

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



**VYUŽITÍ DISPERZNÍ EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI
PRO ANALÝZU VYBRANÝCH OBSAHOVÝCH LÁTEK
ZÁZVOROVNÍKU LÉKAŘSKÉHO**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Konzultant rigorózní práce: PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Mgr. Martina Urbanová

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

V Hradci Králové, _____

Mgr. Martina Urbanová

Chtěla bych poděkovat PharmDr. Lucii Chocholoušové Havlíkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, vstřícnost a podporu při vypracování mé rigorózní práce. Také bych ráda poděkovala všem ostatním pracovníkům katedry analytické chemie.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Martina Urbanová

Konzultant: PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

Název rigorózní práce: Využití disperzní extrakce na tuhou fázi pro analýzu vybraných obsahových látek zázvorovníku lékařského

Rigorózní práce byla zaměřena na vývoj extrakční metody pro analýzu vybraných obsahových látek zázvorovníku lékařského. Bylo vybráno několik vzorků obsahujících výtažky zázvorovníku lékařského. Při vývoji metody se vycházelo z diplomové práce Martiny Urbanové z roku 2015 [1]. Pro vyšší zakoncentrování byla vyzkoušena metoda disperzní extrakce na tuhou fázi (dSPE). Jako další metoda pro úpravu vzorku byla testována podporovaná kapalinová extrakce (SLE). Námi stanovované látky (6-gingerol, 8-gingerol, 6-shogaol a 10-gingerol) byly nalezeny téměř ve všech vzorcích. Ze sirupů bylo největší množství látek obsaženo v sirupu Kitl (příprava se studenou vodou). Z čajů bylo nejvíce látek obsaženo v Ovočno-bylinném čaji aromatizovaném, se zázvorem a citrónem. 6-shogaol nebyl obsažen u vzorků oddenků zázvoru pravého, ale v čajích a sirupech ano.

Během optimalizace metody bylo vyzkoušeno několik sorbentů. Vhodným sorbentem se jevil sorbent Oasis HLB. Analýza probíhala za chromatografických podmínek, které byly optimalizovány a jsou uvedeny v diplomové práci Martiny Urbanové z roku 2015 [1].

Vyvinutá metoda byla částečně validována. Byla hodnocena linearita, stabilita, správnost, přesnost a detekční a kvantitativní limit. Byl ověřován test způsobilosti chromatografického systému.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Martina Urbanová

Consultant: PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

Thesis Title: Dispersive Solid-Phase Extraction for the Analysis of Chosen Substances in *Zingiber officinale*

The thesis was focused on the development of optimal extraction method for the analysis of chosen substances contained in *Zingiber officinale*. Some representative samples containing extracts of *Zingiber officinale* were chosen. This method was based on the diploma thesis of Martina Urbanová [1]. To get a higher preconcentration factor, dispersive solid-phase extraction (dSPE) was tested for the sample pretreatment. Then, a method of supported liquid extraction (SLE) was examined as another methodology for the sample preparation. Chosen substances, 6-gingerol, 8-gingerol, 6-shogaol and 10-gingerol, were found in almost all samples. Among syrups, the largest amount of substances was contained in the Kitl syrup (preparation with cold water). Among teas, the highest number of substances was contained in Fruit-herbal tea flavored with ginger and lemon. 6-Shogaol was not found in rhizome samples, however, it has been found in the samples of teas and syrups.

During the optimization of this method, various sorbents were examined. The most suitable sorbent was Oasis HLB. The analysis took place under chromatographic conditions that had been optimized and presented in the diploma thesis of Martina Urbanová [1].

The developed method has been partially validated. The linearity, stability, accuracy, precision and limit of detection and limit of quantification were determined. The suitability test of the chromatographic system was being verified.

OBSAH

ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT	5
OBSAH.....	6
1. SEZNAM ZKRATEK.....	8
2. ÚVOD	9
3. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE	10
4. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
4.1 Zázvorovník lékařský	11
4.2 Použití zázvoru v populaci	12
4.3 Úprava vzorku.....	13
4.4 Extrakce na tuhou fázi.....	14
4.5 Disperzní extrakce na tuhou fázi	17
4.6 QuEChERS	19
4.7 Podporovaná kapalinová extrakce	20
4.8 Sorbenty	21
4.8.1 Oasis HLB	21
4.8.2 Supel Select HLB SPE	21
4.8.3 Supel QuE Z-Sep C18	21
4.8.4 PSA.....	21
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
5.1 Použitý materiál.....	23
5.1.1 Vzorky a standardy.....	23
5.1.2 Chemikálie	23
5.1.3 Přístroje a pomůcky	24
5.2 Příprava roztoků a vzorků.....	25
5.2.1 Příprava základních roztoků standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu	25
5.2.2 Příprava zásobního roztoku standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu	25
5.2.3 Příprava roztoku STANDARD	25

5.2.4	Příprava roztoku pro měření správnosti	25
5.2.5	Příprava vzorků se sorbenty Oasis HLB, Supel QuE Z-Sep C18, Supel Select HLB SPE a PSA	25
5.2.6	Příprava vzorků z oddenků zázvoru pravého.....	26
5.2.7	Příprava vzorků – tonic, sirupy, čaje	27
5.2.8	Příprava vzorků – podporovaná kapalinová extrakce (SLE)	29
5.2.9	Příprava roztoků standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu pro stanovení linearity	29
5.3	Chromatografické podmínky.....	31
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
6.1	Optimalizace metody	32
6.1.1	Výběr sorbentu	32
6.1.2	Promývací roztoky.....	38
6.2	Obsahové látky ve vzorcích – tonic, sirupy, čaje	39
6.3	SLE	44
6.4	Ověření metody – vnitřní standard	46
6.5	Stanovení obsahu určených látek ve vybraných vzorcích.....	48
6.6	Výsledky validace	50
6.6.1	Test způsobilosti chromatografického systému	50
6.6.2	Validace metody	55
7.	ZÁVĚR.....	65
8.	SEZNAM TABULEK	67
9.	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
10.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	69

1. SEZNAM ZKRATEK

6-G	6-gingerol
6-SH	6-shogaol
8-G	8-gingerol
10-G	10-gingerol
ACN	Acetonitril
A _s	Faktor symetrie
C8	Silikagelová kolona s 8-mi uhlíkatým postranním řetězcem
C18	Silikagelová kolona s 18-ti uhlíkatým postranním řetězcem
ČL	Český lékopis
dSPE	Disperzní extrakce na tuhou fázi
IS	Vnitřní standard
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	Detekční limit
LOQ	Kvantitativní limit
MetOH	Methanol
n	Počet měření
N	Zdánlivý počet teoretických pater
pH	Vodíkový exponent
QuEChERS	„Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe“
R	Korelační koeficient
R _i	Výtěžnost
R _s	Rozlišení
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SLE	Podporovaná kapalinová extrakce
SPE	Extrakce na tuhou fázi
S _T	Faktor stability
t _R	Retenční čas

2. ÚVOD

Zázvorovník lékařský je v současnosti stále oblíbenější a používanější bylinou. Hlavním významem jeho produkce jsou hlízovité oddenky, které se používají pro mnoho svých účinků - podpora imunity, prevence nachlazení, pomoc při horečce, nevolnostech, závratích a žaludečních potížích a dalších nemocech a symptomech.

V čerstvých zázvorových oddencích je obsaženo přibližně 80 % vody. Z ostatních látek mají největší význam silice a netěkavé fenolické ketony (především tzv. gingeroly a shogaoly).

Disperzní extrakce na tuhou fázi (dispersive solid-phase extraction, dSPE) je metodou úpravy vzorku založenou na extrakci na tuhé fázi. Metoda dSPE je často používána k tzv. předčištění. Může však být použita také pro zakoncentrování a retenci (zadržení) analytů. K výhodám této metody patří rychlost, jednoduchost, použití menších objemů vzorků a rozpouštědel a možnost velkého faktoru zakoncentrování.

3. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo vyvinout metodu, která by přinesla vyšší odezvy vybraných obsahových látek zázvorovníku lékařského. Bylo vybráno několik vzorků obsahujících výtažky zázvorovníku lékařského.

Kvůli vyššímu zakoncentrování a tím i citlivosti metody byla vyzkoušena metoda disperzní SPE. Byl hledán vhodný sorbent. Jako sorbenty byly kromě klasických HLB sorbentů používaných pro SPE vyzkoušeny i další sorbenty. Metoda byla částečně validována.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Zázvorovník lékařský

Zázvorovník lékařský (*Zingiber officinale* Rosc.), z čeledi zázvorovité (Zingiberaceae), je vytrvalá bylina. Hlavním významem produkce této byliny jsou hlízovité oddenky, které jsou známé pod názvem zázvor. Proto jsou v této rigorózní práci dále používány pojmy „zázvor“ a „zázvor pravý“ [1].

Zázvor se v současné době stává stále populárnější bylinou. Nejběžněji se používá při podpoře imunity, horečce a nachlazení, při nevolnostech, závratích a žaludečních potížích. Má však daleko širší spektrum účinků – působí například při onemocnění dýchacích cest, menstruačních potížích a křečích, onemocnění močových cest, poruchách prokrvení, stabilizaci psychiky a při dalších nemocech a symptomech. Dále pomáhá snižovat cholesterol, krevní tlak a hladinu cukru v krvi [1, 2].

V čerstvém zázvoru je obsaženo přibližně 80 % vody. Z ostatních látek mají největší význam silice (především zingiberen) a netěkavé fenolické ketony. Z fenolických ketonů je v zázvoru nejvíce zastoupen 6-gingerol, který je zde zároveň i nejpálivější látkou. V menším množství se v zázvoru poté nachází homology 6-gingerolu 8-gingerol a 10-gingerol. Gingeroly jsou zodpovědné za hlavní účinky zázvoru. Jsou však nestabilní a působením tepla, kyslíku a světla dochází k jejich dehydrataci na příslušné shogaoly [1, 2].

Podrobnější charakteristika rostliny, její léčebné použití a popis obsahových látek je uveden v diplomové práci Martiny Urbanové z roku 2015 [1].

4.2 Použití zázvoru v populaci

V současné době je zázvor nejvíce rozšířen ve formě čerstvých zázvorových oddenků. Na trhu jsou však k dispozici i jiné formy zázvoru – mletý zázvor (koření), sušený zázvor, kandovaný zázvor, sirupy, oleje, pastilky a tablety s obsahem zázvoru, čaje se zázvorem a další [3].

V populaci je asi nejoblíbenějším použitím zázvoru zázvorový čaj, kde se nejčastěji 2 – 3 cm čerstvého zázvorového oddenku oloupe, nastrouhá nebo nakrájí na malé kousky a zalije se čtvrt až půl litrem horké vody a po pěti minutách louhování se precedí. Může se přidat med, citronová šťáva, skořice nebo hřebíček. Často se také můžeme setkat s domácím zázvorovým sirupem. 2 lžičky čerstvého zázvoru se nakrájí na malé kousky a vaří se přibližně 30 minut ve 200 ml vody. Přidá se 100 g cukru nebo medu a nechá se zhoustnout. Naproti tomu komerční sirup Kitl Syrob Zázvorový (Kitl s.r.o., Česká republika) se vyrábí za studena z čerstvého, ručně lisovaného zázvorového oddenku, kde se po vylisování získá olejnatá šťáva, která se zahušťuje cukrem. Dále je možné připravit si zázvorový olej, kdy se šťáva vymačkaná ze zázvorového oddenku smíchá se sezamovým olejem v poměru 1:1. Dalším užitím zázvoru může být příprava zázvorové tinktury, kde se nastrouhaný zázvor pokape medem a citronovou šťávou. Tato směs se zalije vodkou a nechá se macerovat přibližně dva týdny. Zázvorové odvary a oleje nemají jen vnitřní užití, ale i vnější – například masáže, koupele nebo ve formě obkladů [3, 4, 5, 6, 7].

4.3 Úprava vzorku

Úprava vzorku před analýzou je často mnohem náročnější krok než samotná analýza. Cílem je zakoncentrování látek, které jsou ve vzorku zpravidla ve stopových množstvích a odstranění rušivých vlivů balastních látek. Moderní trendy v přípravě vzorku si kladou za cíl snížení množství použitých rozpouštědel a samotného vzorku, snížení počtu extrakčních kroků, celkové zkrácení doby přípravy vzorku a možnost automatizace [8, 9, 10].

Mezi moderní techniky úpravy vzorku patří mikroextrakce založené na SPE (extrakce na tuhé fázi), mikroextrakce založené na LLE (extrakce z kapaliny do kapaliny), on-line techniky a vysoce selektivní techniky. Další techniky úpravy vzorku jsou tzv. konvenční techniky, mezi které patří například SPE, LLE a srážení proteinů [9].

4.4 Extrakce na tuhou fázi

Extrakce na tuhou fázi (solid-phase extraction, SPE) je v současné době převládající proces, který se využívá pro úpravu vzorků před vlastní chromatografickou analýzou. Při SPE dochází k rozdělování analytu mezi tuhou fázi a kapalnou fázi. Základem je, aby rovnováha byla posunuta ve směru tuhé fáze. Výhodou této metody je její rychlost, jednoduchost, menší objemy vzorků a rozpouštědel, možnost automatizace a zakoncentrování analytu. Při metodě SPE dochází ke kontaktu analytu ve vzorku s aktivovanou tuhou fázi, která pohlcuje daný analyt, který je poté eluován a následně analyzován [10, 11].

Důležitým krokem pro provedení SPE je správný výběr stacionární fáze tak, aby mohlo dojít k zachycení látek s různými vlastnostmi. Bere se ohled především na chemické vlastnosti analytu a použitého rozpouštědla (při použití nepolárního rozpouštědla se nejčastěji uplatní polární sorbent a obráceně). Systémy fází mohou být:

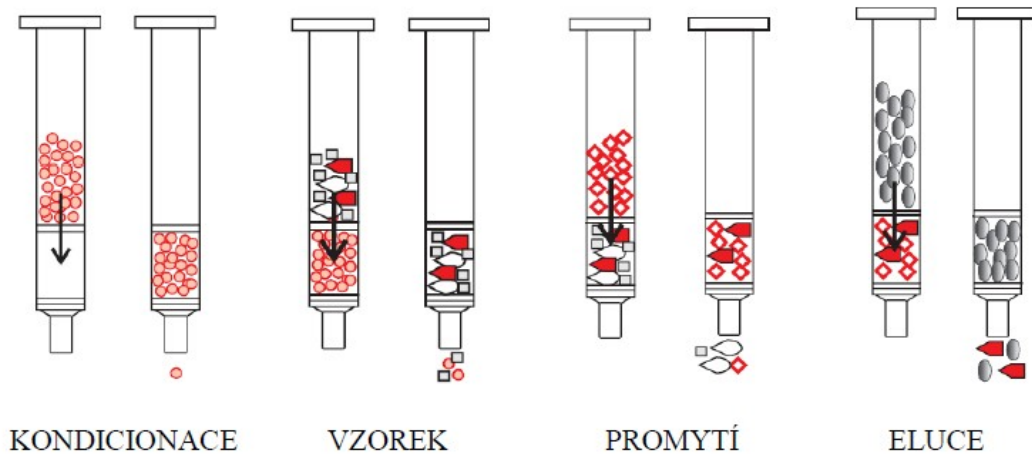
- reverzní – kapalná fáze je polární a tuhá fáze je nepolární
 - sorbent nejčastěji C18, C8
- normální – kapalná fáze je nepolární a tuhá fáze je polární
 - sorbent nejčastěji silikagel, oxid hlinitý, florisil
- iontoměniče – anxy (extrakce kyselin; sorbent nejčastěji silikagel s chemicky navázaným kvarterním nebo sekundárním aminem)
 - katexy (extrakce bází; sorbent nejčastěji silikagel s chemicky navázaným benzenem nebo propylsulfonovou kyselinou)
- polymerní materiály (polystyren-divinylbenzen, polymethylmethakrylát)
- a další [10, 11]

Dalším důležitým krokem před vlastní SPE je úprava vzorku. Kapalná fáze musí být vzájemně slučitelná s fází stacionární. Upravuje se například pH roztoku, jeho iontová síla nebo ředění. Mělo by být dosaženo takového roztoku, aby došlo

k účinnému zadržení látek na daném sorbentu. Účelem je také odstranění pevných částic roztoku, aby nedocházelo k ucpávání. Dále se upravuje objem vzorku. Při zvýšení objemu vzorku sice dochází k odstranění rozpouštědla použitého při kondicionaci, ale může se snížit výtěžnost a dojít k vymývání látek už při aplikaci vzorku. Také musí být regulací průtoku zabezpečen přijatelný kontakt vzorku se stacionární fází [10, 11].

