapilární isoelektrické fokusování (Capillary Isoelectric Focusing)
CITP	Kapilární izotachoforéza (Capillary Isotachopheresis)
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromid
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode Array detector)
Di	Diosmin
DMSO	Dimethylsufloxid
DP	Diplomová práce
ED	Efektivní délka kapiláry
EOF	Elektroosmotický tok (elektroosmóza)
ESI	Multimode Ion Source
EtOH	Ethanol
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)
He	Hesperidin
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-DAD-ESI-MS	High-Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detection - Mass Spectrometry Method with Electrospray Ionization Mode
ID	Vnitřní průměr
IS	Vnitřní standart
LC-MS	Negative Electrospray Ionization - Tandem Mass Spektrometry
LC-PDA	Liquid Chromatography - Photodiode Array
LIF	Laser Induced Fluorescence (laserem indukovaná fluorescence)
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
MECC	Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

**Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie
MELC	Microemulsion Liquid Chromatography
MeOH	Methanol
MP	Metylparaben
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NaOH	Hydroxid sodný
OR	Odměrný roztok
PDA	Photo diode – Array
PP	Propylparaben
Ru	Rutin
SDS	Sodium Dodecylsulphate (dodecylsírán sodný)
TLC	Chromatografie na tenké vrstvě
UV/VIS	Detekce v ultrafialovém/viditelném světle
ZR ST	Základní roztok standardů

8 SEZNAM VELIČIN A JEDNOTEK

8.1 Použité veličiny a jejich jednotky

v_{ef}	elektroforetická rychlost	[m.s ⁻¹]
v_{tot}	celková rychlost	[m.s ⁻¹]
v_{EOF}	rychlost elektroosmotického toku	[m.s ⁻¹]
μ_a	absolutní elektroforetická pohyblivost	[m ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]
μ_{ef}	efektivní elektroforetická pohyblivost (konstanta úměrnosti)	[m ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]
q	náboj částice	[C]
η	viskozita kapaliny	[N.s.m ⁻²]
r	poloměr částice	[m]
α	stupeň disociace	
ε	dielektrická konstanta základního elektrolytu	
ζ	zeta potenciál	
l	efektivní délka kapiláry,	
t_m	migrační čas	
I	elektrický proud	[A]
U	elektrické napětí	[V]
R	elektrický odpor	[Ω]
P	Příkon	[W]
E	intenzita elektrického pole	[V.m ⁻¹]
W	práce vykonaná při přenosu energie (Jouleovo teplo)	[J]

8.2 Vybrané vztahy použitých jednotek k základním jednotkám SI

C	coulomb	a platí C = A·s (jeden ampér za sekundu)
N	newton	a platí N = kg.m.s ⁻²
V	volt	a platí V = m ² .kg.s ⁻³ .A ⁻¹
Ω	ohm	a platí Ω = m ² .kg.s ⁻³ .A ⁻²
W	watt	a platí W = kg.m ² .s ⁻³
J	joule	a platí J = kg.m ² .s ⁻² (též N·m)

