

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra analytické chemie**

**Analýza citrusových flavonoidů ve  
farmaceutických přípravcích a potravních  
doplňcích metodou kapilární zónové  
elektroforézy**

Diplomová práce

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

Děkuji především své školitelce doc. RNDr. Marii Pospíšilové, CSc. za ochotu, trpělivost, odbornou pomoc a cenné rady během vypracování této práce. Dále děkuji Mgr. Jitce Široké a dalším příslušníkům katedry za ochotu, vstřícné jednání a další odborné připomínky.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Všechna literatura a další zdroje, ze kterých jsem čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, 7. 5. 2011

Podpis:

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Andrea Martincová

Školitel: doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.

Název diplomové práce: Analýza citrusových flavonoidů ve farmaceutických přípravcích a potravních doplňcích metodou kapilární zónové elektroforézy.

V této práci byla vyvinuta metoda kapilární zónové elektroforézy s UV detekcí pro stanovení a separaci kyseliny askorbové a čtyřech flavonoidů hesperidinu, diosminu, rutinu a troxerutinu. Analýza byla prováděna v křemenné kapiláře (vnitřní průměr 50  $\mu\text{m}$ , celková délka 31,2 cm a efektivní délce 21 cm) s UV detekcí při 280 nm. Vzorky byly dávkovány hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6 s. Optimální složení pracovního elektrolytu bylo 40 mM borátový pufr s 25% (v/v) MeOH, pH\* 9,5. Separace probíhala při vloženém napětí 25 kV a teplotě 25 °C. Jako vnitřní standard byla zvolena kyselina skořicová. Kalibrační závislost byla lineární v rozmezí od 0,05 mg/ml do 0,50 mg/ml pro hesperidin ( $r = 0,9996$ ), diosmin ( $r = 0,9998$ ), rutin ( $r = 0,9995$ ), troxerutin ( $r = 0,9997$ ) a od 0,10 mg/ml do 1,00 mg/ml pro kyselinu askorbovou ( $r = 0,9994$ ). Tato validovaná metoda byla úspěšně použita pro analýzy farmaceutických přípravků a potravních doplňků HemoStop ProBio ( $s_R = 1,01 - 3,12\%$ ), tobolky; Ascorutin, tablety ( $s_R = 0,57 - 2,36\%$ ); Cilkanol, tobolky ( $s_R = 2,74\%$ ); Detralex, tablety ( $s_R = 0,81 - 2,80\%$ ) a Hemodin Prebio Forte, tablety ( $s_R = 1,13 - 4,44\%$ ). Analýza u polykomponentních přípravků trvala okolo 11 min, u monokomponentních nepřesáhla 3 min.

Klíčová slova: kapilární zónová elektroforéza, flavonoidy, hesperidin, diosmin, rutin, troxerutin, kyselina askorbová.

## ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Andrea Martincová

Supervisor: doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.

Title of Diploma Thesis: Analysis of citrus flavonoids in pharmaceuticals and food supplements by capillary zone electrophoresis.

A method based on capillary zone electrophoresis (CZE) with UV detection for the separation and determination of ascorbic acid and four flavonoids hesperidin, diosmin, rutin and troxerutin was developed. The analysis was carried out in a fused-silica capillary (50  $\mu\text{m}$  i. d., total length 31,2 cm, and length to the detector 21 cm) with UV detection at 280 nm. The samples were injected hydrodynamically at 50 mbar for 6 s. Optimal background electrolyte was 40 mM borate buffer with 25% (v/v) of methanol, pH\* 9,5. The separation voltage was 25 kV and temperature 25 °C. Cinnamic acid was chosen as the internal standard. The calibration dependences were linear in the range from 0,05 mg/ml to 0,50 mg/ml for hesperidin ( $r = 0,9996$ ), diosmin ( $r = 0,9998$ ), rutin ( $r = 0,9995$ ), troxerutin ( $r = 0,9997$ ) and from 0,10 mg/ml to 1,00 mg/ml for ascorbic acid ( $r = 0,9994$ ). This validated method has been successfully applied for the analysis of commercially available pharmaceuticals and food supplements HemoStop ProBio capsules ( $s_R = 1,01 - 3,12\%$ ); Ascorutin capsules ( $s_R = 0,57 - 2,36\%$ ), Cilkanol capsules ( $s_R = 2,74\%$ ), Detralex capsules ( $s_R = 0,81 - 2,80\%$ ) and Hemodin Prebio Forte capsules ( $s_R = 1,13 - 4,44\%$ ). The single analysis took about 11 min (polycomponent preparations) or below 3 min (monocomponent formulations).