Vlastní provedení SPE:

1. Kondicionace – při kondicionaci dochází ke smáčení sorbentu (jeho funkčních skupin) a tedy k aktivaci tuhé fáze pro interakci se vzorkem
2. Promytí – cílem je vytvoření takového stavu, který bude co nejvíce podobný stavu při aplikaci vzorku
3. Aplikace vzorku – při aplikaci vzorku dochází k různým reakcím mezi analyty a stacionární fází
4. Promytí – cílem je odstranění interferujících látek pomocí vhodného rozpouštědla, přičemž analyty jsou pohlcovány stacionární fází; analyty se musí co nejméně rozpouštět ve zvoleném rozpouštědle
5. Eluce – dochází k uvolnění látek ze stacionární fáze a jejich vymývání z SPE kolonky; důležitým krokem před samotnou elucí je vysušení kolonky (proudem vzduchu nebo inertního plynu) [10, 11]



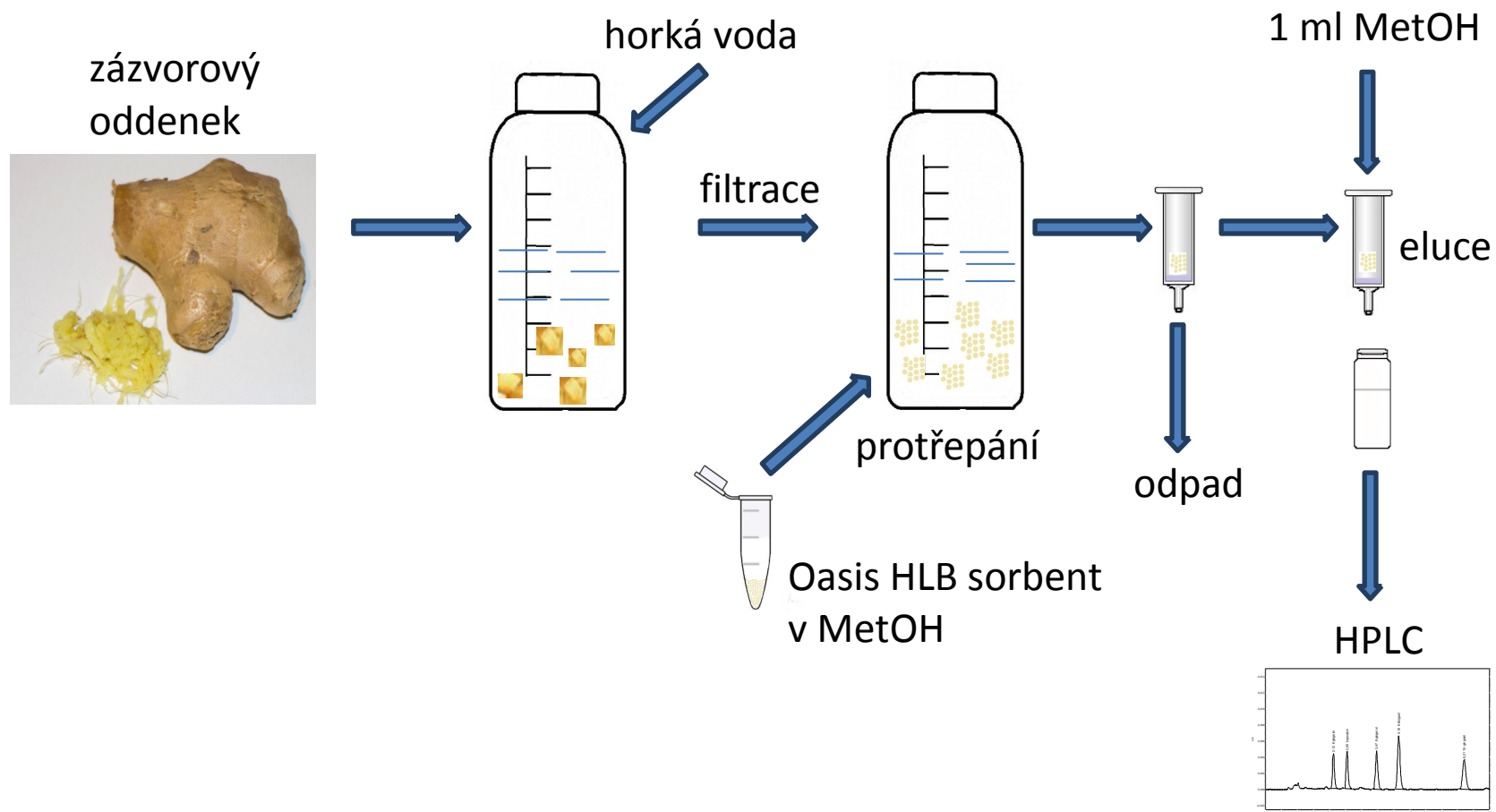
Obrázek 1: Provedení SPE [11]

4.5 Disperzní extrakce na tuhou fázi

Disperzní extrakce na tuhou fázi (dispersive solid-phase extraction, dSPE) je další metodou úpravy vzorku založenou na SPE. dSPE je často vztahována ke QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) a je používána k odstranění rušivých vlivů. Při dSPE je sorbent (PSA, C18 a další) přidáván přímo do vzorku. Následně je směs protřepána, odstředěna a supernatant je analyzován. Hlavním úkolem přidaného sorbentu je pohlcení ostatních látek ve vzorku, kdy analyty zůstávají v roztoku organického rozpouštědla [12, 13, 14, 15, 16].

Metoda dSPE nemusí být používána pouze pro tzv. předčištění ale také pro zakoncentrování a retenci analytů. Sorbent dSPE je přidán do vzorku, vzorek je protřepán, filtrován a analyty jsou eluovány pomocí organického rozpouštědla [17].

V odborné literatuře se oba principy (předčištění i zakoncentrování) používají shodně pod stejným označením dSPE, což bývá často matoucí a nejednoznačné pro čtenáře.



Obrázek 2: Metoda dSPE

4.6 QuEChERS

Extrakční metoda QuEChERS (akronym ze slov Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe – rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní a bezpečný) je rychlá moderní metoda, při které je v jednom kroku provedena extrakce vzorku a následně i jeho přečištění. Tato metoda používá soustavu dvou původně mísitelných rozpouštědel. Nejprve dochází k převedení analytu z vodného vzorku do organického rozpouštědla a následně k oddělení přídatkem solí (NaCl, MgSO₄). Původně byla tato metoda používána pro stanovení zbytků pesticidů v různých potravinách. V těchto vzorcích následovalo přečištění pomocí SPE směsí primárních a sekundárních aminů. U některých vzorků může být krok SPE vynechán a je tak analyzován čistý extrakt [18].

4.7 Podporovaná kapalinová extrakce

Podporovaná kapalinová extrakce (supported liquid extraction, SLE) je poměrně nová metoda úpravy vzorku. Je rychlejší a jednodušší než LLE. K dalším výhodám patří například možnost automatizace, nízké ztráty analytů a možnost zpracovávat malé i velké objemy vzorků. Na rozdíl od LLE je při metodě SLE používán nosič, díky kterému je umožněna extrakce analytů z vodné fáze do organického rozpouštědla. Nejčastěji používaným nosičem je křemelina, která je umístěna v plastové kolonce. Vodný roztok vzorku se nanese na kolonku s nosičem. Na nosiči dojde k absorpci analytů, které jsou následně vymyty s vodou nemísitelným rozpouštědlem [19, 20, 21].

4.8 Sorbenty

V této kapitole je uvedena základní charakteristika sorbentů používaných v rámci této rigorózní práce.

4.8.1 Oasis HLB

Sorbent Oasis HLB je používán především pro polární látky. Jedná se o kopolymerní pryskyřici složenou ze dvou monomerů – hydrofilního N-vinylpyrrolidonu a hydrofobního divinylbenzenu. Je univerzální pro kyselé, neutrální i bazické látky a je odolný vůči extrémním hodnotám pH [22].

4.8.2 Supel Select HLB SPE

Supel Select HLB SPE je sorbent využitelný pro celou řadu látek. Jedná se o polymer – hydrofilně modifikovaný vinylbenzen. Hydrofilní úpravy předurčují jeho využití hlavně pro polární látky. Tento sorbent je univerzální pro celé rozmezí pH 0-14 [23].

4.8.3 Supel QuE Z-Sep C18

Tento sorbent se skládá z oxidu zirkoničitého vázaného na oxid křemičitý v kombinaci s C18. Má uplatnění v analýze hydrofobních látek. Používá se pro vzorky, které obsahují méně než 15 % tuků. Dochází zde k hydrofobním interakcím a k interakcím mechanismu Lewisova kyselina/Lewisova báze [23].

4.8.4 PSA

Sorbent PSA obsahuje ethylendiamin-N-propylovou fázi, která obsahuje primární i sekundární aminy. Má silnou schopnost zadržet mastné kyseliny, organické kyseliny, polární barviva a cukry [23].

Z námi používaných sorbentů se HLB sorbenty (Oasis HLB a Supel Select HLB SPE) používají především pro SPE. Sorbenty Supel QuE Z-Sep C18 a PSA jsou spíše

využívány v rámci metody QuEChERS k přečištění organické vrstvy s pomocí dSPE techniky [22, 23].

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použitý materiál

5.1.1 Vzorky a standardy

- Oddenky zázvoru pravého
- River Original Ginger Ale, výrobce neuveden, prodávající v ČR: MASPEX Czech s.r.o., šarže: 0711728 BDG
- Bylinný sirup ZÁZVOR s vitamínem C, Klášterní officína – Ing. Marek Motyčka, Česká republika, šarže: L13-08-37
- Kitl Syrob Zázvorový, Kitl s.r.o., Česká republika, šarže: neuvedená
- Grüner Tee mit Ingwer und Orangen-Aroma, Ostfriesische Tee Gesellschaft Laurens Spethmann GmbH & Co. KG, Německo, šarže: 440843161
- Ovočno-bylinný čaj aromatizovaný, s příchutí pomeranče a zázvoru, vyrobeno v EU, prodávající v ČR: TEEKANNE s.r.o., šarže: L29AZ01:42K CH:915521
- Ovočno-bylinný čaj aromatizovaný, se zázvorem a citrónem, vyrobeno v EU, prodávající v ČR: TEEKANNE s.r.o., šarže: L28KZ05:17K CH:928656
- Ginger Tea, George Steuarts Teas, Srí Lanka, šarže: neuvedená
- 6-gingerol, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika, šarže: SLBL6032V
- 8-gingerol, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika, šarže: SLBD7801V
- 10-gingerol, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika, šarže: 050M1879
- 6-shogaol, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika, šarže: BCBK2950V

5.1.2 Chemikálie

- Acetonitril pro HPLC CHROMASOLV®, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika, šarže: STBF5762V
- Methanol pro HPLC CHROMASOLV, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika, šarže: STBF4539V
- Kyselina octová ledová, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika, šarže: SZBD1070V
- Octan amonný, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika, šarže: SZBD2550V
- Dichlormethan, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika, šarže: 356549/1 296

- Propyl 4-hydroxybenzoát, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika, šarže: 113499933505086

5.1.3 Přístroje a pomůcky

- Kapalinový chromatograf LC 2010 C Shimadzu, Japonsko
- Chromatografický software Class VP 6.13, Shimadzu, Japonsko
- Chromatografická kolona Ascentis® Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm; 2,7 µm), SIGMA-ALDRICH®, Česká republika
- Analytické váhy, Sartorius, Německo
- Filtrační zařízení pro přípravu ultračisté vody Milli-Q RG, Millipore, USA
- Filtrační zařízení pro filtraci mobilní fáze Millipore, USA
- Filtrační papíry MN 640d, MACHEREY-NAGEL, Německo
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec, Badelin, Německo
- Centrifuga EBA 21, Hettich Zentrifugen, Německo
- SPE kolonky:
 - Oasis HLB, Waters, Česká republika
 - Supel QuE Z-Sep C18, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika
 - Supel Select HLB SPE, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika
 - PSA, SIGMA-ALDRICH®, Česká republika
- NOVUM SLE, 12cc Tube, Phenomenex, USA
- Elektrický vaříč
- Ostatní pomůcky: odměrné válce, kádinky, pipety, pipetovací balónek, centrifugační zkumavky, mikrozukavky, váženky, lžičky, třecí misky, tloučky a další

5.2 Příprava roztoků a vzorků

5.2.1 Příprava základních roztoků standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu

Na přípravu základních roztoků standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu bylo naváženo 1,0 mg každého standardu. Tyto navážky byly jednotlivě rozpuštěny v 1,0 ml methanolu.

5.2.2 Příprava zásobního roztoku standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu

Na přípravu zásobního roztoku standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu byly do vialky naváženy 2,0 mg 6-gingerolu a k této navážce bylo přidáno 200 μ l základního roztoku standardu 8-gingerolu, 200 μ l zásobního roztoku standardu 6-shogaolu a 200 μ l zásobního roztoku standardu 10-gingerolu, které byly připraveny podle kapitoly 5.2.1. Do vialky bylo následně přidáno 400 μ l methanolu.

5.2.3 Příprava roztoku STANDARD

Pro přípravu roztoku STANDARD byl použit zásobní roztok standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu, jehož příprava byla popsána v kapitole 5.2.2. Bylo odebráno 25 μ l tohoto roztoku a doplněno methanolem do objemu 100 μ l.

5.2.4 Příprava roztoku pro měření správnosti

Bylo odebráno 400 μ l zásobního roztoku standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu, jehož příprava byla popsána v kapitole 5.2.2. Následně bylo přidáno 400 μ l methanolu.

5.2.5 Příprava vzorků se sorbenty Oasis HLB, Supel QuE Z-Sep C18, Supel Select HLB SPE a PSA

0,5 ml zásobního roztoku standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu, jehož příprava byla popsána v kapitole 5.2.2, bylo dáno

do centrifugační zkumavky a doplněno vodou do 30 ml. Do mikrozkušavky bylo naváženo přibližně 25 mg sorbentu a byl k němu přidán 1,00 ml methanolu na aktivaci sorbentu. Obsah mikrozkušavky byl protřepán a kvantitativně přenesen do centrifugační zkumavky. Zkušavka byla na 15 minut umístěna do ultrazvukové lázně s ledem, poté byla protřepána a filtrována přes prázdnou Oasis® HLB Cartridge. Následně proběhla eluce 1,00 ml methanolu.

5.2.6 Příprava vzorků z oddenků zázvoru pravého

5.2.6.1 Vzorek z oddenků zázvoru pravého s vodou a sorbenty

Zázvorové oddenky byly oloupany a rozmělněny v třecí misce. 1,0 g oddenků byl navážen do centrifugační zkumavky, odměrným válcem bylo přidáno 40,00 ml horké vody (80 °C) a zkumavky byly umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně. Po vychladnutí bylo filtrováno 20,00 ml přes filtrační papír (MN 640d) do centrifugační zkumavky. Do mikrozkušavky bylo naváženo přibližně 25 mg sorbentu (Oasis HLB, Supel Select HLB SPE nebo Supel QuE Z-Sep C18) a byl k němu přidán 1,00 ml methanolu na aktivaci sorbentu. Další postup je stejný s postupem uvedeným v kapitole 5.2.5.

5.2.6.2 Vzorek z oddenků zázvoru pravého s vodou; promytí 0,1% kyselinou octovou

Zázvorové oddenky byly oloupany a rozmělněny v třecí misce. 1,0 g oddenků byl navážen do centrifugačních zkumavek, bylo přidáno 40,00 ml horké vody a zkumavky byly umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně. Po vychladnutí byl obsah filtrován přes filtrační papír (MN 640d) do centrifugačních zkumavek. Do mikrozkušavky bylo naváženo přibližně 25 mg sorbentu Oasis HLB a byl k němu přidán 1,00 ml methanolu na aktivaci sorbentu. Obsah mikrozkušavky byl protřepán a kvantitativně přenesen do centrifugační zkumavky. Zkušavka byla následně umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně s ledem, protřepána a filtrována přes prázdnou Oasis® HLB Cartridge. SPE kolonka byla promyta 0,1% kyselinou octovou. Následně proběhla eluce 1,00 ml methanolu.

Podobně byly připraveny i další vzorky, u kterých byly použity různé promývací směsi: 0,1% kyselina octová a 5% methanol, 0,1% kyselina octová a 20% methanol, 0,1% kyselina octová a 30% methanol, 10mM octan amonný a 15% methanol, 10mM octan amonný (pH 8) a 15% methanol.

5.2.6.3 Vzorek z oddenků zázvoru pravého s přidavkem propylparabenu (vnitřní standard IS)

Zázvorové oddenky byly oloupany a rozmělněny v třecí misce. 1,0 g oddenků byl navážen do centrifugačních zkumavek, odměrným válcem bylo přidáno 40 ml horké vody a zkumavky byly umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně. Po vychladnutí byl obsah filtrován přes filtrační papír (MN 640d) do centrifugačních zkumavek. Do jiných centrifugačních zkumavek bylo pipetou odebráno 20 ml vzorku a bylo k němu přidáno 50 µl propylparabenu. Do mikrozukumavky bylo naváženo přibližně 25 mg sorbentu Oasis HLB a byl k němu přidán 1,00 ml methanolu na aktivaci sorbentu. Další postup je stejný s postupem uvedeným v kapitole 5.2.5.

5.2.6.4 Vzorek z oddenků zázvoru pravého s 200 ml vody

Zázvorové oddenky byly oloupany a rozmělněny v třecí misce. 5,0 g oddenků bylo naváženo do kádinky, odměrným válcem bylo přidáno 200 ml studené vody a vzorek byl přiveden k varu. Kádinka byla následně umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně. Po vychladnutí byl vzorek filtrován přes filtrační papír (MN 640d) a do centrifugačních zkumavek bylo odebráno 20 ml. Do mikrozukumavky bylo naváženo přibližně 25 mg sorbentu Oasis HLB a byl k němu přidán 1,00 ml methanolu na aktivaci sorbentu. Další postup je stejný s postupem uvedeným v kapitole 5.2.5.