9 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Číslo obrázku	Název obrázku	Strana
1	Vzorec flavanu	12
2	2-fenylchroman	12
3	Rutin	14
4	Hesperidin	16
5	Diosmin	18
6	Schéma elektroforézy na papíře (dostupné z: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2250/Week_Three/electro4.jpg , citace 12.5.2010, upraveno)	21
7	Schéma elektroforézy v gelu (dostupné z: www.sci.muni.cz/LMFR/proteomika2005/Bi8202_2005_ELFO.pdf , citace 24.4.2009, upraveno)	22
8	Příčný řez kapilárou (dostupné z: www.placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CEzakl.pdf , citace 12.8.2009, upraveno)	22
9	Schéma CZE (dostupné z www.placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CEzakl.pdf , citace 12.8.2009, upraveno)	23
10	Schéma ITP (dostupné z Pospíšilová M.: přednáška Elektroforéza 2006/2007, Faf UK HK, upraveno)	24
11	Schéma CGE	25
12	Schéma MECC (dostupné z: http://www.ce-resources.com/mekc.jpg , citace 12.5.2010, upraveno)	26
13	Používané přístroje: Beckman Coulter, PrinCE	27
14	Mechanismy dávkování vzorku (dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/images/obr14.gif , citace 12.5.2010, upraveno)	28
15	Grafické znázornění EOF (dostupné z: http://micromachine.stanford.edu/~dlaser/images/eof_capillary.jpg , citace 12.5.2010, upraveno)	31
16	Schéma migrace při CZE s normálním EOF	33
17	Časové schéma migrace při reverzní CZE	34
18	Prostorové uspořádání CD (dostupné z . http://img.tfd.com/wiki/5/51/800px-Cyclodextrin.svg.png , citace 12.5.2010, upraveno)	38
19	Vliv koncentrace tetraboritanu na separaci (CZE, katodický EOF)	50
20	Vliv pH roztoku BGE	51
21	PrinCE: 35mM tetraboritan s obráceným EOF	52
22	Beckman Coulter: 35mM tetraboritan s obráceným EOF	52
23	Různé koncentrace methanolu	53
24	Různé koncentrace α - CD	54
25	Separace za optimálních podmínek při vlnové délce 200 nm (čísla = migrační časy v minutách)	57
26	Kalibrační závislost rutinu	59
27	Kalibrační závislost hesperidinu	60
28	Kalibrační závislost diosminu	61
29	Záznam měření pro rutin ($c = 240,19$ mg/ml, vlnová délka 200 nm)	64

**Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

30	Záznam měření pro hesperidin (c = 215,71 mg/ml, vlnová délka 246 nm)	64
31	Záznam měření pro diosmin (c = 100,80 mg/ml, vlnová délka 280 nm)	64
32	Záznam měření přípravku HemoStop ProBio (vlnová délka 200 nm)	68
33	Záznam měření přípravku HemoStop ProBio (vlnová délka 246 nm)	68
34	Záznam měření přípravku HemoStop ProBio (vlnová délka 280 nm)	68

Číslo tabulky	Název tabulky	Strana
1	Složení zásobních roztoků standardů (V = 50 ml)	41
2	Testované kalibrační roztoky	43
3	Složení kalibračních roztoků v ml	43
4	Optimální podmínky separace	56
5	Kalibrační závislost rutinu	59
6	Kalibrační závislost hesperidin	60
7	Kalibrační závislost diosminu	61
8	Kalibrační parametry	62
9	Opakovatelnost metody (RSD,s), n = 4	63
10	Rozlišení mezi píky (Rs), 200 nm	65
11	Ostatní elektroforetická data, n = 4	65
12	Stanovení účinných látek v doplňku stravy HemoStop ProBio (n = 3)	66

10 Použitá literatura

Citace

1. GAŠ, B. Kapilární elektroforéza: Separální analytická metoda pro věk mikročipů. Vesmír 80, 370-373, 2001. Dostupný z www: <http://www.cts.cuni.cz/vesmir>, [cit. 2010-01-01].
2. DUŠEK, M. Využití kapilární elektroforézy v analýze potravin. Praha, dizertační práce, 2004. 141 s.
3. BÖHM, K. Die Flavonoide. Eine Übersicht über ihre Physiologie, Pharmakodynamik und therapeutische Verwendung. Auledorf i. Würth : Ed. Cantor KG, 1967. 1545 s.
4. ZLOCH, Z. Krátká historie bioflavonoidů. Přírodní antioxidanty a volné radikály. 2003. Dostupný z www: www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/l/L_08AC.doc, [cit. 2010-01-01].
5. GÁBOR, M. Abriss der Pharmakologie von Flavonoiden. Budapešť: Akademie Kiadó, 1975. 1355 s.
6. VFU. Brno, 2001. Dostupné z www: <http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html>, [cit. 2006-02-13].
7. JOVANOVIC, S. V., STEENKEN, S., TOSIC, M. et al: JOURNAL OF AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 116, 4846 - 4851, 1994.
8. Wikipedia: Otevřená encyklopedie. 2009. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Rutin>, [cit. 2009-07-23].
9. HONG-JIANG, Ch., et al. Simultaneous determination of eleven bioactive compounds in Saururus chinensis from different harvesting seasons by HPLC-DAD. JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS [online]., 5, 1142 - 1146, 2010. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=6&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=1, [cit. 2010-03-15].
10. NING, L., et al. Simultaneous Determination of Four Flavonoids in Extract of Hawthorn Leaves by Microemulsion Liquid Chromatography. CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY [online]. 12, 1791 - 1794, 2009. Dostupný z www: <http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=10&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=3> [cit. 2010-03-15].
11. LANGZHU, Ch., et al. Simultaneous determination of flavonoids and phenolic acids in Chinese herbal tea by beta-cyclodextrin based capillary zone electrophoresis. MICROCHIMICA ACTA [online]. 3-4, 179 - 185, 2009. Dostupný z www: <Simultaneous determination of flavonoids and phenolic acids in Chinese herbal tea by beta-cyclodextrin based capillary zone electrophoresis>, [cit. 2010-03-15].