Keywords: capillary zone electrophoresis (CZE), flavonoids, hesperidin, diosmin, rutin, troxerutin, ascorbic acid.

# Obsah

1	Seznam zkratek .....	9
2	Úvod .....	11
3	Cíl a popis zadání práce .....	12
4	Teoretická část .....	13
4.1	Elektromigrační metody .....	13
4.1.1	Princip elektroforézy .....	13
4.1.2	Uspořádání elektroforetické aparatury .....	15
4.2	Kapilární zónová elektroforéza .....	16
4.2.1	Instrumentace .....	17
4.2.2	Dávkování vzorku .....	17
4.2.3	Detekce .....	17
4.3	Antioxidační látky .....	18
4.3.1	Flavonoidy .....	18
4.3.2	Hesperidin .....	19
4.3.3	Diosmin .....	20
4.3.4	Rutin .....	21
4.3.5	Troxeutin .....	22
4.3.6	Kyselina askorbová .....	24
5	Experimentální část .....	26
5.1	Seznam chemikálií .....	26
5.2	Příprava roztoků .....	28
5.2.1	Příprava pracovních elektrolytů .....	28
5.2.2	Roztoky standardů pro optimalizaci metody .....	28
5.2.3	Hledání vnitřního standardu .....	28
5.2.4	Zásobní roztoky .....	28
5.2.5	Kalibrační roztoky .....	29

5.2.6	Příprava vzorku z tablety .....	31
5.2.7	Příprava vzorku pro ověření správnosti metody .....	33
5.3	Přístroje .....	35
5.3.1	Kapilární elektroforetický systém Beckman Coulter .....	35
5.4	Pracovní postup.....	35
5.5	Výpočty.....	36
5.5.1	Kalibrační závislost.....	36
5.5.2	Limit detekce a kvantifikace .....	36
5.5.3	Opakovatelnost metody .....	36
5.5.4	Rozlišení .....	37
5.5.5	Faktor asymetrie píku .....	37
5.5.6	Účinnost separace.....	38
5.5.7	Správnost metody.....	38
6	Výsledky a diskuze .....	39
6.1	Optimalizace separačních podmínek.....	39
6.1.1	Volba vhodné vlnové délky pro detekci.....	39
6.1.2	Volba základního elektrolytu .....	39
6.1.3	Optimalizace hodnoty pH* .....	39
6.1.4	Vliv koncentrace pufru.....	41
6.1.5	Vliv organického rozpouštědla .....	43
6.1.6	Ovlivnění separace přidavkem cyklodextrinů do BGE .....	44
6.1.7	Vliv SDS .....	45
6.1.8	Optimalizace separačního napětí .....	45
6.1.9	Vliv teploty .....	46
6.1.10	Vliv doby a tlaku při nástřiku vzorku.....	46
6.1.11	Volba vnitřního standardu .....	47
6.1.12	Optimální podmínky separace a složení pracovního elektrolytu .....	47

6.2	Způsobilost systému.....	49
6.2.1	Rozlišení .....	49
6.2.2	Faktor asymetrie .....	50
6.2.3	Účinnost separace.....	50
6.3	Kvantitativní analýza .....	51
6.3.1	Kalibrační závislost pro troxerutin .....	52
6.3.2	Kalibrační závislost pro hesperidin .....	53
6.3.3	Kalibrační závislost pro diosmin.....	54
6.3.4	Kalibrační závislost pro rutin.....	55
6.3.5	Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou .....	56
6.3.6	Limity detekce a kvantifikace.....	57
6.3.7	Opakovatelnost metody .....	58
6.4	Stanovení účinných látek ve farmaceutických přípravcích .....	59
6.4.1	Správnost metody .....	61
6.4.2	HemoStop ProBio.....	61
6.4.3	Ascorutin .....	64
6.4.4	Cilkanol.....	66
6.4.5	Detralex.....	67
6.4.6	Hemodin Prebio Forte .....	70
7	Závěry.....	74
8	Seznam obrázků a tabulek .....	77
9	Použitá literatura .....	79