5.2.7 Příprava vzorků – tonic, sirupy, čaje

5.2.7.1 Tonic (River Original Ginger Ale)

Do centrifugační zkumavky bylo pipetou odměřeno 40 ml tonic. Do mikrozukumavky bylo naváženo přibližně 25 mg sorbentu Oasis HLB a byl k němu

přidán 1,00 ml methanolu na aktivaci sorbentu. Další postup je stejný s postupem uvedeným v kapitole 5.2.5.

5.2.7.2 *Sirup Kitl (Kitl Syrob Zázvorový)*

Do centrifugačních zkumavek bylo pipetou odměřeno 5 ml sirupu. Sirup byl následně doplněn vodou (studenou nebo horkou) do objemu 40 ml. Zkumavka byla umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně. Do mikrozukumavky bylo naváženo přibližně 25 mg sorbentu Oasis HLB a byl k němu přidán 1,00 ml methanolu na aktivaci sorbentu. Další postup je stejný s postupem uvedeným v kapitole 5.2.5.

5.2.7.3 *Sirup s vitamínem C (Bylinný sirup ZÁZVOR s vitamínem C)*

20 ml sirupu bylo odměřeno pipetou do centrifugačních zkumavek. Sirup byl následně doplněn vodou do objemu 40 ml. Zkumavka byla umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně. Do mikrozukumavky bylo naváženo přibližně 25 mg sorbentu Oasis HLB a byl k němu přidán 1,00 ml methanolu na aktivaci sorbentu. Další postup je stejný s postupem uvedeným v kapitole 5.2.5.

5.2.7.4 *Čaje (Grüner Tee mit Ingwer und Orangen-Aroma; Ovocno-bylinný čaj aromatizovaný, s příchutí pomeranče a zázvoru; Ovocno-bylinný čaj aromatizovaný, se zázvorem a citrónem)*

Do kádinky bylo pomocí odměrného válce odměřeno 40 ml horké vody a do ní byl vložen sáček čaje. Čaj byl 10 minut louhován. Po vylouhování bylo do centrifugační zkumavky odměřeno 20,00 ml čaje a k němu bylo přidáno 20,00 ml vody. Do mikrozukumavky bylo naváženo přibližně 25 mg sorbentu Oasis HLB a byl k němu přidán 1,00 ml methanolu na aktivaci sorbentu. Další postup je stejný s postupem uvedeným v kapitole 5.2.5.

5.2.7.5 *Sypaný čaj (Ginger Tea)*

1,0 g sypaného čaje byl navážen do centrifugační zkumavky a pomocí odměrného válce k němu bylo přidáno 40 ml horké vody. Čaj byl 10 minut louhován. Další postup je stejný s postupem uvedeným v kapitole 5.2.7.4.

5.2.8 Příprava vzorků – podporovaná kapalinová extrakce (SLE)

5.2.8.1 *Příprava roztoku standard SLE s ethylacetátem*

Do odměrné baňky na 20 ml byly napipetovány 2,00 ml zásobního roztoku standardů připraveného podle kapitoly 5.2.2 a byly doplněny vodou po značku. 5,00 ml tohoto roztoku bylo prokapáno kolonkou SLE. Následně bylo prokapáno kolonkou SLE do vialky 5,00 ml ethylacetátu. Její obsah byl vysušen pod dusíkem a po úplném vysušení byl do vialky přidán 1,00 ml methanolu a vše bylo umístěno na 5 minut do ultrazvukové lázně.

Podobně byl připraven i další roztok, u kterého byl místo ethylacetátu použit dichlormethan.

5.2.8.2 *Příprava vzorku sirup Kitl s vodou*

5 ml sirupu bylo doplněno vodou do 10 ml. Celý objem byl poté prokapán kolonkou SLE. 10,00 ml ethylacetátu bylo prokapáno kolonkou SLE do vialky. Její obsah byl vysušen pod dusíkem a po úplném vysušení byl do vialky přidán 1,00 ml methanolu a vše bylo umístěno na 5 minut do ultrazvukové lázně.

5.2.9 Příprava roztoků standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu pro stanovení linearitu

Linearita byla stanovována postupným ředěním základních roztoků standardů, jejichž postup přípravy je popsán v kapitole 5.2.1. Ředění je uvedeno na následujícím schématu:

	základní roztoky standardů					
	↓					
odebráno [μl]	100	75	50	30	20	10
	↓					
doplněno MetOH [μl]	100	200	300	380	420	460
	↓					
celkový objem [μl]	500					

5.3 Chromatografické podmínky

Chromatografická kolona:	Ascentis® Express Phenyl-Hexyl (100 x 4,6 mm; 2,7 µm)
Mobilní fáze:	ACN/H ₂ O
Poměr složek mobilní fáze:	50/50 (v/v)
Průtok mobilní fáze:	1 ml/min
Nástřik:	5 µl
UV detekce:	282 nm
Teplota:	50 °C

Uvedené chromatografické podmínky byly optimalizovány a jsou uvedeny v diplomové práci Martiny Urbanové z roku 2015 [1].

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

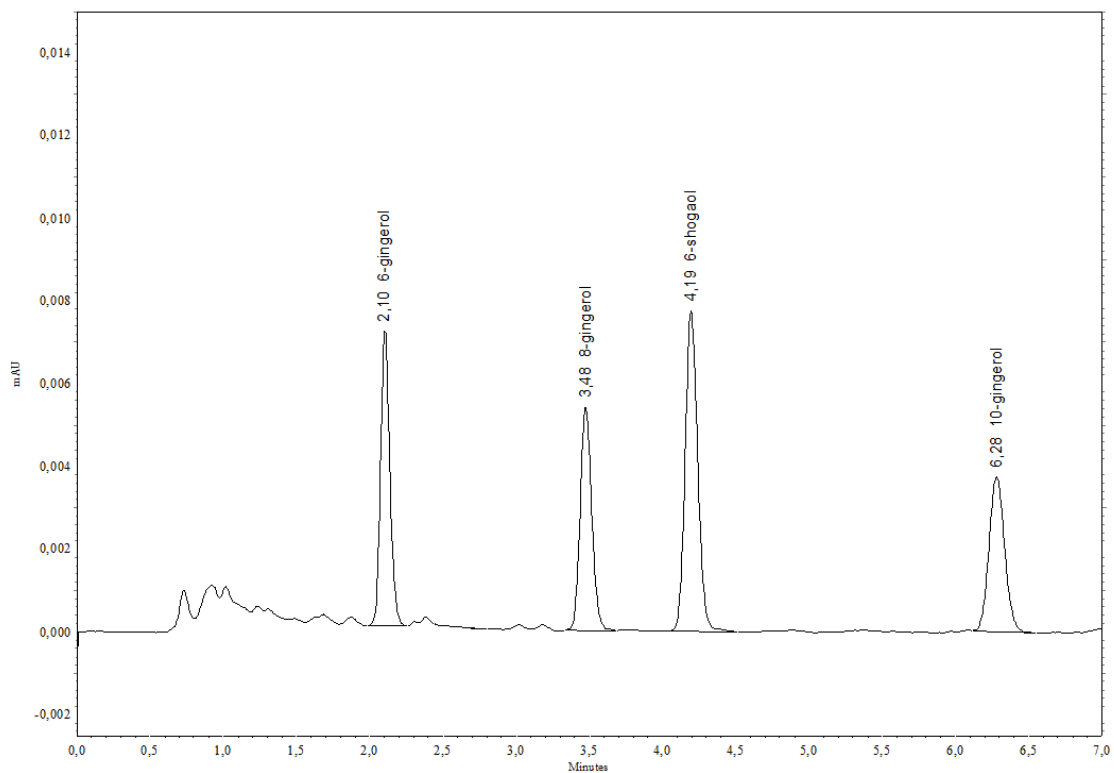
6.1 *Optimalizace metody*

Pro analýzu vybraných obsahových látek zázvorovníku lékařského se vycházelo z diplomové práce Martiny Urbanové z roku 2015 [1], ve které byly odezvy jednotlivých analytů velmi nízké (s výjimkou 6-gingerolu). Bylo potřeba se zaměřit na zakoncentrování vzorků při jejich úpravě. V diplomové práci byly testovány jednoduché extrakční postupy, proto byla kvůli vyššímu zakoncentrování vyzkoušena metoda disperzní SPE (dSPE) a následně také podporovaná kapalinová extrakce (SLE). Byly testovány dostupné sorbenty (Oasis HLB, Supel QuE Z-Sep C18, Supel Select HLB SPE a PSA), které byly vodou smáčitelné, což byla jedna z podmínek pro jejich použití. Také byl optimalizován postup homogenizace vzorku a následně filtrace. Filtrace se ukázala jako klíčový krok před vlastní dSPE, jelikož často docházelo k ucpávání filtračních materiálů.

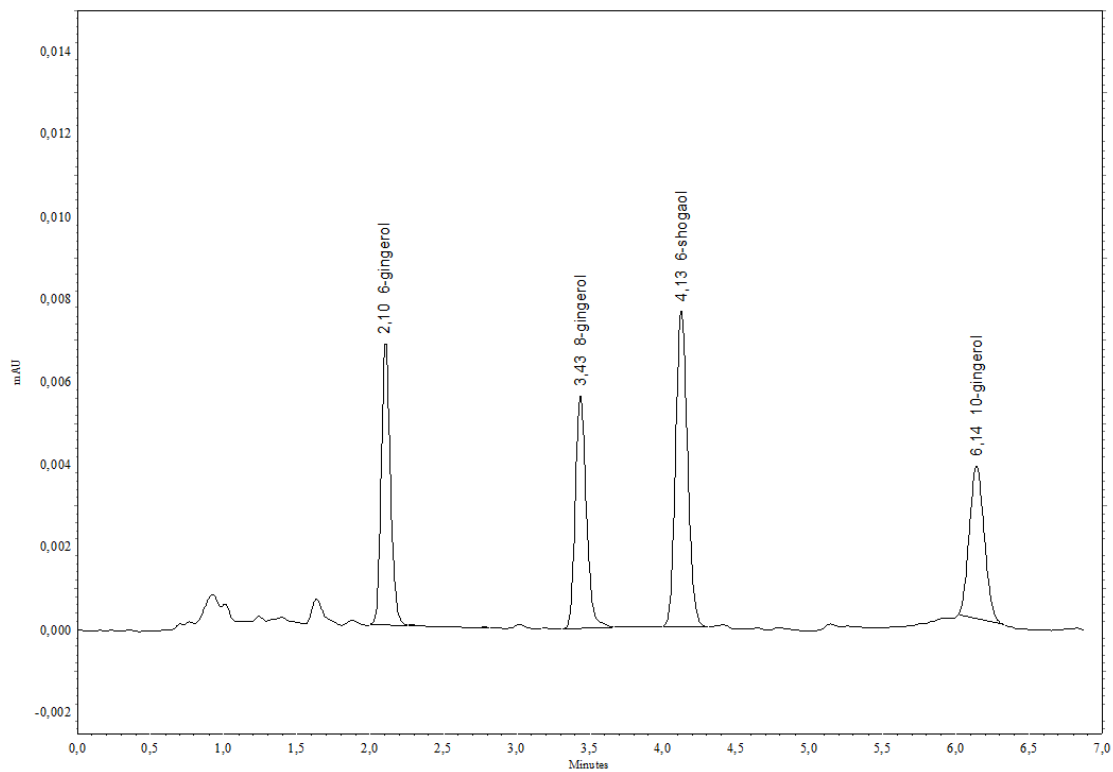
6.1.1 **Výběr sorbentu**

6.1.1.1 *Vzorky se standardy*

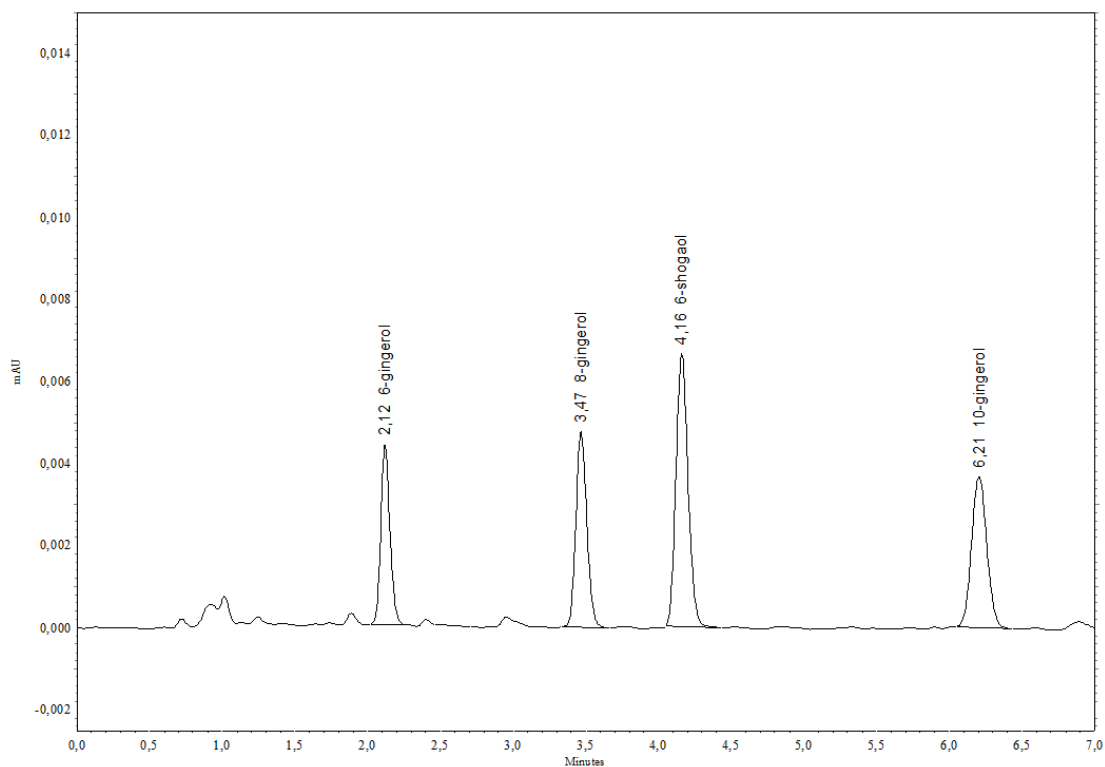
Pro výběr vhodného sorbentu byly použity vzorky se sorbenty Oasis HLB, Supel QuE Z-Sep C18, Supel Select HLB SPE a PSA, jejichž příprava byla popsána v kapitole 5.2.5. Vše bylo naměřeno za optimálních chromatografických podmínek – viz kapitola 5.3. Na následujících obrázcích (Obrázek 3 – 6) jsou uvedeny chromatogramy standardů po provedení dSPE při použití jednotlivých typů sorbentů.