**Analyza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

12. SERRA, H., MENDES, T., BRONZE, M. R. et al: Prediction of Intestinal Absorption and Metabolism of Pharmacologically Active Flavones and Flavanones. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY* 16, 4009-4018, 2008.
13. Wikipedia: The Free Encyclopedia. 2009. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Hesperidin>, (přeloženo z anglického originálu), [cit. 2009-07-23].
14. INBARAJ, B. S., et al. Simultaneous Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS* [online]. 3, 549 - 556, 2010. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=13&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=2, [cit. 2010-03-15].
15. LEE, S., et al. Liquid Chromatographic Determination of Narirutin and Hesperidin in Zhi Ke (*Citrus aurantium* L.) in the Form of the Raw Herb and of the Dried Aqueous Extract. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL* [online]. 3, 78- - 796, 2009. Dostupný z www: <http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=13&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=6>, [cit. 2010-03-15].
16. CANCELON P.F. Analytical Monitoring of Citrus Juices by Using Capillary Electrophoresis. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL* [online]. 1, 95 - 106, 1999. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=16&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=5&doc=41, [cit. 2010-03-15].
17. Wikipedia: The Free Encyclopedia 2009. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Diosmin>, (přeloženo z anglického originálu) [cit. 2009-07-23].
18. ZHOU, Y., et al. Two-dimensional Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry for the Analysis of *Lobelia chinensis* Lour. using an ESI/APCI Multimode Ion Source. *JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE* [online]. 13, 2388 - 2394, 2008. Dostupný z www: http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=24&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=2, [cit. 2010-03-15].
19. ZHANG, Y., et al. Simultaneous Determination of Flavonoids in *Ixeridium Gracile* by Micellar Electrokinetic Chromatography. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS* [online]. 5, 742 - 746, 2007. Dostupný z www: <http://apps.isiknowledge.com.ezproxy.is.cuni.cz/full_record.do?product=WOS&search_mode=Refine&qid=24&SID=Z2Fk7ilpgA3bg4cb56j&page=1&doc=3>[cit. 2010-03-15].
20. HARVEY, D. *Modern Analytical Chemistry*. McGraw – Hill Higher Education. Boston, 2000. 816 s. ISBN 0–07–116953–9.
21. *Elektroforetické techniky*. 2005. Dostupné z: www.sci.muni.cz/LMFR/proteomika/2005/Bi8202_2005_ELFO.pdf, [cit. 2009-12-08].
22. FRÉBORT, I. *Elektroforéza proteinů*. 2000 Dostupné z www: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/1.%20Elektroforeza%20proteinu.pdf> [cit. 2010-03-18].

**Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích
metodou kapilární elektroforézy**

23. PLAČEK, L. Základy kapilární elektroforézy (CE, HPCE). 2004. Dostupné z [www: <placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CEzakl.pdf>](http://www.placek.lukas.sweb.cz/pdf_soubory/CEzakl.pdf), [cit. 2009-08-12].
24. DOLNÍK, V. Úvod do kapilární elektroforézy. Brno: AV ČR a společnost Chromspec, 1994.
25. MIKUŠ, P.; VALÁŠKOVÁ, I.; HAVRÁNEK, E. Talanta 65 . 2005 : 1031 s.
26. COUFAL, P. Capillary Electro-separations, CES. 2004. Dostupný z [www: http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.html](http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/ces.html), [cit. 2009-03-30].
27. KLOUDA, P. Moderní analytické metody. 2003. 132 s.
28. WEINBERGER, R. Practical Capillary Electrophoresis. Academic Press, San Diego, USA :, 2000. 462 s
29. Prince technologies. www.princetechnologies.eu [online]. 2004-2010.. Dostupné z [www:http://www.princetechnologies.eu/index.php?page=ce-systems](http://www.princetechnologies.eu/index.php?page=ce-systems), [cit. 2010-03-19].
30. Beckman Coulter. www.beckmancoulter.com [online]. 1998-2010. Dostupné z [www:http://www.beckmancoulter.com/resourcecenter/labresources/ce/celeadership.asp](http://www.beckmancoulter.com/resourcecenter/labresources/ce/celeadership.asp), [cit. 2010-03-19].
31. SHABIR, G. Validation of High-Performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis A. J. Chromatogr A., 2003. 987 s.
32. Český lékopis 2009, Grada Publishing, Praha 2009. 3 sv. (s 1174, 2672, 3942). ISBN 978-80-247-2994-7.
33. HONEGR, J. Využití elektroforetických metod v analýze látek přírodního původu. Hradec Králové, diplomová práce, 2007. 68 s. UNIVERZITA KARLOVA.
34. NOVOTNÁ, M. Kapilární elektroforéza v analýze bioflavonoidů a fytofarmak. Hradec Králové, diplomová práce, 2008. 51 s. UNIVERZITA KARLOVA.
35. MORIN, F., et al. Borate Complexation of Flavonoid-O-Glycosides in Capillary Electrophoresis, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 628, 153-160, 1993.
36. OPLETAL, I., ŠIMERDA, B.: Flavanoidy ve výživě zvířat. Dostupné z [http://www.vuzv.cz/sites/Flavanoidy\(2\).pdf](http://www.vuzv.cz/sites/Flavanoidy(2).pdf), [cit. 2010-05-19].

Zdroje

Bnet [online]. 2009,. Dostupný z [www: http://findarticles.com/p/articles/mi_m0FDN/is_3_9/ai_n6228169/](http://findarticles.com/p/articles/mi_m0FDN/is_3_9/ai_n6228169/), [cit. 2009-07-23].

Pharmainfo.net. <http://www.pharmainfo.net/> [online]. 2005-2009. Dostupný z: [www.<http://www.pharmainfo.net/reviews/microemulsion-electrokinetic-chromatography-and-its-applications>](http://www.pharmainfo.net/reviews/microemulsion-electrokinetic-chromatography-and-its-applications), [cit. 2009-12-08].

ROWAN DESIGN. <http://biochemie.sweb.cz/index.htm> [online]. 2004. Dostupný z: [www.<biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm >](http://www.biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm), [cit. 2009-12-08].

[Www.sci.muni.cz/LMFR/proteomika2005/Bi8202_2005_ELFO.pdf](http://www.sci.muni.cz/LMFR/proteomika2005/Bi8202_2005_ELFO.pdf) [online]. 2005, [cit. 2009-12-08].

KARLÍČEK, R, et al. Analytická chemie pro farmaceuty: Učební texty univerzity Karlovy v Praze. Praha: Karolinum, 2001. 263 s. ISBN 80-246-03448-9. 281 s.

POSPÍŠILOVÁ, M. Přednáška Elektroforéza 2006/2007, Farmaceutická fakulta UK Hradec Králové.

KUCHYŇKOVÁ, Š. Změny obsahových látek v brukvovité zelenině při různé kulinární úpravě. Brno, diplomová práce, 2007. 78 s. MASARYKOVA UNIVERZITA, Lékařská fakulta, Ústav preventivního lékařství. Dostupné z: [www:http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html](http://faf.vfu.cz/html/txts/flavonoids.html), [cit. 2009-12-08].

SPILKOVÁ, J. Flavonoidy. Přednáška z farmakognozie. 2006, s. 1 - 87.