## 1 Seznam zkratek

AA	kyselina askorbová
A <sub>s</sub>	faktor asymetrie píku
BGE	základní elektrolyt (background elektrolyte)
CE	kapilární elektroforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ČL	Český lékopis
DAD	diode array detektor
DI	diosmin
DMSO	dimethylsulfoxid
ED	elektrochemická detekce
EOT	elektroosmotický tok
ESI	elektrosprej
EtOH	ethanol
HE	hesperidin
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra
HPCE	vysokoúčinná kapilární elektroforéza
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
i. d.	vnitřní průměr
IS	vnitřní standard (kyselina skořicová)
k	směrnice přímky
LDL	low density lipoprotein
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	methanol
MLCEC	monolitická kapilární elektrochromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
MS - MS	tandemová hmotnostní spektrometrie

N	počet teoretických pater
r	korelační koeficient
R	recovery (návratnost)
RP	reverzní fáze
$R_S$	rozlišení
RU	rutin
s	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný
$s_n$	reziduální odchylka
$s_R$	relativní směrodatná odchylka
SR	slepý roztok
SÚKL	státní ústav pro kontrolu léčiv
TB	tetraboritan sodný
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TR	troxerutin
UPLC	ultra performance liquid chromatography
UPS	Americký lékopis (USA)
UV	ultrafialové spektrum
v/v	objemová procenta
ZR	zásobní roztok
ZRS	směsný zásobní roztok

## 2 Úvod

Elektroforetické metody patří spolu s chromatografickými metodami k nejvýznamnější skupině analytických metod. Jejich největší předností je univerzálnost použití a možnost stanovení mnoha látek, často velmi podobných vlastností, během jedné analýzy. Ve srovnání s chromatografií vyniká díky menšímu průměru kapiláry i menší spotřebou vzorku a ostatních roztoků a je tedy šetrnější k životnímu prostředí.

V poslední době se kapilární elektroforetické techniky souhrnně označují HPCE (high performance capillary electrophoresis). Dosahují velké účinnosti separace (až milionů teoretických pater) a citlivosti až  $10^{-21}$  mol analytu ve velmi malém objemu vzorku (nano až pikolitry). Tím se kapilární elektroforéza řadí mezi nejperspektivnější analytické separační metody. [1]

Zavedení kapilární elektroforézy také umožnilo snadnou automatizaci a tím i její rozšíření do různých oblastí laboratorní praxe. Používá se například pro analýzu léčiv, farmakokinetické studie, forenzní aplikace i molekulární diagnostiku. [2]

Tato práce částečně vycházela ze zkušeností kolegů, kteří se zabývali analýzou podobných analytů. [3, 4, 5] Cílem byla separace a stanovení účinných látek v léčivém přípravku, resp. potravním doplňku. Pro dosažení kratších separačních časů byla zvolena krátká kapilára (efektivní délka 21 cm).

V experimentální části práce je řešena současná separace hesperidinu, diosminu, rutinu, troxerutinu a kyseliny askorbové. Aby bylo dosaženo optimální separace, byly testovány vybrané experimentální parametry včetně výběru vhodného vnitřního standardu. Postup optimalizace a nalezené optimální podmínky jsou uvedeny v experimentální části. V závěrečné části jsem podrobila elektroforetické analýze léčivé přípravky, resp. potravní doplňky s obsahem studovaných účinných látek.

V teoretické části jsou pro srovnání uvedeny další instrumentální metody, které byly použity pro analýzu daných analytů v různých maticích.

### **3 Cíl a popis zadání práce**

Cílem této práce bylo vyvinout novou metodu kapilární zónové elektroforézy (CZE) pro separaci a stanovení hesperidinu, diosminu, rutinu, troxerutinu a kyseliny askorbové a validovanou metodu aplikovat na analýzu léčivých přípravků a potravních doplňků HemoStop ProBio, Detralex, Cilkanol, Ascorutin a Hemodin Prebio Forte.

## 4 Teoretická část

### 4.1 Elektromigrační metody

Elektromigrační metody jsou techniky, které využívají pohyb ionizovaných částic ve stejnosměrném elektrickém poli. [6]

Využívají dvou elektrokinetických dějů - elektroforézy a elektroosmózy. V místě styku roztoku s nabitými částicemi s pevným podkladem, který také může nést elektrický náboj (stěny kapiláry, povrchy přítomných částic), se tvoří elektrické dvojvrstvy. Časem vznikne rovnovážné rozložení nábojů. Na tento systém se připojí stejnosměrné elektrické pole, které poruší rovnováhu v rozložení nábojů a vyvolá jejich pohyb. Při kapilární elektroforéze se uplatňují dva děje:

- elektroforetický - po vložení napětí se nabitě částice pohybují směrem k opačně nabitě elektrodě
- elektroosmotický – po vložení napětí se v křemenné nebo skleněné kapiláře pohybuje kapalina v kapiláře směrem k záporné elektrodě. [7]

#### 4.1.1 Princip elektroforézy

Hybnou silou pro částice je intenzita elektrického pole  $E$ , vyjádřená gradientem napětí v jednotkách  $V \cdot m^{-1}$ . Sílu působící pohyb částic vyjadřuje součin intenzity pole a velikosti náboje částice.