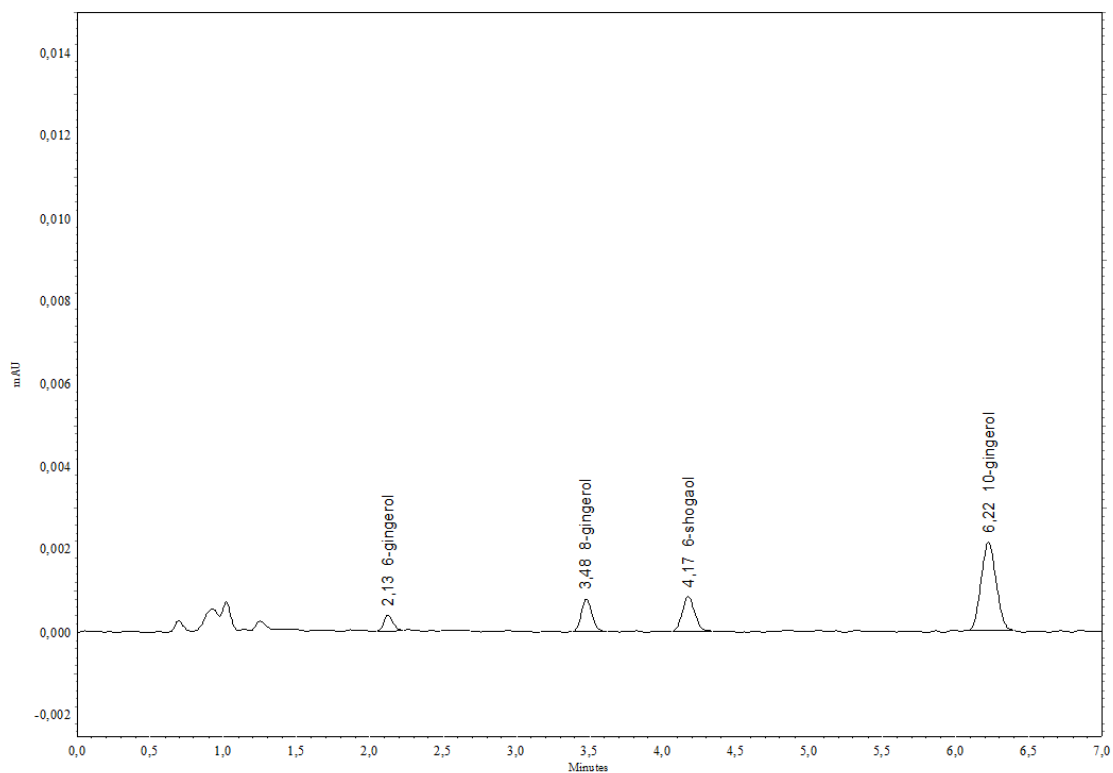
Obrázek 3: Chromatogram standardů; sorbent: Oasis HLB



Obrázek 4: Chromatogram standardů; sorbent: Supel Select HLB SPE



Obrázek 5: Chromatogram standardů; sorbent: Supel QuE Z-Sep C18

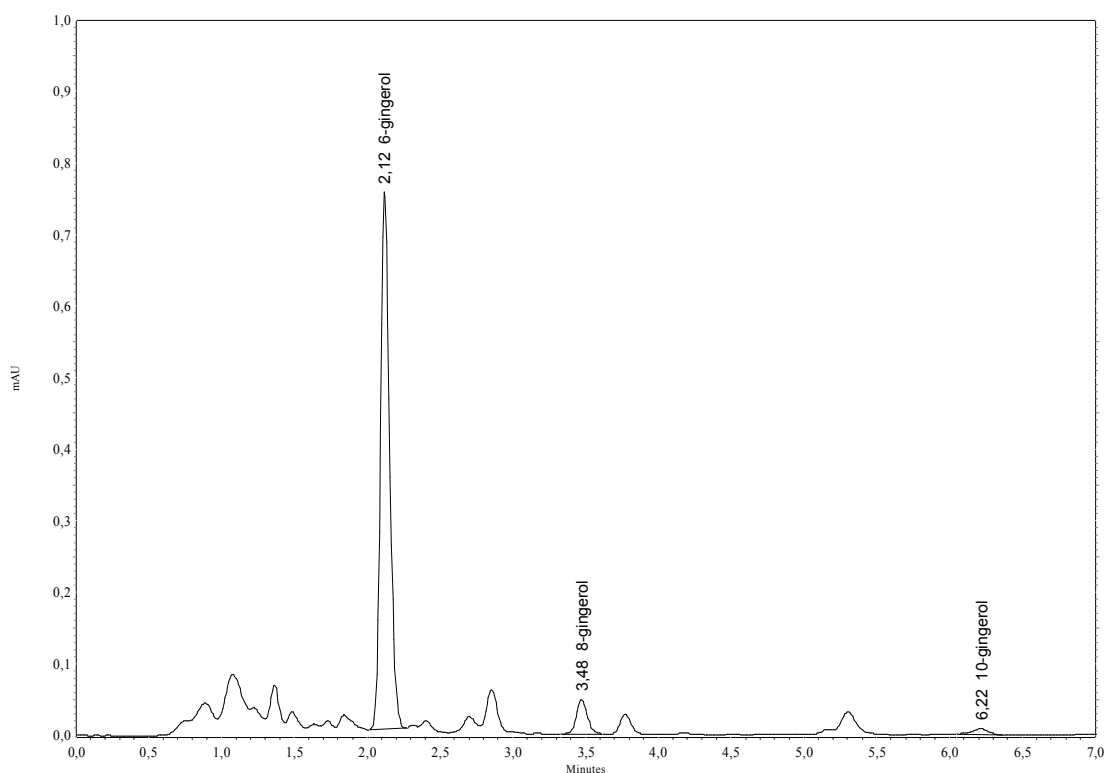


Obrázek 6: Chromatogram standardů; sorbent: PSA

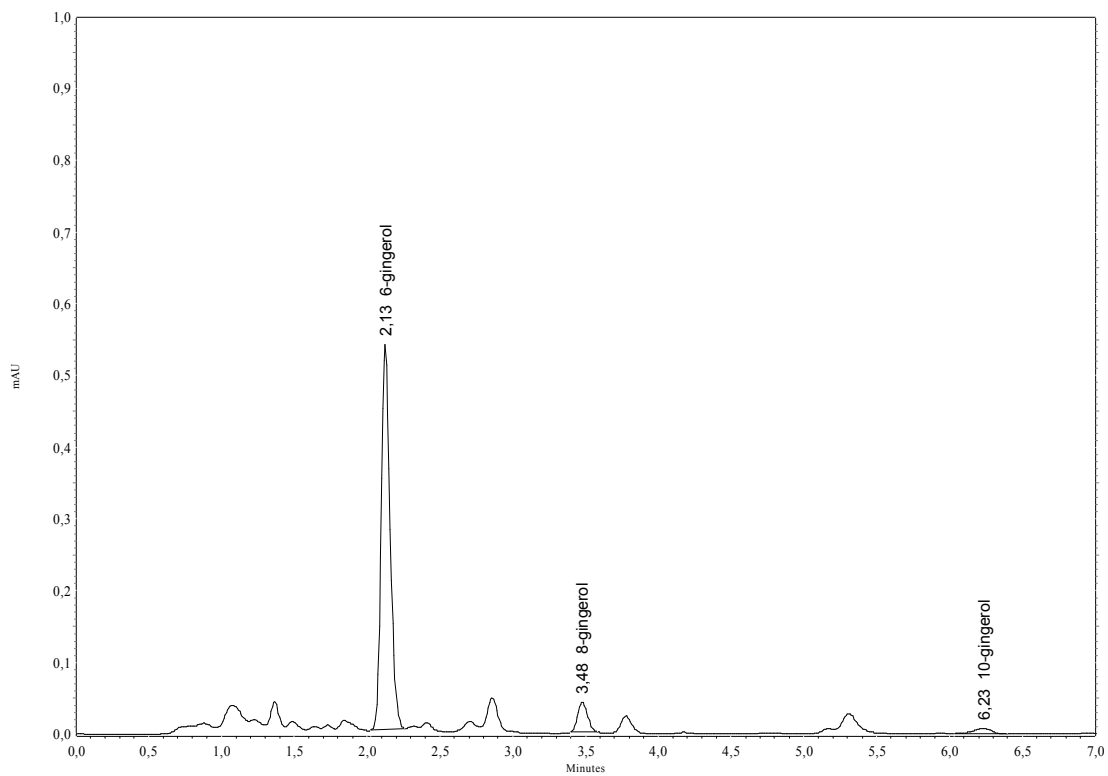
Plochy analytů byly porovnány a jako vhodné sorbenty pro vzorky oddenků zázvoru pravého byly vybrány sorbenty Oasis HLB (výťažnost se u jednotlivých analytů pohybovala v rozmezí 89 - 100 %), Supel QuE Z-Sep C18 (výťažnost 83 - 90 %) a Supel Select HLB SPE (výťažnost 56 - 76 %). Kvůli nízkým odezvám stanovovaných látek byl vyřazen sorbent PSA, kde výťažnost dosahovala maximálně 51 %.

6.1.1.2 *Vzorky s oddenký zázvoru pravého*

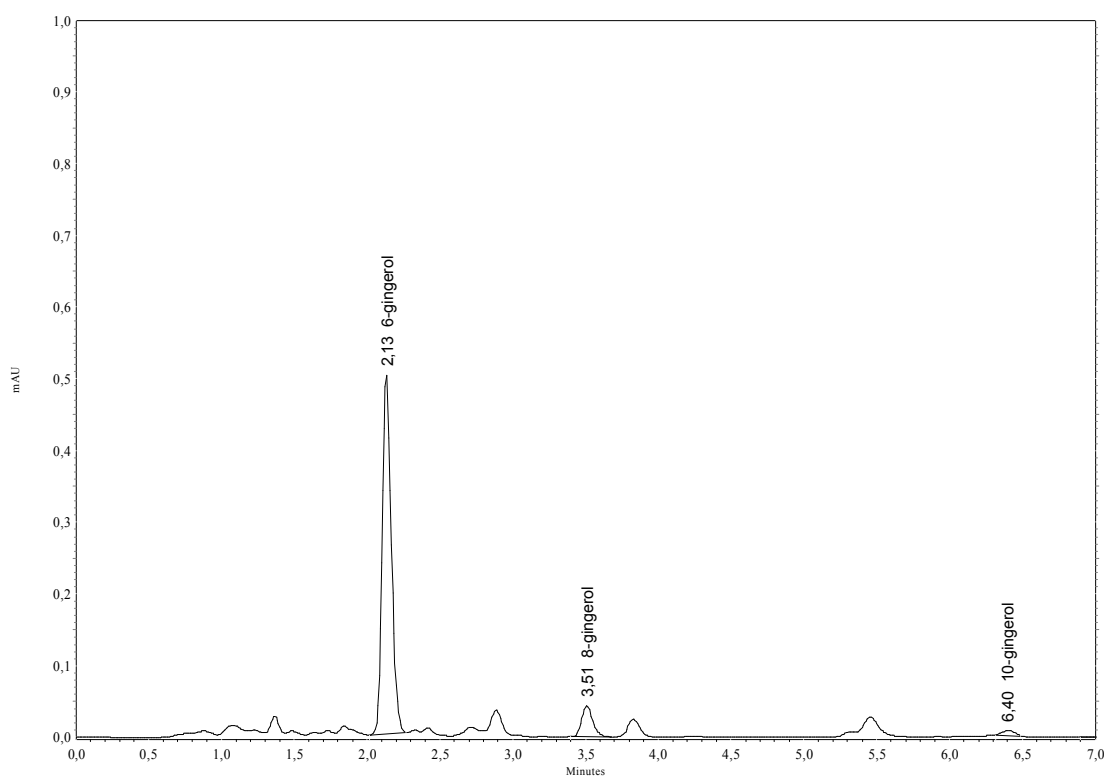
Pro výběr vhodného sorbentu byly použity vzorky z oddenků zázvoru pravého s vodou a sorbenty, které byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 5.2.6.1. Vše bylo naměřeno za optimálních chromatografických podmínek – viz kapitola 5.3. Na dalších obrázcích (Obrázek 7 – 9) jsou uvedeny chromatogramy oddenků zázvoru pravého po provedení dSPE při použití uvedených typů sorbentů.



Obrázek 7: Chromatogram oddenků zázvoru pravého; sorbent: Oasis HLB



Obrázek 8: Chromatogram oddenků zázvoru pravého; sorbent: Supel Select HLB SPE



Obrázek 9: Chromatogram oddenků zázvoru pravého; sorbent: Supel QuE Z-Sep C18

Nejvyšší odezvy jednotlivých analytů byly opět pro sorbent Oasis HLB. Proto byl tento sorbent vybrán pro další práci.

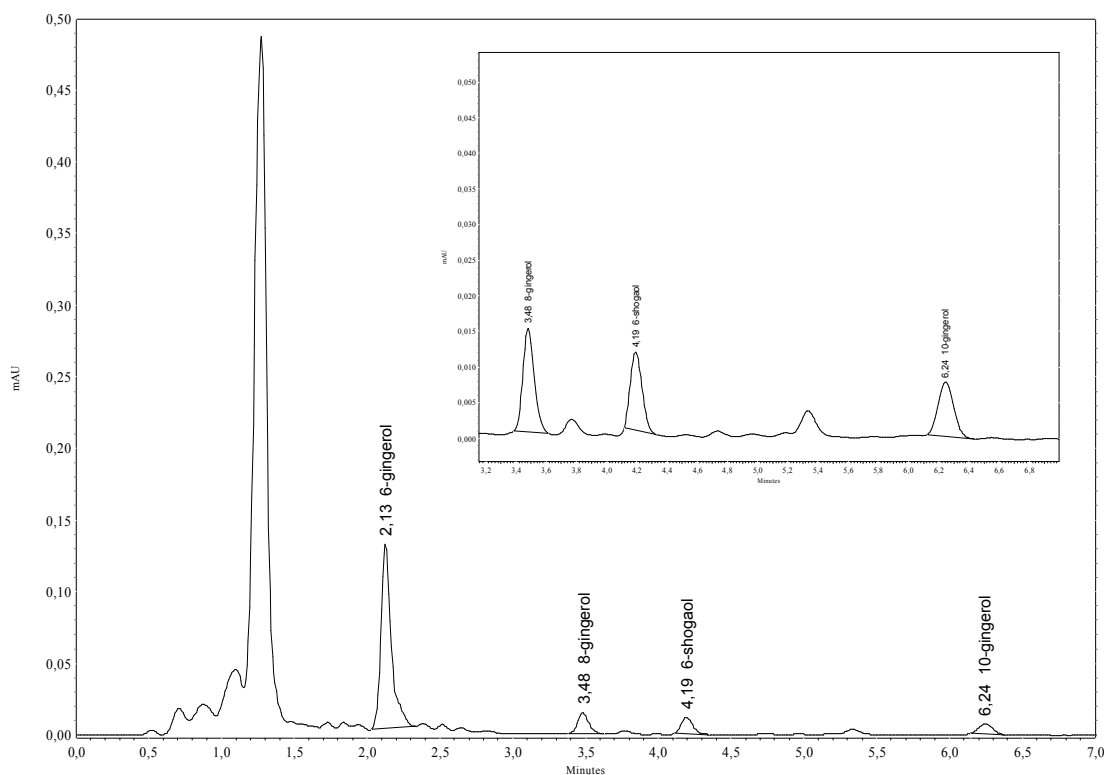
6.1.2 Promývací roztoky

Jako promývací roztoky byly použity směsi 0,1% kyseliny octové a methanolu a směsi 10mM octanu amonného a methanolu. Byla použita i samotná 0,1% kyselina octová. Postupy příprav jednotlivých vzorků jsou uvedeny v kapitole 5.2.6.2. Promývací roztoky s různým obsahem organické fáze a o různé hodnotě pH byly vyzkoušeny s cílem získání čistšího chromatografického záznamu bez balastních látek z matrice vzorku.

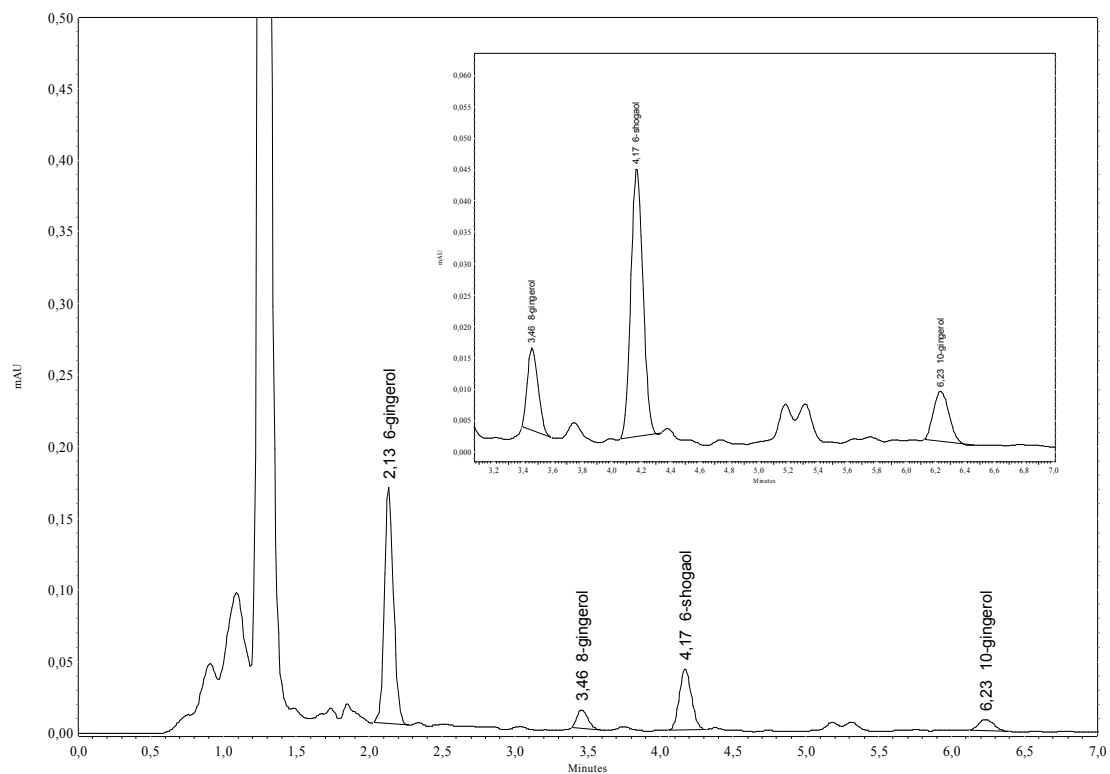
Ani jedna z použitých promývacích směsí neměla vliv na chromatografický záznam.

6.2 Obsahové látky ve vzorcích – tonic, sirupy, čaje

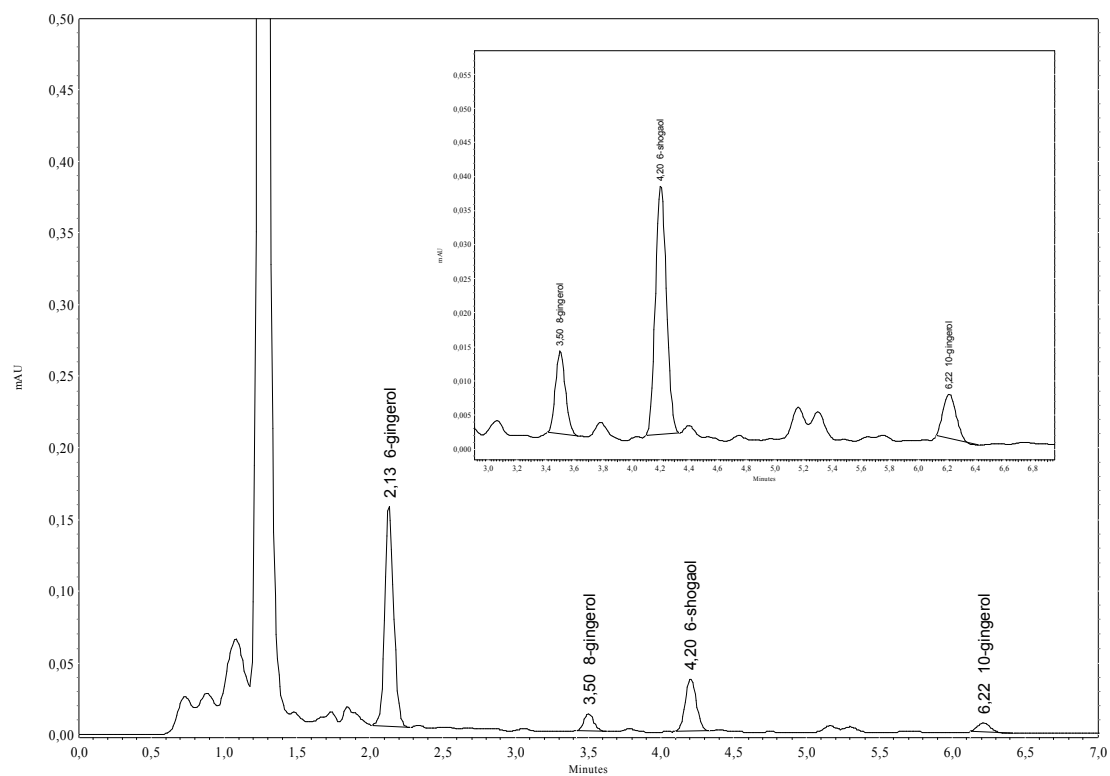
Vyvinutá metoda byla vyzkoušena na několika vzorcích dostupných nápojů a přípravků – byly analyzovány vzorky čajů, dále sirupy a zázvorový tonic. Postupy příprav těchto vzorků jsou uvedeny v kapitole 5.2.7. Chromatografické záznamy analýz jednotlivých vzorků jsou uvedeny na následujících obrázcích – Obrázek 10 – 17.



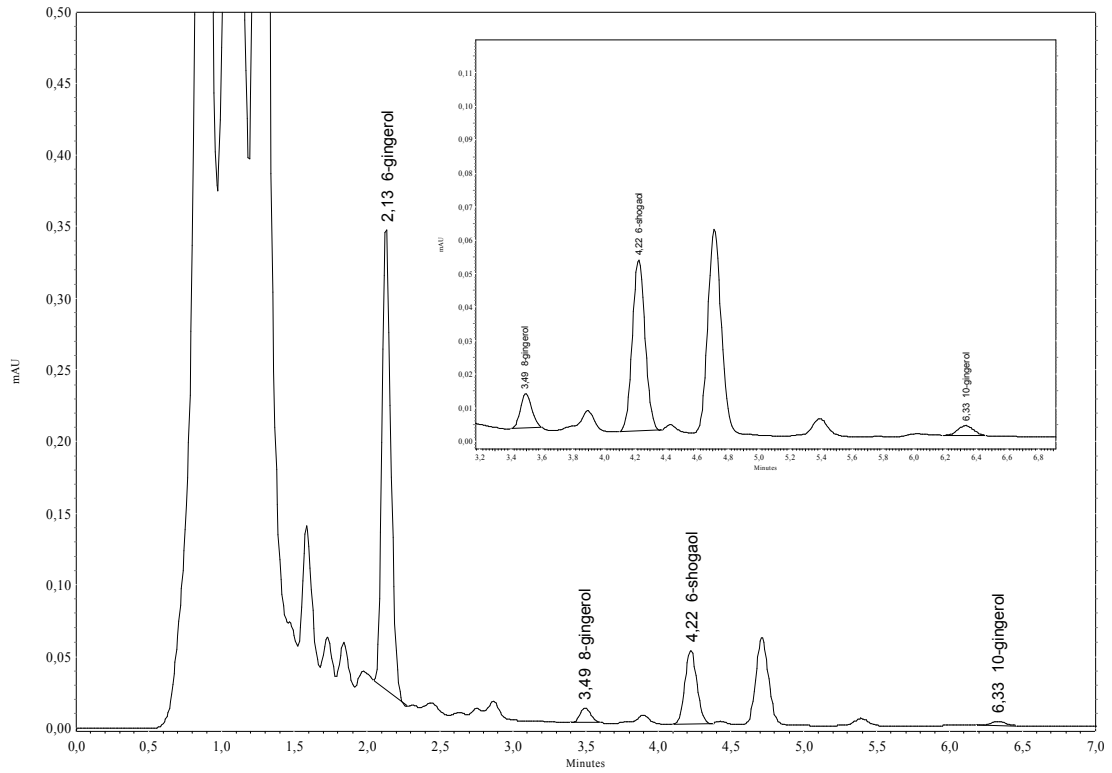
Obrázek 10: Chromatogram vzorku - Tonic



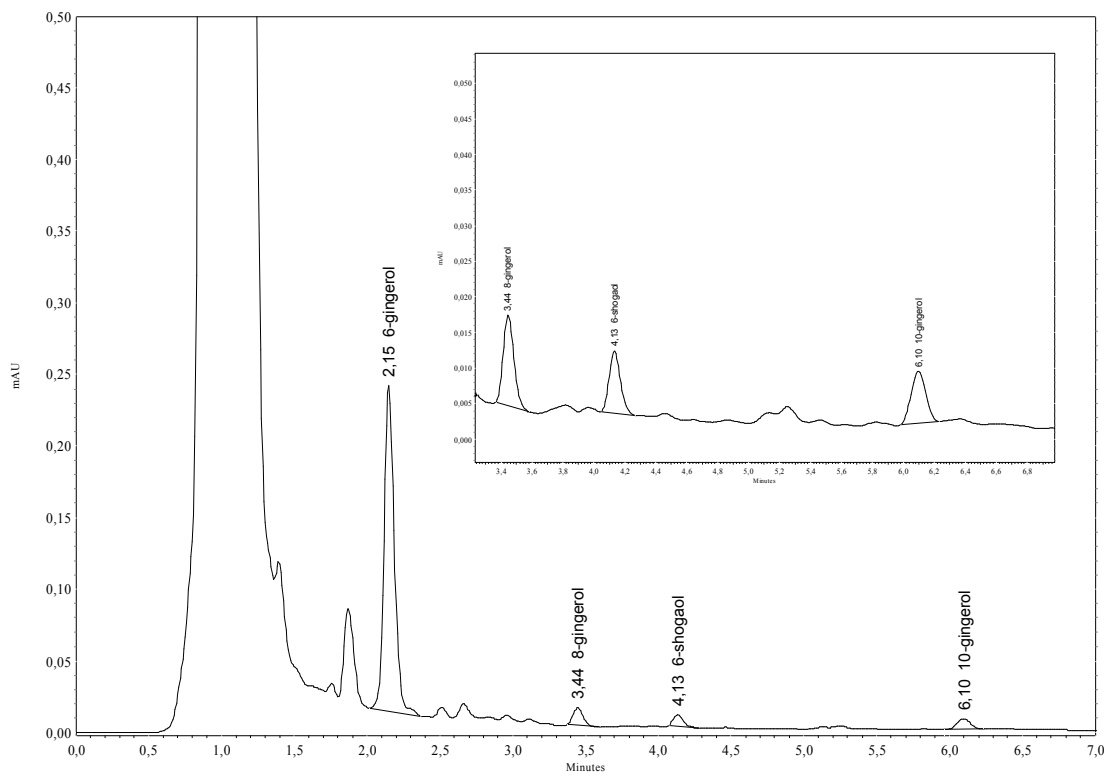
Obrázek 11: Chromatogram vzorku - Sirup Kitl (studená voda)



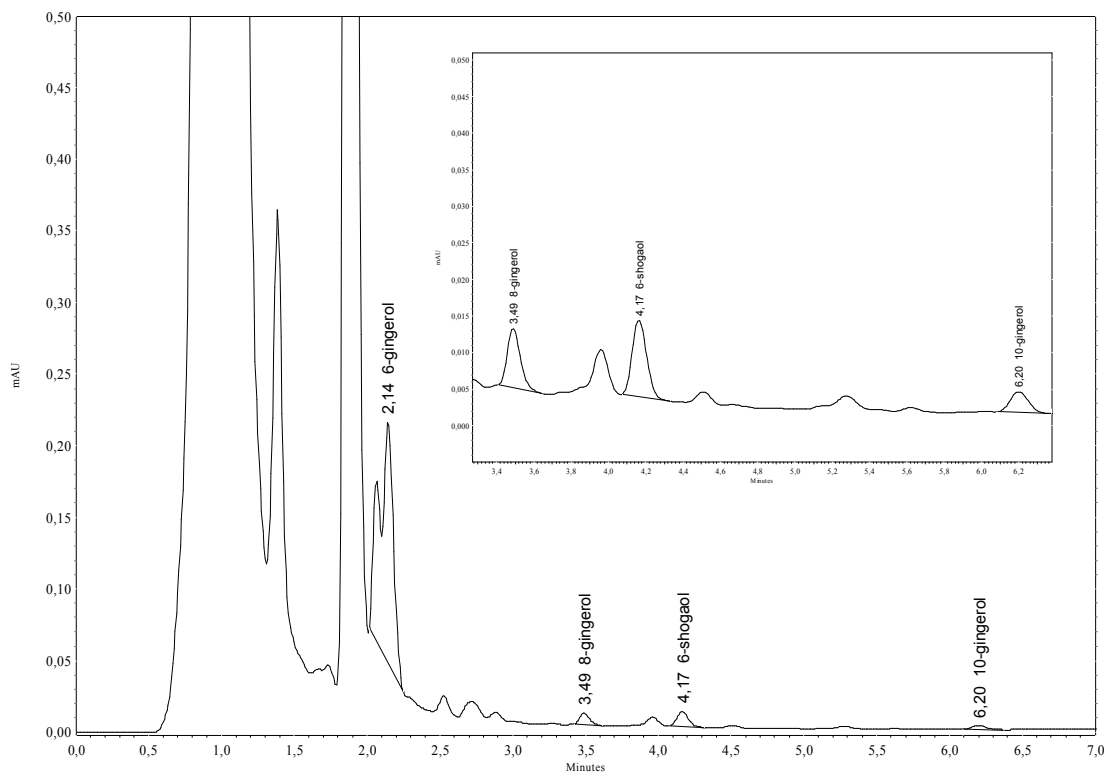
Obrázek 12: Chromatogram vzorku - Sirup Kitl (horká voda)



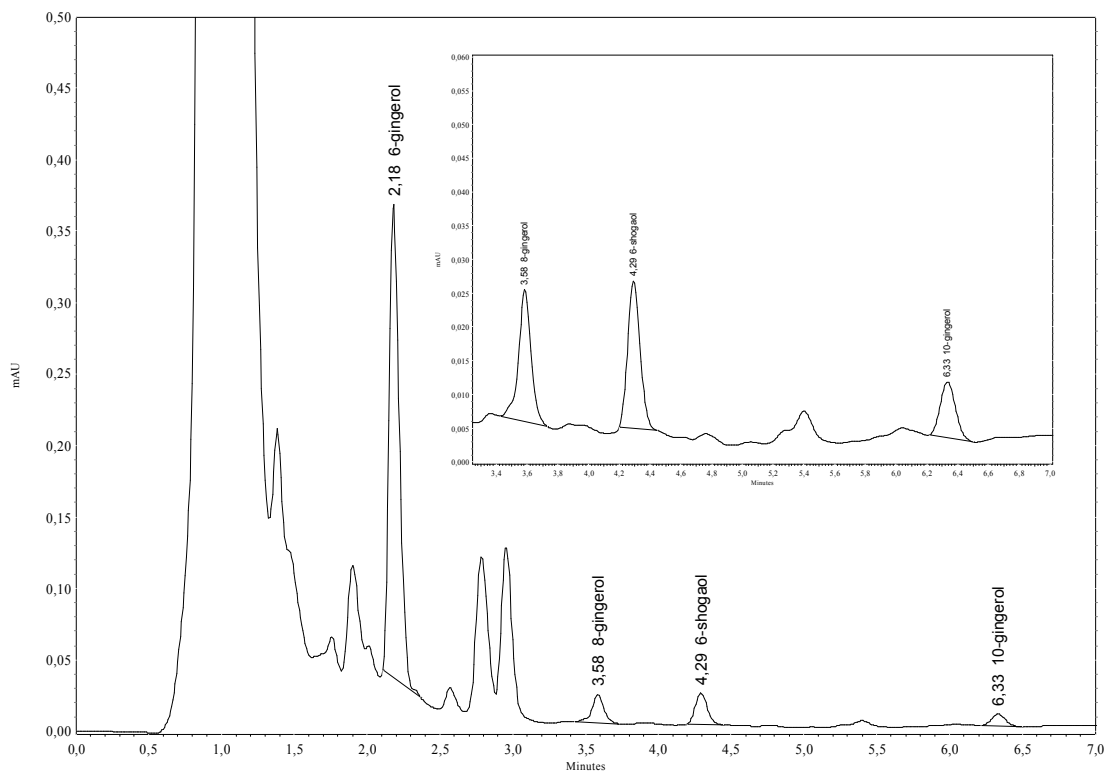
Obrázek 13: Chromatogram vzorku - Sirup s vitamínem C



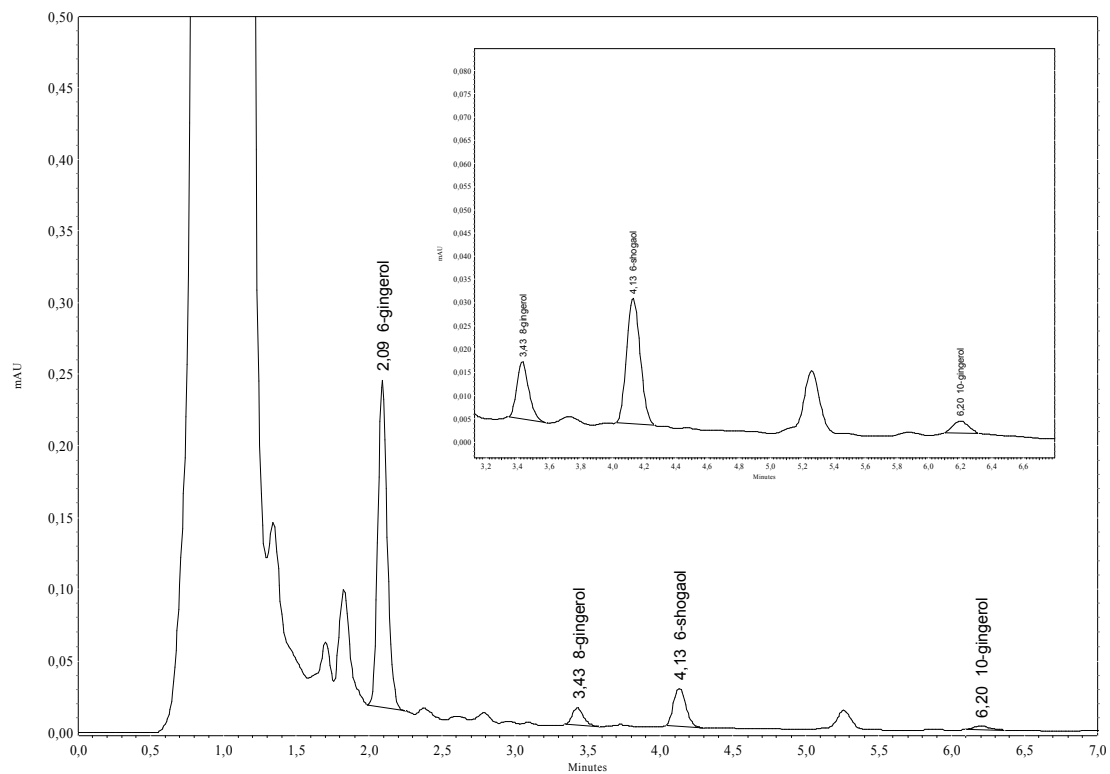
Obrázek 14: Chromatogram vzorku - Grüner Tee mit Ingwer und Orangen-Aroma



Obrázek 15: Chromatogram vzorku - Ovočno-bylinný čaj aromatizovaný, s příchutí pomeranče a zázvoru



Obrázek 16: Chromatogram vzorku - Ovočno-bylinný čaj aromatizovaný, se zázvorem a citrónem