Proti pohybu částic působí brzdivá síla tření. Třecí síla pohybu kulovité částice je přímo úměrná jejímu poloměru a viskozitě kapaliny (Stokesův zákon). V praxi má jen charakter korelace.

Hybná i brzdivá síla působí na jednotlivé druhy iontů rozdílně, podle jejich náboje a velikosti. Skutečná migrační rychlost je výsledek interakce těchto vlivů. Pro separaci musí být u složek směsi rozdílná.

## Elektroforetická pohyblivost (mobilita)

Rychlost elektroforetického pohybu  $v$  ( $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ) je závislá mj. na intenzitě použitého elektrického pole. Pro srovnání hodnot měřených v různých podmínkách se zavádí pojem elektroforetická pohyblivost  $\mu$ . Je to rychlost při jednotkové intenzitě pole:

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (\text{m}^2 \cdot \text{V} \cdot \text{s}^{-1}), \text{ kde } v \text{ je rychlost pohybu iontu.}$$

Je nutné uvádět teplotu; změna o 1 stupeň mění pohyblivost o 2 %. Konstantou každého iontu je jeho absolutní pohyblivost. Je to idealizovaná hodnota platná jen pro nekonečně ředěné roztoky a je přímo úměrná limitní vodivosti iontů.

V reálných podmínkách jsou efektivní pohyblivosti většinou nižší než absolutní. Je to způsobeno interakcemi iontů v konečně zředěných roztocích i dalšími okolnostmi.

Efektivní pohyblivost můžeme cíleně ovlivnit volbou vnějších podmínek - složením elektrolytů migračního prostředí. Efektivní pohyblivost iontů silných elektrolytů je poměrně stálá. Ionty slabých elektrolytů mohou svoji efektivní pohyblivost výrazně měnit během reakcí, měnících jejich náboj. Rozhodujícím činitelem je zde pH prostředí. [8]

Jak již bylo uvedeno, můžeme rychlost pohybu iontu vyjádřit vztahem

$$v = \mu E, \text{ kde: } v \text{ je rychlost pohybu iontu}$$

$\mu$  elektroforetická pohyblivost a

$E$  intenzita elektrického pole.

Elektroforetická pohyblivost je výsledek rovnováhy mezi silou působící na ionty v elektrickém poli a silou vnitřního tření prostředí.

Tedy:  $\mu = \text{síla elektrického pole } F_E / \text{síla vnitřního tření } F_F$

$$F_E = qE$$

$F_F = -6\pi\eta rv$  kde:  $q$  je náboj iontu

$\eta$  je viskozita roztoku

$r$  poloměr iontu

$v$  rychlost pohybu iontu

Ze vztahu vyplývá, že síla vnitřního tření se mění s viskozitou prostředí. Proto se změnou teploty dojde ke změně této síly a tudíž ke změně rychlosti pohybu částice.

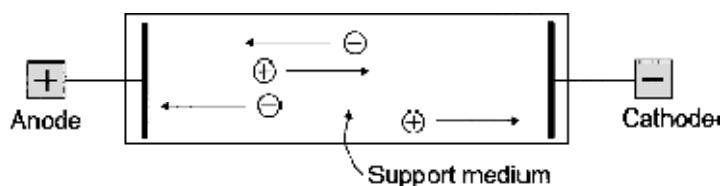
V průběhu elektroforézy dojde k ustavení rovnováhy mezi silou elektrického pole a silou vnitřního tření. V rovnováze mají obě síly stejnou hodnotu, ale opačného směru.