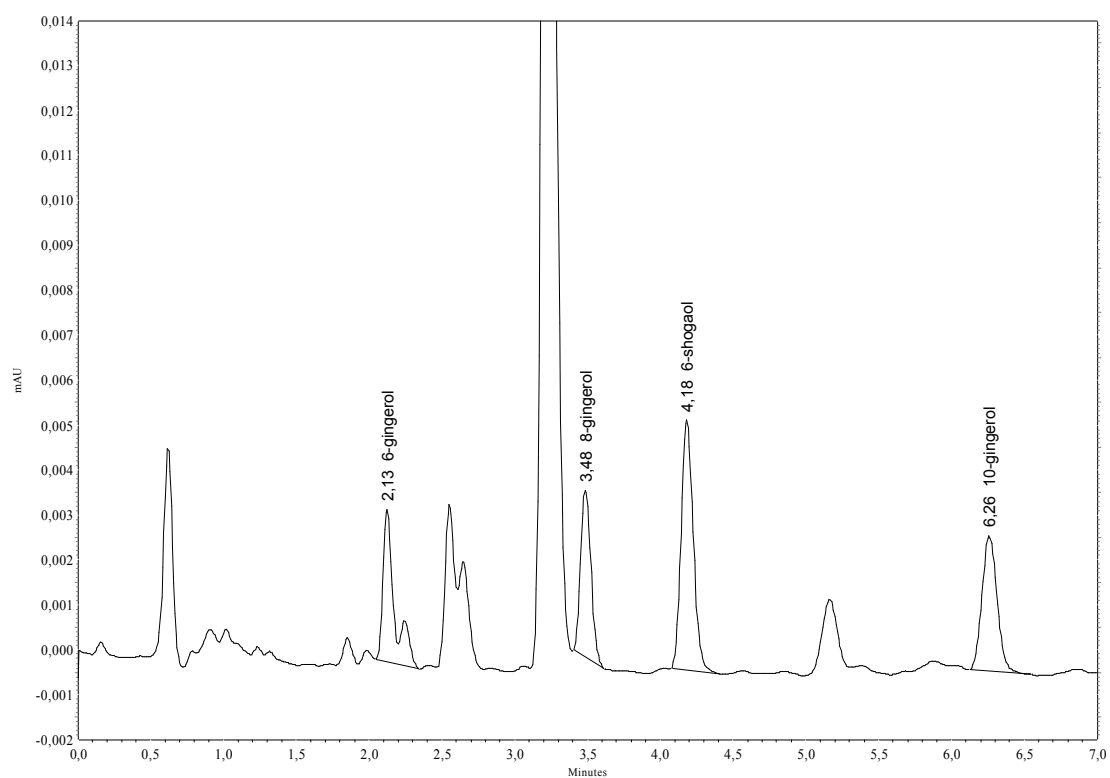


Obrázek 17: Chromatogram vzorku - Sypaný čaj

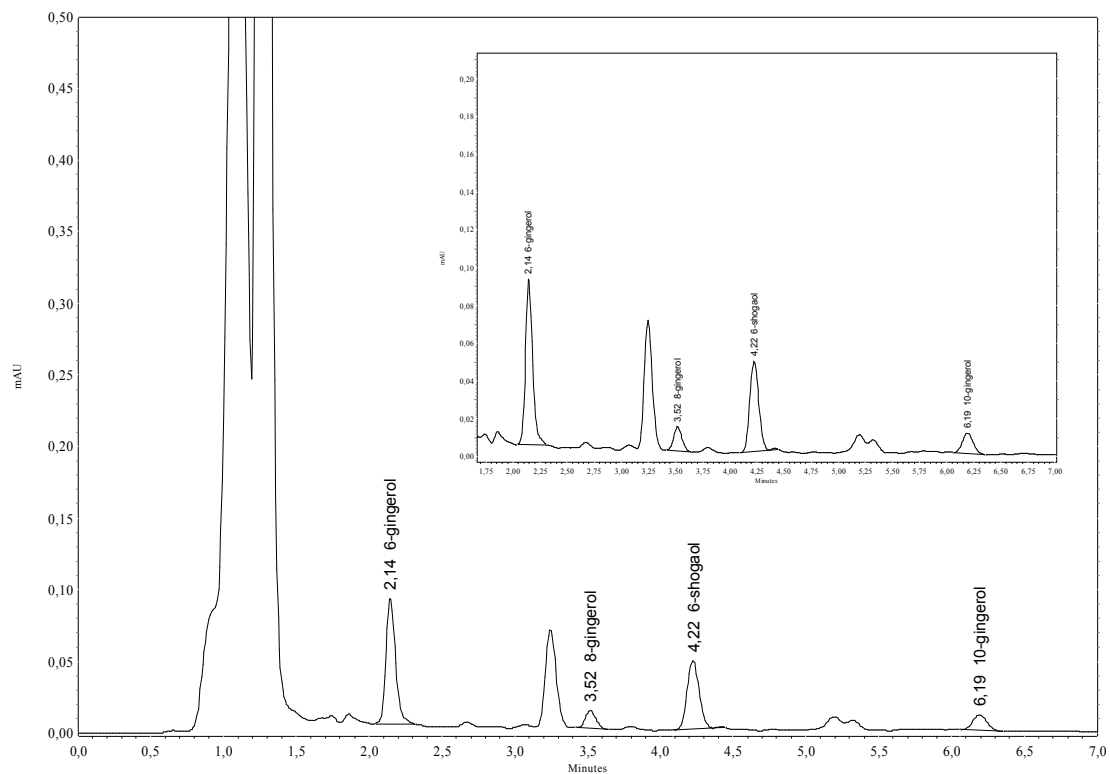
Ve všech zkoušených vzorcích byly nalezeny sledované látky. Nejvyšší odezvu měl vždy 6-gingerol. Obsahy jednotlivých látek jsou uvedeny v Tabulce 1, kapitola 6.5.

6.3 SLE

Pro podporovanou kapalinovou extrakci byly použity vzorky a roztoky, jejichž postupy příprav jsou uvedeny v kapitole 5.2.8. Jako rozpouštědlo byl použit ethylacetát. SLE byla vyzkoušena se standardy a jedním vzorkem – Sirup Kitl. Chromatogramy standardů a vzorku po provedení SLE jsou uvedeny na následujících obrázcích – Obrázek 18 – 19.



Obrázek 18: Chromatogram standardů – SLE



Obrázek 19: Chromatogram vzorku - Sirup Kitl - SLE

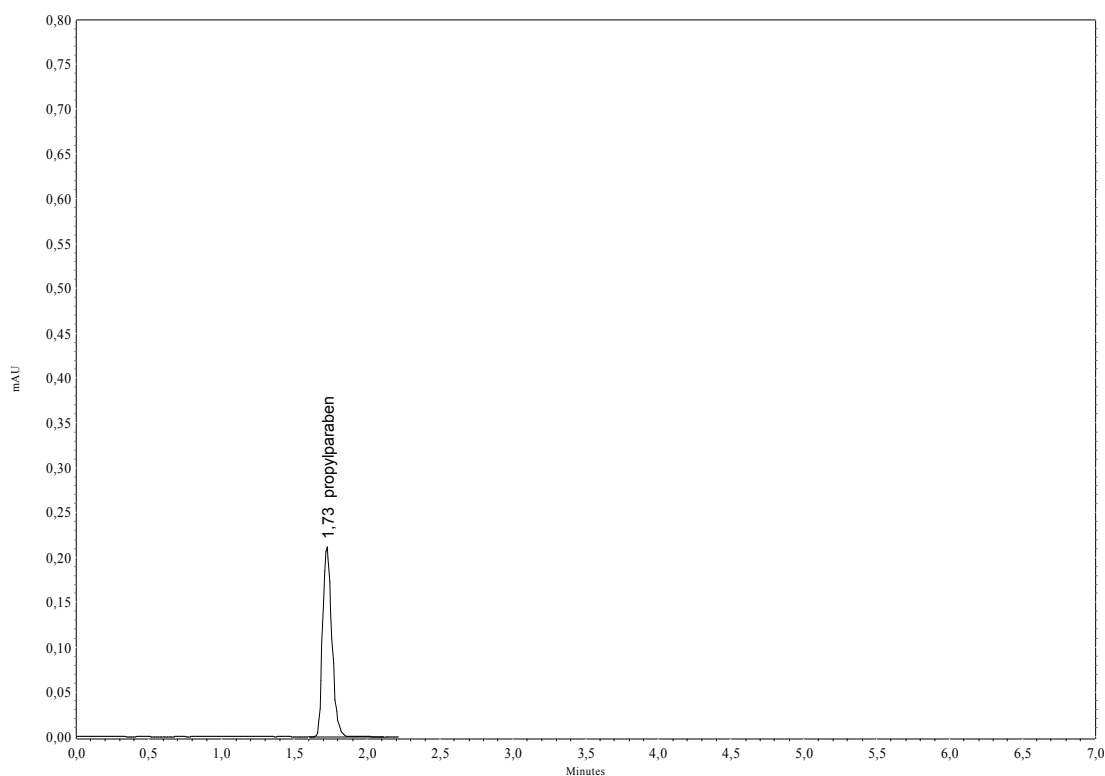
Metoda SLE byla vyzkoušena pouze pro porovnání, zda nebude lepší než metoda dSPE. Vzhledem k výraznému extrahování i ostatních složek matrice u metody SLE byla pro další práci vybrána metoda dSPE.

6.4 Ověření metody – vnitřní standard

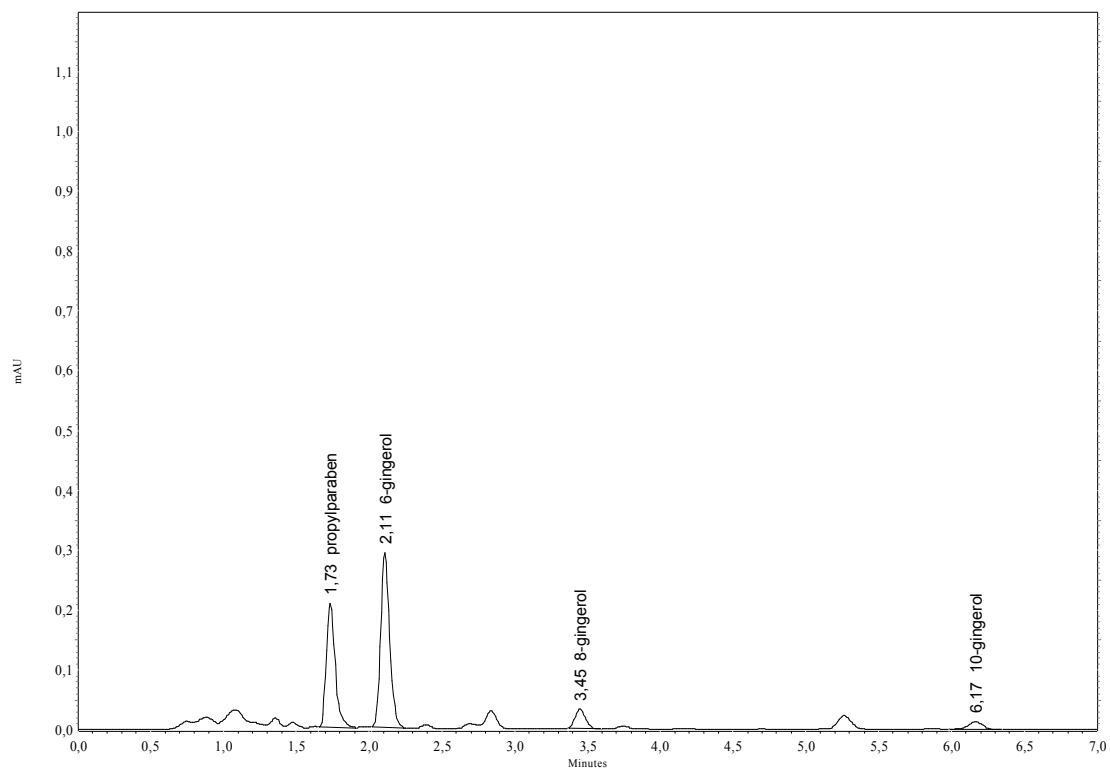
Pro ověření metody (zejména její přesnosti) byl připraven vzorek s přidavkem vnitřního standardu. Jako vnitřní standard byl použit propylparaben. Příprava vzorku z oddenků zázvoru pravého s přidavkem propylparabenu je uvedena v kapitole 5.2.6.3. Vzorek byl připraven šestkrát.

Tento krok byl zaveden proto, že v průběhu vývoje metody bylo vidět, že výsledky nevycházejí opakovatelné. Proto byl použit vnitřní standard, který byl přidán ke vzorku. Přesnost pro propylparaben vycházela do 5 %, na rozdíl od námi stanovovaných látek, kde značně kolísala. Tímto postupem byla ověřena přesnost celé metody přípravy vzorku. Nevyhovující hodnoty pro přesnost námi stanovovaných látek byly způsobeny nehomogenním vzorkem přírodního materiálu. V rámci validace metody byla přesnost dSPE ověřena pomocí jedné navážky vzorku, u které byla šestkrát provedena vlastní dSPE se sorbentem.

Na následujících obrázcích (Obrázek 20 – 21) je uveden chromatogram propylparabenu a chromatogram oddenků zázvoru pravého s přidavkem propylparabenu.



Obrázek 20: Chromatogram propylparabenu



Obrázek 21: Chromatogram oddenků zázvoru pravého s přidavkem propylparabenu

6.5 Stanovení obsahu určených látek ve vybraných vzorcích

Byl stanovován obsah 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu ve vybraných vzorcích. Postupy příprav jednotlivých vzorků jsou uvedeny v kapitolách 5.2.6.1 a 5.2.7. Následující tabulka (Tabulka 1) uvádí obsahy stanovovaných látek ve vybraných vzorcích.

Tabulka 1: Obsahy stanovovaných látek ve vybraných vzorcích

	6-G [mg/l]	8-G [mg/l]	6-SH [mg/l]	10-G [mg/l]
Tonic	2,57	0,32	0,27	0,19
Sirup Kitl (studená voda)	23,14	2,79	9,25	2,20
Sirup Kitl (horká voda)	20,03	2,25	6,71	1,37
Sirup s vitamínem C	10,54	0,46	2,36	0,20
	6-G [mg/sáček čaje]	8-G [mg/sáček čaje]	6-SH [mg/sáček čaje]	10-G [mg/sáček čaje]
Grüner Tee mit Ingwer und Orangen-Aroma	0,337	0,020	0,019	0,013
Ovocno-bylinný čaj aromatizovaný, s příchutí pomeranče a zázvoru	nelze vyhodnotit	0,014	0,020	0,005
Ovocno-bylinný čaj aromatizovaný, se zázvorem a citrónem	0,515	0,043	0,048	0,023
	6-G [mg/g]	8-G [mg/g]	6-SH [mg/g]	10-G [mg/g]
Sypaný čaj	0,295	0,022	0,053	0,009
Oddenky zázvoru pravého A	0,333	0,044	nebyl obsažen	0,013

Oddenky zázvoru pravého B	0,394	0,056	nebyl obsažen	0,016
Oddenky zázvoru pravého C	0,512	0,072	nebyl obsažen	0,022

Výsledky uvedené v Tabulce 1 jsou u každého vzorku průměrem ze tří měření. U vzorků z oddenků zázvoru pravého byly hodnoceny tři vzorky oddenků zakoupené v různých obchodech.

Z uvedených výsledků vyplývá, že námi stanovované látky byly nalezeny téměř ve všech vzorcích. V největším množství byl vždy nalezen 6-gingerol. Ze sirupů bylo největší množství látek obsaženo v sirupu Kitl (příprava se studenou vodou). Z čajů bylo nejvíce látek obsaženo v Ovočno-bylinném čaji aromatizovaném, se zázvorem a citrónem. Látka shogaol nebyla obsažena u vzorků oddenků zázvoru pravého, ale v čajích a sirupech ano. Mohlo by to souviset s postupem přípravy těchto produktů – dochází zde k dehydrataci gingerolů na příslušné shogaoly.

Podle kapitoly 5.2.6.4 byl připraven vzorek oddenků zázvoru pravého s 200 ml vody. Tato příprava odpovídala reálné přípravě zázvorového čaje. 6-gingerol byl opět nalezen v největším množství. Látka shogaol nebyla nalezena vůbec.

6.6 Výsledky validace

6.6.1 Test způsobilosti chromatografického systému

Pro test způsobilosti chromatografického systému byl použit roztok STANDARD, který byl připraven podle postupu uvedeného v kapitole 5.2.3. Tento roztok byl šestkrát nadávkován.

6.6.1.1 Zdánlivý počet teoretických pater N

Zdánlivý počet teoretických pater N byl vypočítán podle vzorce z ČL 2009 [24]:

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

t_R – retenční čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

w_h – šířka píku v polovině jeho výšky

Tabulka 2: Zdánlivý počet teoretických pater N 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu

Číslo měření	Zdánlivý počet teoretických pater N			
	6-G	8-G	6-SH	10-G
1	5116	9852	11486	15973
2	4297	9407	10789	15679
3	5182	9561	10975	15565
4	4930	9119	10812	15496
5	4915	11041	11453	15775
6	5101	9791	11392	16051
Průměr	4924	9796	11152	15757

6.6.1.2 Faktor symetrie A_S

Pro výpočet faktoru symetrie A_S byl použit vzorec z ČL 2009 [24]:

$$A_S = \frac{W_{0,05}}{2d}$$

$W_{0,05}$ – šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

Tabulka 3: Faktor symetrie A_S 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu

Číslo měření	Faktor symetrie A_S			
	6-G	8-G	6-SH	10-G
1	1,29	1,16	1,10	1,04
2	1,23	1,19	1,11	1,05
3	1,16	1,12	0,00	1,08
4	1,30	1,13	1,10	1,10
5	1,28	1,21	1,19	1,07
6	1,19	1,12	1,09	1,09
Průměr	1,24	1,16	0,93	1,07

Závěr:

Hodnoty faktorů symetrie jednotlivých standardů odpovídají požadavku $A_S = 0,8 - 1,5$ [24].

6.6.1.3 Rozlišení R_S

Rozlišení R_S mezi píky dvou složek bylo vypočítáno podle vzorce z ČL 2009 [24]:

$$R_S = 1,18 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{h1} + W_{h2}}, \text{ kde } t_{R2} > t_{R1}$$

t_{R1} a t_{R2} – retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků

W_{h1} a W_{h2} – šířky píků v poloviční výšce

Tabulka 4: Rozlišení R_s 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu

Číslo měření	Rozlišení R_s			
	6-G	8-G	6-SH	10-G
1	3,22	10,48	2,69	11,55
2	3,13	9,96	4,80	11,18
3	2,91	10,29	4,62	11,44
4	2,96	10,03	4,62	11,46
5	2,91	10,64	4,59	11,55
6	2,95	10,63	4,68	11,56
Průměr	3,01	10,34	4,33	11,46

Závěr:

Hodnoty rozlišení jednotlivých standardů odpovídají požadavku $R_s > 1,5$ [24].

6.6.1.4 **Opakovatelnost analýzy $RSD_{\%}$**

Opakovatelnost analýzy $RSD_{\%}$ byla vypočítána podle vzorce z ČL 2009 [24]:

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}}$$

y_i – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu

\bar{y} – průměr jednotlivých hodnot

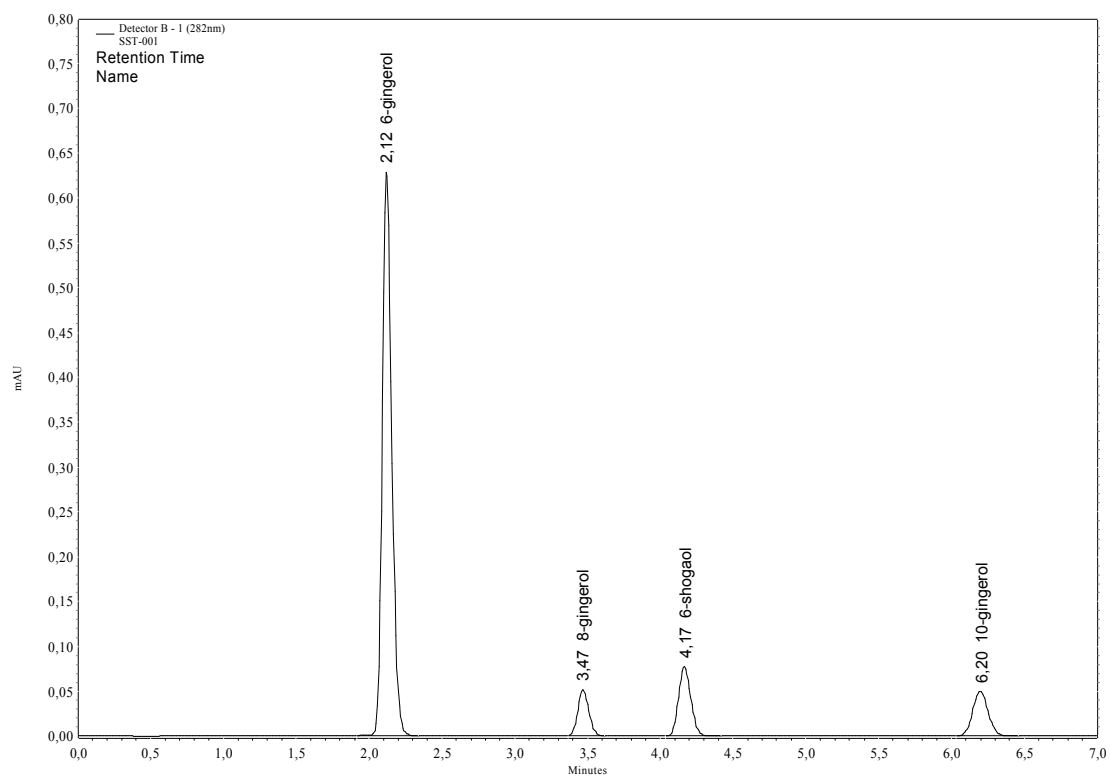
n – počet jednotlivých hodnot

Tabulka 5: Opakovatelnost analýzy RSD (%) 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu

Číslo měření	Opakovatelnost analýz							
	6-G		8-G		6-SH		10-G	
	A	t _R	A	t _R	A	t _R	A	t _R
1	2869300	2,12	268791	3,47	461542	4,17	364653	6,20
2	2834756	2,13	269293	3,48	452949	4,22	361953	6,23
3	2827124	2,13	267367	3,46	461303	4,15	365423	6,22
4	2816191	2,14	268833	3,48	453185	4,19	362262	6,27
5	2833000	2,16	270718	3,52	453945	4,19	366200	6,24
6	2814472	2,13	270170	3,51	453244	4,21	361371	6,26
Průměr	2832474	2,14	269195	3,49	456028	4,19	363644	6,24
SD	19897,08	0,01	1176,06	0,02	4192,43	0,03	2032,34	0,03
RSD (%)	0,70	0,65	0,44	0,67	0,92	0,61	0,56	0,41

Závěr:

Hodnoty opakovatelnosti analýzy pro jednotlivé standardy vyhovují požadavku **RSD < 1 %**.



**Obrázek 22: Test vhodnosti chromatografického systému;
naměřeno za optimálních chromatografických podmínek - viz kapitola 5.3**

6.6.2 Validace metody

6.6.2.1 *Linearita*

Pro stanovení kalibrační přímky bylo připraveno šest roztoků standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu pro stanovení linearitu, jejichž postup přípravy je uveden v kapitole 5.2.9.

Ze dvou analýz roztoků byly zjištěny plochy standardů a následně byl vypočítán jejich průměr. Pomocí metody lineární regrese byla stanovena závislost průměrných ploch jednotlivých standardů na jejich koncentraci.

6.6.2.1.1 *6-gingerol*

Tabulka 6: Stanovení linearitu 6-gingerolu

Koncentrace roztoku (µg/ml)	Průměr ploch
41,6	288625
83,2	564955
208,0	1388657
291,2	1933388
416,0	2812158
832,0	5556010

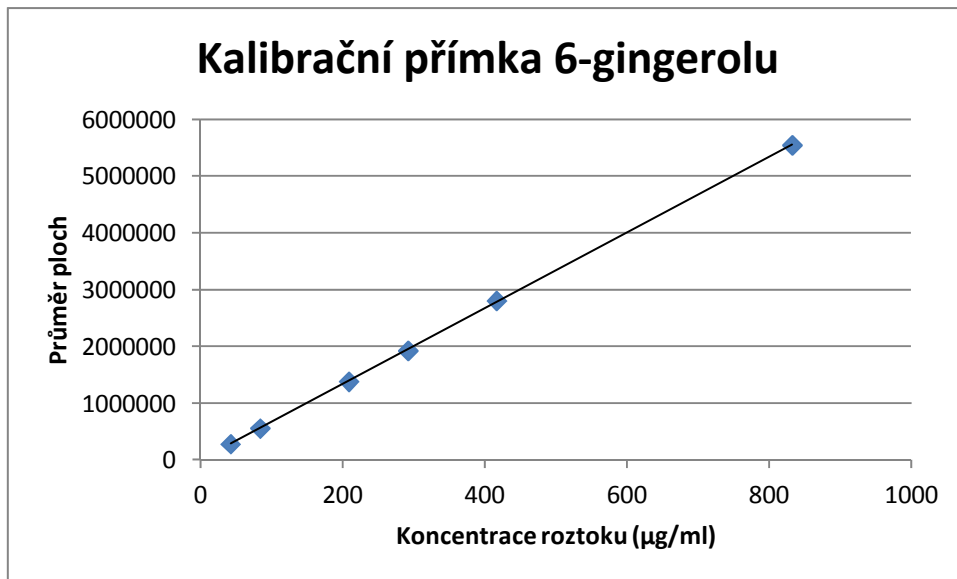
Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů: $n = 6$

Parametry regresní přímky:

$$y = 6674,9x + 8058,6$$

Korelační koeficient: $R = 0,9999$



Obrázek 23: Závislost průměru ploch na koncentraci roztoku 6-gingerolu

6.6.2.1.2 8-gingerol

Tabulka 7: Stanovení linearity 8-gingerolu

Koncentrace roztoku (µg/ml)	Průměr ploch
4,14	32033
8,27	53289
20,68	132259
28,96	184753
41,37	269693
82,74	548185

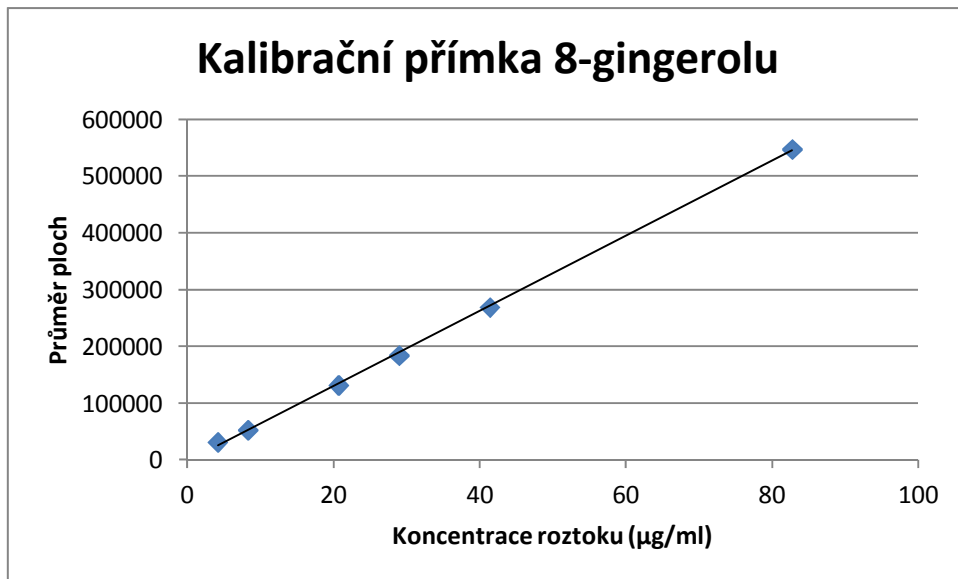
Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů: $n = 6$

Parametry regresní přímky:

$$y = 6608,2x - 1660,8$$

Korelační koeficient: $R = 0,9995$



Obrázek 24: Závislost průměru ploch na koncentraci roztoku 8-gingerolu

6.6.2.1.3 6-shogaol

Tabulka 8: Stanovení linearity 6-shogaolu

Koncentrace roztoku (µg/ml)	Průměr ploch
6,88	59436
13,76	90924
34,39	223206
48,15	309787
68,78	450369
137,56	898278

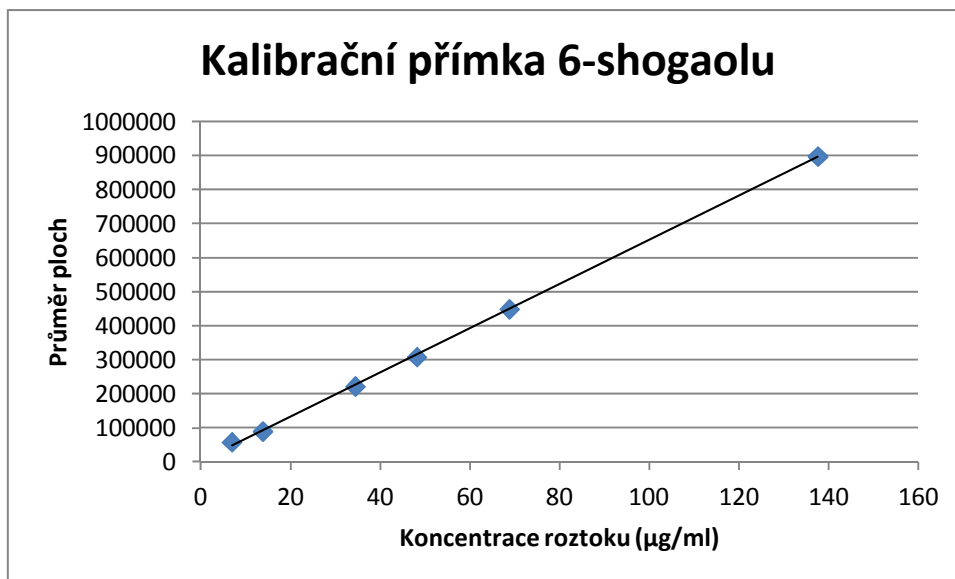
Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů: $n = 6$

Parametry regresní přímky:

$$y = 6475,1x + 4640$$

Korelační koeficient: $R = 0,9996$



Obrázek 25: Závislost průměru ploch na koncentraci roztoku 6-shogaolu

6.6.2.1.4 10-gingerol

Tabulka 9: Stanovení linearitu 10-gingerolu

Koncentrace roztoku (µg/ml)	Průměr ploch
4,15	37037
8,31	70800
20,77	179455
29,08	250227
41,54	365440
83,08	726750

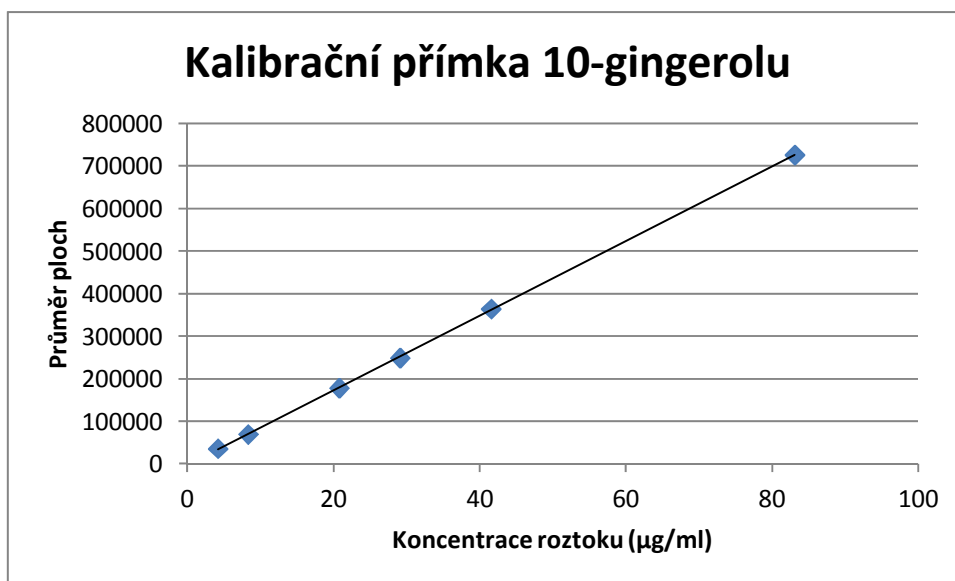
Regresní funkce: $y = kx + q$

Počet bodů: $n = 6$

Parametry regresní přímky:

$$y = 8766x - 1486,1$$

Korelační koeficient: $R = 0,9999$



Obrázek 26: Závislost průměru ploch na koncentraci roztoku 10-gingerolu

6.6.2.2 *Stabilita*

Stabilita byla stanovována pomocí roztoku STANDARD, jehož příprava byla popsána v kapitole 5.2.3. Roztok byl uchováván za laboratorní teploty a na světle a byl změřen v časech 0, 24, 48 a 72 hodin.

Stabilita byla vypočítána podle následujícího vzorce:

$$S_T(\%) = \frac{100 \cdot |(A - A_T)|}{A}$$

A_T – průměr tří měření ploch píků u roztoku skladovaného

A – průměr tří měření ploch píků u roztoku čerstvě připraveného

6.6.2.2.1 6-gingerol

6.6.2.2.1.1 Stabilita za laboratorní teploty a na světle

Tabulka 10: Stabilita 6-gingerolu za laboratorní teploty a na světle

Čas (hod)	Plocha	S _T (%)
0	2755015	0,00
24	2838355	3,03
48	2940638	6,74
72	3080746	11,82

6.6.2.2.2 8-gingerol

6.6.2.2.2.1 Stabilita za laboratorní teploty a na světle

Tabulka 11: Stabilita 8-gingerolu za laboratorní teploty a na světle

Čas (hod)	Plocha	S _T (%)
0	263236	0,00
24	273936	4,06
48	282714	7,40
72	286895	8,99

6.6.2.2.3 6-shogaol

6.6.2.2.3.1 Stabilita za laboratorní teploty a na světle

Tabulka 12: Stabilita 6-shogaolu za laboratorní teploty a na světle

Čas (hod)	Plocha	S _T (%)
0	439197	0,00
24	451224	2,74
48	462309	5,26
72	474869	8,12

6.6.2.2.4 10-gingerol

6.6.2.2.4.1 Stabilita za laboratorní teploty a na světle

Tabulka 13: Stabilita 10-gingerolu za laboratorní teploty a na světle

Čas (hod)	Plocha	S _T (%)
0	355781	0,00
24	370198	4,05
48	383576	7,81
72	394033	10,75

Závěr:

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že roztoky standardů je potřeba připravovat každý den čerstvé.