Malé částice s velkým nábojem mají velkou pohyblivost, zatímco velké částice s malým nábojem mají mobilitu malou. Efektivní mobilita, tj. pohyblivost, kterou skutečně při elektroforéze naměříme, je závislá na pH a použitém pufru. Úspěch separace látek ze směsi lze předpokládat jen tehdy, mají-li separované látky dostatečně odlišné efektivní elektroforetické pohyblivosti. [6]

V kapilární elektroforéze je hybnou silou elektroosmotický tok. Vzniká působením stejnosměrného elektrického pole na difúzní část elektrické dvojvrstvy na rozhraní pevné a kapalně fáze a je důsledkem disociace ionogenních skupin na kapiláře nebo jako selektivní adsorpce jednoho iontu na povrch kapiláry. Unáší všechny ionty stejnou rychlostí a má téměř pravoúhlý profil. Platí:  $v_{eo} = m_{eo} \cdot E$ , kde  $m_{eo}$  je elektroosmotická mobilita. [1]

#### 4.1.2 Uspořádání elektroforetické aparatury

Elektroforetická separace probíhá v médiu mezi dvěma elektrodami. Na jednom konci média je pozitivně nabitá anoda a na opačném konci je negativně nabitá katoda.



Obrázek 1 Elektroforetická aparatura [9]

Podle uspořádání elektroforetického systému lze elektroforézu rozdělit na:

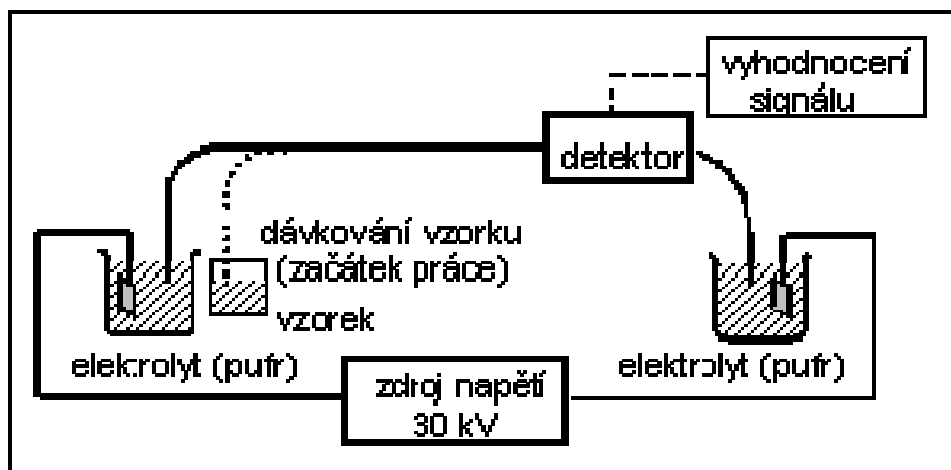
- volnou elektroforézu (v roztoku) [10]
- elektroforézu na nosičích (gel, papír)
- kapilární elektroforézu [7]

Podle principu separace můžeme elektroforézu v kapilárním uspořádání dělit také na několik skupin:

- kapilární zónová elektroforéza
- micelární elektrokinetická chromatografie
- kapilární gelová elektroforéza
- kapilární isoelektrická fokusace
- kapilární elektrochromatografie [7]

## 4.2 Kapilární zónová elektroforéza

Zónová elektroforéza je základní technikou, při které dochází k separaci na základě rozdílné pohyblivosti iontů v základním elektrolytu (background electrolyte - BGE). Separace probíhá při vložení napětí v kapiláře, jejíž oba konce jsou ponořeny v BGE. [1]



Obrázek 2 Schéma CE [7]



### **4.2.1 Instrumentace**

Pro separaci se nejčastěji používají křemenné kapiláry o vnitřním průměru 20 - 100  $\mu\text{m}$ . Samotné kapiláry jsou velmi křehké, proto bývají z vnějšku pokryté vrstvou polyimidu. Délka kapilár se pohybuje od 10 do 100 cm. Ovlivňuje především separační účinnost a rychlost separace. Vkládaná napětí bývají do 30 kV. [11]

### **4.2.2 Dávkování vzorku**

Vzorek se dává do konce kapiláry vzdálenějšího od detektoru. Zóna vzorku tvoří obvykle 1 - 2 % z celkové délky kapiláry. Používají se různé metody dávkování vzorku:

- hydrodynamickým tlakem – konec kapiláry je ponořen do nádoby se vzorkem, na kterou je aplikován zvýšený tlak, tento způsob je nejběžnější
- rozdílem hladin – dávkování je založeno na tzv. sifonovém efektu
- elektrokinetické dávkování – konec kapiláry je ponořen do nádoby se vzorkem a na tento systém je přivedeno napětí; nevýhodou je nepoměr mezi původním složením vzorku a složením nadávkovaného vzorku [7]