6.6.2.3 **Správnost**

Byla použita metoda standardního přidavku. Pro měření správnosti bylo připraveno šest vzorků. Zázvorové oddenky byly oloupany a rozmělněny v třecí misce. Bylo naváženo 6,0 g oddenků, odměrným válcem bylo přidáno 240,00 ml vody a vše bylo přivedeno k varu. Vzorek byl umístěn na 15 minut do ultrazvukové lázně a po vychladnutí filtrován přes filtrační papír (MN 640d). Po filtraci bylo odebráno 6 x 20,00 ml. Ke třem vzorkům bylo přidáno 100 µl roztoku pro měření správnosti, jehož postup přípravy byl uveden v kapitole 5.2.4. Do šesti mikrozkušavek bylo naváženo přibližně 25 mg sorbentu Oasis HLB a byl k němu přidán 1,00 ml methanolu. Obsah každé mikrozkušavky byl protřepán a přidán do všech šesti centrifugačních zkumavek. Zkumavky byla následně umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně s ledem, protřepány a filtrovány přes Oasis® HLB Cartridge. Následně proběhla eluce 1,00 ml methanolu.

Vzhledem k nehomogenosti vzorků nebyla testována správnost celého postupu ale pouze vlastní disperzní SPE.

Tabulka 14: Správnost

	6-gingerol	8-gingerol	6-shogaol	10-gingerol
Množství nalezené v 1,0 g vzorku oddenků zázvoru pravého (µg/ml)	275,50	36,32	0,00	9,91
Množství přidané ke vzorku (µg)	83,8	8,28	13,75	8,28
Množství zjištěné ve vzorku po přidavku standardu (µg)	357,13	44,23	13,57	18,14
Průměr (%)	101,37	104,80	98,86	97,08
SD	3,00	4,71	1,68	5,61
RSD (%)	2,96	4,49	1,70	5,78

Výtěžnost R_i se vypočítala podle vzorce:

$$R_i (\%) = 100 \cdot \frac{x_i - x_v}{x_0}$$

x_i – množství 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu zjištěných ve vzorcích po přidavcích standardů 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu

x_0 – množství 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu přidávaných ke vzorkům (µg)

x_v – množství 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu ve vzorcích zjištěných při analýzách bez přidavků standardů

Závěr:

Správnost byla pro všechny látky v rozmezí **95 % – 105 %**. Relativní směrodatná odchylka pro 6-gingerol byla 2,96 %, pro 8-gingerol 4,49 %, pro 6-shogaol 1,70 % a pro 10-gingerol 5,78 %.

6.6.2.4 Přesnost

Přesnost byla stanovována pomocí šestkrát připraveného vzorku z oddenků zázvoru pravého s vodou a sorbenty, jehož postup je uveden v kapitole 5.2.6.1. Do kádinky se vzorkem byl přidán roztok standardu 6-shogaolu (13,75 µg). Jako sorbent byl použit sorbent Oasis HLB.

Jednotlivé navážky a naměřené hodnoty jsou uvedeny v následujících tabulkách – Tabulka 15 a 16.

Tabulka 15: Navážky vzorků oddenků zázvoru pravého

Číslo vzorku	1	2	3	4	5	6
Navážka oddenků zázvoru pravého (g)	1,2000	1,2974	0,9768	1,0698	1,1564	1,0598

Tabulka 16: Přesnost pro vzorek oddenků zázvoru pravého

Číslo měření	Přesnost			
	Plocha standardu (po přepočtení z navážky na 1,0 g)			
	6-G	8-G	6-SH	10-G
1	2034434	244501	55439	92862
2	2164770	273624	56534	109296
3	1890010	239549	54654	93307
4	2333703	294950	57346	109699
5	2035760	256532	53825	99649
6	2341342	271427	58324	118388
Průměr	2133337	263431	56020	103867
SD	180505,60	20676,43	1694,25	10244,42
RSD (%)	8,46	7,85	3,02	9,86

Závěr:

Přesnost byla v rozmezí **3,02 – 9,86 %**.

6.6.2.5 *Detekční a kvantitativní limit*

LOD (trojnásobek šumu základní linie) a LOQ (desetinásobek šumu základní linie) byly hodnoceny již v diplomové práci Martiny Urbanové z roku 2015 [1]. Tabulka 17 je převzata z diplomové práce Martiny Urbanové z roku 2015 [1].

Tabulka 17: Detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ)

	6-G	8-G	6-SH	10-G
LOD ($\mu\text{g}/10\text{ ml}$)	12,18	13,49	19,43	8,17
LOQ ($\mu\text{g}/10\text{ ml}$)	40,20	44,50	64,13	26,97

7. ZÁVĚR

Cílem rigorózní práce bylo vyvinout metodu přípravy vzorku pro stanovení vybraných obsahových látek zázvorovníku lékařského. Vycházelo se z diplomové práce Martiny Urbanové z roku 2015 [1], ve které byly testovány jednoduché extrakční postupy, kdy ale nebylo dosaženo potřebné citlivosti metody, která by umožnila stanovení zvolených analytů s dostatečnou přesností a správností. Proto byla kvůli vyššímu zakoncentrování vyzkoušena metoda disperzní SPE.

Během optimalizace metody bylo vyzkoušeno několik sorbentů. Jako nejvhodnější sorbent se díky nejvyšším odezvám jevil sorbent Oasis HLB.

Jako promývací směsi byly vyzkoušeny: 0,1% kyselina octová s methanolem a 10mM octan amonný s methanolem. Dále byla vyzkoušena i samotná 0,1% kyselina octová. Nebyl nalezen vhodný promývací krok, aby došlo ke snížení odezvy matrice na začátku chromatogramu.

Bylo vybráno několik vzorků obsahujících výtažky zázvorovníku lékařského. Ve všech zkoušených vzorcích byly téměř vždy nalezeny sledované látky. Nejvyšší odezvu měl 6-gingerol.

Během vývoje metody výsledky sice nevycházely opakovatelné, ale pomocí vnitřního standardu (propylparabenu) byla ověřena přesnost celé metody přípravy vzorku. Nevyhovující hodnoty pro přesnost pro námi stanovované látky byly způsobeny nehomogenním vzorkem přírodního materiálu. Jako kritický se ukázal krok filtrace, kde díky struktuře zázvoru často docházelo k ucpávání filtračních materiálů.

Námi stanovované látky byly nalezeny téměř ve všech vzorcích. Ze sirupů bylo největší množství látek obsaženo v sirupu Kitl (příprava se studenou vodou). Z čajů bylo nejvíce látek obsaženo v Ovočno-bylinném čaji aromatizovaném, se zázvorem a citrónem. Látka shogaol nebyla obsažena u vzorků oddenků zázvoru pravého, ale v čajích a sirupech ano. Mohlo by to souviset s postupem přípravy těchto produktů – dochází zde k dehydrataci gingerolů na příslušné shogaoly.

Na vzorcích oddenků zázvoru pravého byla metoda dSPE částečně validována. Byla hodnocena linearita, stabilita, správnost, přesnost a detekční a kvantitativní limit. Byl ověřován test způsobilosti chromatografického systému.

Výhodou metody je její rychlost a jednoduchost. Další velkou výhodou je možnost velkého zakoncentrování vzorku, nízká spotřeba organického rozpouštědla a možnost opakovaného použití sorbentu po jeho přechištění.

8. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Obsahy stanovovaných látek ve vybraných vzorcích	48
Tabulka 2: Zdánlivý počet teoretických pater N 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu	50
Tabulka 3: Faktor symetrie A_s 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu	51
Tabulka 4: Rozlišení R_s 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu	52
Tabulka 5: Opakovatelnost analýzy RSD (%) 6-gingerolu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu	53
Tabulka 6: Stanovení linearity 6-gingerolu	55
Tabulka 7: Stanovení linearity 8-gingerolu	56
Tabulka 8: Stanovení linearity 6-shogaolu	57
Tabulka 9: Stanovení linearity 10-gingerolu	58
Tabulka 10: Stabilita 6-gingerolu za laboratorní teploty a na světle	60
Tabulka 11: Stabilita 8-gingerolu za laboratorní teploty a na světle	60
Tabulka 12: Stabilita 6-shogaolu za laboratorní teploty a na světle	60
Tabulka 13: Stabilita 10-gingerolu za laboratorní teploty a na světle	61
Tabulka 14: Správnost	62
Tabulka 15: Navážky vzorků oddenků zázvoru pravého	63
Tabulka 16: Přesnost pro vzorek oddenků zázvoru pravého	63
Tabulka 17: Detekční limit (LOD) a kvantitativní limit (LOQ)	64

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Provedení SPE [11].....	16
Obrázek 2: Metoda dSPE zázvorových oddenků	18
Obrázek 3: Chromatogram standardů; sorbent: Oasis HLB	33
Obrázek 4: Chromatogram standardů; sorbent: Supel Select HLB SPE	33
Obrázek 5: Chromatogram standardů; sorbent: Supel QuE Z-Sep C18	34
Obrázek 6: Chromatogram standardů; sorbent: PSA.....	34
Obrázek 7: Chromatogram oddenků zázvoru pravého; sorbent: Oasis HLB.....	36
Obrázek 8: Chromatogram oddenků zázvoru pravého; sorbent: Supel Select HLB SPE.	37
Obrázek 9: Chromatogram oddenků zázvoru pravého; sorbent: Supel QuE Z-Sep C18.	37
Obrázek 10: Chromatogram vzorku - Tonic.....	39
Obrázek 11: Chromatogram vzorku - Sirup Kitl (studená voda).....	40
Obrázek 12: Chromatogram vzorku - Sirup Kitl (horká voda).....	40
Obrázek 13: Chromatogram vzorku - Sirup s vitamínem C	41
Obrázek 14: Chromatogram vzorku - Grüner Tee mit Ingwer und Orangen-Aroma	41
Obrázek 15: Chromatogram vzorku - Ovocno-bylinný čaj aromatizovaný, s příchutí pomeranče a zázvoru	42
Obrázek 16: Chromatogram vzorku - Ovocno-bylinný čaj aromatizovaný, se zázvorem a citrónem.....	42
Obrázek 17: Chromatogram vzorku - Sypaný čaj.....	43
Obrázek 18: Chromatogram standardů – SLE.....	44
Obrázek 19: Chromatogram vzorku - Sirup Kitl - SLE	45
Obrázek 20: Chromatogram propylparabenu	46
Obrázek 21: Chromatogram oddenků zázvoru pravého s přísadkou propylparabenu .	47
Obrázek 22: Test vhodnosti chromatografického systému; naměřeno za optimálních chromatografických podmínek - viz kapitola 5.3.....	54
Obrázek 23: Závislost průměru ploch na koncentraci roztoku 6-gingerolu	56
Obrázek 24: Závislost průměru ploch na koncentraci roztoku 8-gingerolu	57
Obrázek 25: Závislost průměru ploch na koncentraci roztoku 6-shogaolu.....	58
Obrázek 26: Závislost průměru ploch na koncentraci roztoku 10-gingerolu	59

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] URBANOVÁ, Martina. *Vývoj HPLC metody pro stanovení 6-gingerolu, kapsaicinu, 8-gingerolu, 6-shogaolu a 10-gingerolu ve vzorcích zázvorovníku lékařského*. Hradec Králové, 2015. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce PharmDr. Lucie Havlíková, Ph.D.
- [2] TŮMOVÁ, Lenka. Zázvor - využití v terapii a jeho možné interakce s ostatními léčivými. *Praktické lékárenství*. 2009, 5(6), 296-297. ISSN 1801-2434; 1803-5329 (on-line).
- [3] http://hobby.idnes.cz/zazvor-prohreje-ochrani-pred-bacily-a-ohlida-i-figuru-p0z-/hobby-zahrada.aspx?c=A081125_133046_hobby-bylinky_bma (navštíveno únor 2016)
- [4] <http://bylinky.zdrave.cz/zazvor-na-virozu-a-nachlazení/> (navštíveno únor 2016)
- [5] <http://www.bylinkyprovsechny.cz/byliny-kere-stromy/byliny/236-zazvor-ucinky-na-zdravi-co-leci-pouziti-uzivani-vyuziti> (navštíveno únor 2016)
- [6] <http://www.zazvor.cz/> (navštíveno únor 2016)
- [7] <http://www.kitl.cz/cz/nase-vyrobky/kitl-syrob-domaci-limonada/kitl-syrob-zazvorovy/> (navštíveno únor 2016)
- [8] NOGUEIRA, José Manuel Florêncio. Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, 71, 214-223. DOI: 10.1016/j.trac.2015.05.002. ISSN 01659936. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016599361500165X>
- [9] NOVÁKOVÁ, Lucie. Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis. *Journal of Chromatography A*. 2013, 1292, 25-37. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.08.087. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967312013386>
- [10] NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 235 s. ISBN 978-80-260-4244-0.

- [11] <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/pub-files/realizovane-klicove-aktivty/ls-2013-2014/h3cp2/index/h3cp2-studijni-material---stanoveni-hydrofilnich-latek-ls-13-14.pdf> (navštívěno únor 2016)
- [12] ARIAS, Jean Lucas de Oliveira, Caroline ROMBALDI, Sergiane Souza CALDAS a Ednei Gilberto PRIMEL. Alternative sorbents for the dispersive solid-phase extraction step in quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction of pesticides from rice paddy soils with determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2014, 1360, 66-75. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.07.082. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196731401187X>
- [13] RIBEIRO, Cláudia, Ana Rita RIBEIRO, Alexandra S. MAIA, Virgínia M. F. GONÇALVES a Maria Elizabeth TIRITAN. New Trends in Sample Preparation Techniques for Environmental Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2014, 44(2), 142-185. DOI: 10.1080/10408347.2013.833850. ISSN 1040-8347. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408347.2013.833850>
- [14] VAN DER LEE, Martijn K., Guido VAN DER WEG, Wim A. TRAAG a Hans G.J. MOL. Qualitative screening and quantitative determination of pesticides and contaminants in animal feed using comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1186(1-2), 325-339. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.11.043. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967307019140>
- [15] LEANDRO, Cristiana C., Richard J. FUSSELL a Brendan J. KEELY. Determination of priority pesticides in baby foods by gas chromatography tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1085(2), 207-212. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.06.054. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305011672>
- [16] PAYÁ, Paula, Michelangelo ANASTASSIADES, Dorothea MACK, Irina SIGALOVA, Bünyamin TASDELEN, José OLIVA a Alberto BARBA. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass

spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, 389(6), 1697-1714. DOI: 10.1007/s00216-007-1610-7. ISSN 1618-2642.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-007-1610-7>

[17] GARG, Prabhat, Deepak PARDASANI, Avik MAZUMDER, Ajay PUROHIT a D. K. DUBEY. Dispersive solid-phase extraction for in-sorbent Fourier-transform infrared detection and identification of nerve agent simulants in analysis for verification of chemical weapon convention. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, 399(2), 955-963. DOI: 10.1007/s00216-010-4337-9. ISSN 1618-2642.

Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-010-4337-9>

[18] PINTO, Carmelo García, María Esther Fernández LAESPADA, Sara Herrero MARTÍN, Ana María Casas FERREIRA, José Luis Pérez PAVÓN a Bernardo Moreno CORDERO. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. *Talanta*. 2010, 81(1-2), 385-391. DOI: 10.1016/j.talanta.2009.12.013. ISSN 00399140.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003991400900962X>

[19] http://www.phenomenex.com/info/page/2015novumdino?utm_campaign=2015%20novum%20launch&utm_source=us_novum_brochure&utm_medium=redirect&utm_content=dinosaur (navštíveno únor 2016)

[20] MEUNIER, Cécile, Dominique BLONDELLE, Patrice FAURE, Jean-Philippe BAGUET, Caroline LE GOFF, Olivier CHABRE a Véronique DUCROS. Development and validation of a method using supported liquid extraction for aldosterone determination in human plasma by LC-MS/MS. *Clinica Chimica Acta*. 2015, 447, 8-15. DOI: 10.1016/j.cca.2015.05.007. ISSN 00098981.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898115002478>

[21] KAUFMANN, A., P. BUTCHER, K. MADEN, S. WALKER a M. WIDMER. Multi-residue quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and cleanup technique: Salting out supported liquid extraction (SOSLE). *Analytica Chimica Acta*. 2014, 820, 56-68. DOI: 10.1016/j.aca.2014.02.038. ISSN 00032670.

Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267014002517>

[22] http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/my_oas98.pdf (navštíveno únor 2016)

[23] <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html> (navštíveno únor 2016)

[24] *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.