### **4.2.3 Detekce**

Běžně se používají UV a fluorescenční detektory, nejčastěji DAD detektory, využívající diodového pole. Pro zvýšení citlivosti se používají LIF detektory, založené na laserem indukované fluorescenci, MS detektory, někdy také ampérometrické a radiochemické detektory. [12, 13]

### 4.3 Antioxidační látky

Antioxidanty jsou látky, které omezují proces oxidace v organismu. Jejich molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů dvojitým způsobem, buď snižují pravděpodobnost jejich vzniku, nebo je převádějí do stavu, který vykazuje nižší reaktivitu. Jejich užívání má pozitivní vliv na zdraví organismu, protože snižuje pravděpodobnost srdečně-cévních chorob některých typů rakoviny. Mezi látky s antioxidačním účinkem patří  $\beta$ -karoteny (provitamin A), vitamin C, vitamin E a flavonoidy. [14]

#### 4.3.1 Flavonoidy

Jsou skupinou látek, které lze zařadit mezi rostlinné sekundární metabolity, jsou významné především pro svoje antioxidační schopnosti. [15] Podle struktury je řadíme mezi polyfenoly. Jejich výskyt v potravě je spojován se sníženým rizikem vzniku kardiovaskulárních chorob. Nejběžnějšími polyfenoly jsou flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany. [16]

Polyfenoly chrání před vznikem aterosklerózy tím, že brání oxidačním modifikacím LDL lipoproteinů. Dále mohou působit proti vzniku krevních sraženin a omezují tak riziko vzniku infarktu myokardu a mozkové mrtvice. [17]

Na celkovém příjmu polyfenolů z potravy se flavonoidy podílí asi ze dvou třetin. [16] Celkem do skupiny flavonoidů patří asi 60 látek. Většina flavonoidů má kladný vliv na pevnost cévní stěny. Strukturální kostru mnoha z nich tvoří kvercetin (včetně hesperidinu a rutinu). Nacházejí se například v citrusech, červeném víně, olivách, borůvkách a dalším drobném ovoci, jako jsou například maliny, ostružiny nebo aronie. [15] Pro průmyslovou výrobu potravních doplňků jsou často získávány ze slupek citrusového ovoce. [18]

### 4.3.2 Hesperidin

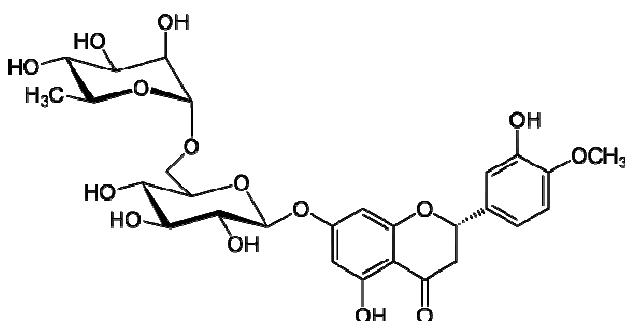
Sumární vzorec:  $C_{28}H_{34}O_{15}$

molární hmotnost:  $610,56 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

registrační číslo CAS: 520-26-3 [19]

vzhled: světle žlutý prášek

$pK_{A1}$ ,  $pK_{A2}$ ,  $pK_{A3}$ - $pK_{A8}$ : 9,56; 10,17; >12,36. [20]



Obrázek 3 Vzorec hesperidinu [19]

Hesperidin je flavonoid žluté barvy, ve vodě je málo rozpustný. Bývá také označován jako cirantin. Byl izolován z citrusových plodů, citronů (*Citrus limon*) a pomerančů (*Citrus sinensis*). [21]

#### Metody stanovení hesperidinu

Hesperidin byl stanovován nejčastěji metodou HPLC, ve dvou případech se jeho obsah stanovoval ve slupce citrusových plodů:

- RP - HPLC/MS – na reverzních fázích C-18 (RP C-18), kolona LiChro CART (Merck-Darmstadt), ( $250 \times 4 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), gradientová eluce: voda – kyselina mravenčí (99,5 : 0,5, v/v) (eluent A) a acetonitril (eluent B). Analyzátor ESI. [23]
- HPLC/MS – Agilent 1200 Series LC/MSD-Q (Santa Clara, CA, USA), stacionární fáze Hypersil BDS (C8,  $5 \mu\text{m}$ ) (Alltech, Nicholasville, KY, USA), kolona  $250 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , mobilní fáze voda s 0,1% kyseliny mravenčí (eluent A) a acetonitril (eluent B), izokratická eluce se 75% A a 25% B, průtok  $0,75 \text{ ml/min}$ . DAD detektor 290 a 360 nm. Analyzátor ESI. [18]

V jedné studii byly hladiny hesperidinu stanovovány v moči:

- UPLC/UV - UHPLC systém (Merck Hitachi, Germany), kolona Hypersil Gold (50 × 2,1 mm, 1,9 μm), gradientová eluce, mobilní fáze voda s 0,05% kyseliny trifluoroctové a acetonitrilu. UV detekce při 254 a 280 nm. [22]

### 4.3.3 Diosmin

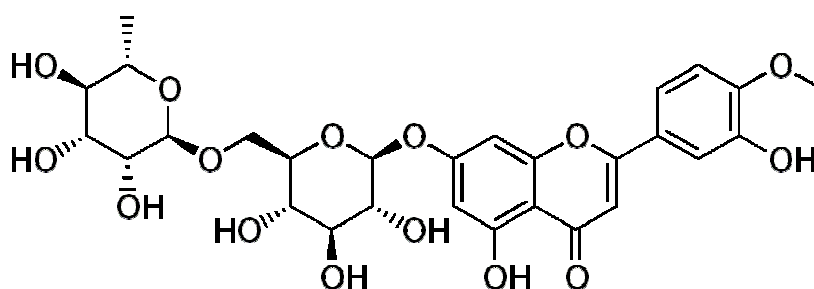
Sumární vzorec: C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>

molární hmotnost: 608,55 g.mol<sup>-1</sup>

registrační číslo CAS: 520-27-4 [24]

vzhled: žluto-hnědý prášek

pK<sub>A1</sub>, pK<sub>A2</sub>, pK<sub>A3</sub>-pK<sub>A8</sub>: 9,39; 10,07; >12,36. [20]



Obrázek 4 Vzorec diosminu [24]

Diosmin je velmi špatně rozpustný analyt žlutohnědé barvy. Byl izolován z routovitých rostlin (*Zanthoxylum avicennae*) a květů novozélandského stromu jerlínu kowhai (*Sophora microphylla*). V hojné míře se nachází také v citronové kůře (*Citrus limon*). Průmyslově se vyrábí z hesperidinu. [21]

#### Metody stanovení diosminu

Diosmin byl také nejčastěji stanovován metodou HPLC, často na reverzních fázích.

Stanovení diosminu ve slupce citrusových plodů:

- HPLC/MS – Agilent 1200 Series LC/MSD-Q (Santa Clara, CA, USA), stacionární fáze Hypersil BDS, C8, 5 μm (Alltech, Nicholasville, KY, USA), kolona 250 × 4,6 mm, 25 °C, mobilní fáze voda s 0,1% kyseliny mravenčí (eluent A)

a acetonitril (eluent B), izokratická eluce se 75% A a 25% B, průtok 0,75 ml/min.  
DAD detektor 290 a 360 nm. Analyzátor ESI. [18]

Stanovení diosminu v divizně velkokvěté a sáповité:

- RP – HPLC/UV – kolona C<sub>18</sub> Lichrosphere 100 (5 μm, 250 mm × 4,6 mm, i. d.), gradientová eluce s acetonitrilem, mobilní fáze vodná s 0,5% (w/v) kyseliny orthofosforečné obsahující 1% (v/v) tetrahydrofuranu. [25]

Stanovení diosminu v listech rostliny Buchu (*Agathosma berlina*) a tabletách:

- RP – HPLC/UV – kolona LiChrosorb RP-18, izokratická eluce, mobilní fáze methanol-voda (60: 40, v/v). UV detekce při 345 nm. [26]

#### 4.3.4 Rutin

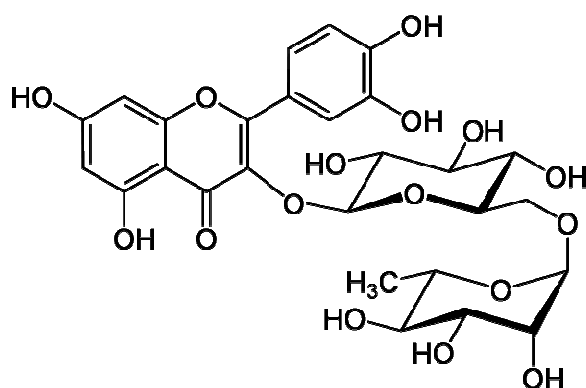
Sumární vzorec: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>

molární hmotnost: 610,52 g.mol<sup>-1</sup>

registrační číslo CAS: 153-18-4 [27]

vzhled: světle žlutý prášek

pK<sub>A1</sub>, pK<sub>A2</sub>, pK<sub>A3</sub>: 7,1; 9,15; 11,65. [28]



Obrázek 5 Vzorec rutinu [27]

Rutin je málo rozpustný ve vodě, ale poměrně dobře rozpustný v MeOH. Je obsažen v pohance seté (*Fagopyrum esculentum*), jinanu dvoulaločném (*Ginko biloba*), v řebříčku (*Achillea*) a mnoha dalších rostlinách. [21]

### Metody stanovení rutinu

Rutin byl nejčastěji stanovován metodou kapalinové chromatografie nebo kapilární elektroforézy.

Metodou CE v brazilských vínech:

- CE/UV – Kapilární elektroforetický systém HP<sup>3D</sup>CE (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), křemenná kapilára – celková délka 48,5 cm, efektivní délka 40,0 cm, i. d. 75 μm, pufr 17 mM tetraboritan sodný s 20% MeOH, 25 kV, 25°C, dávkování hydrodynamickým tlakem 50 mbar po 3 s, (pH neuvedeno). Detekce UV (DAD), 280 nm. [29]

Ve dvou studiích byly hladiny rutinu stanovovány metodou kapalinové chromatografie.

V jedné práci byly hladiny rutinu stanovovány v moči:

- UPLC/UV - UHPLC systém (Merck Hitachi, Germany), kolona Hypersil Gold (50 × 2,1 mm, 1,9 μm), gradientová eluce, mobilní fáze voda s 0,05% kyseliny trifluoroctové a acetonitrilu. UV detekce při 254 a 280 nm. [22]

V další práci byl rutin stanovován ve slupce citrusových plodů:

- RP - HPLC/MS – na reverzních fázích C-18 (RP C-18), kolona LiChro CART (Merck-Darmstadt), (250 × 4 mm, 5 μm), gradientová eluce: voda – kyselina mravenčí (99,5: 0,5, v/v) (eluent A) a acetonitril (eluent B). Analyzátor ESI. [23]

### 4.3.5 Troxerutin

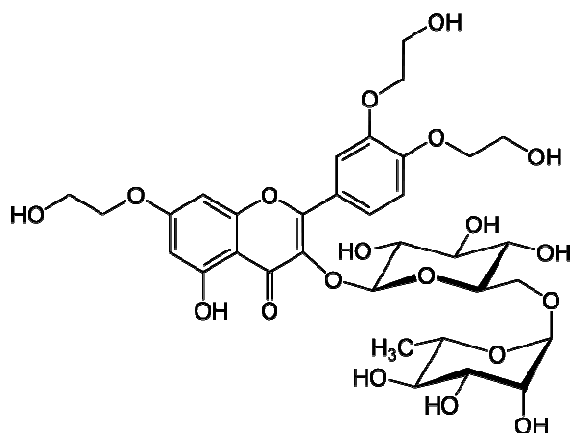
Sumární vzorec: C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>O<sub>19</sub>

molární hmotnost: 742,68 g.mol<sup>-1</sup>

registrační číslo CAS: 56764-99-9 [30]

vzhled: žlutý prášek

pK<sub>A</sub> nenalezeno



Obrázek 6 Vzorec troxerutinu [30]

Troxerutin je derivát rutinu. Byl izolován ze stromu jerlínu japonského (*Sophora Japonica*). Komerčně vyráběný troxerutin je směs hydroxyetylovaných rutinů, kde je alespoň 80% 7,3',4'-tris[O-(2-hydroxyethyl)] rutinů. [31]

### Metody stanovení troxerutinu

Troxerutinu se stanovuje různými chromatografickými metodami. V prvních dvou studiích byla použita metoda HPLC na reverzních fázích a hladina troxerutinu byla stanovována v biologickém vzorku. V prvním případě to byla lidská plazma:

- RP - HPLC/MS-MS – Agilent Model 1100 series (Agilent, Palo Alto, CA, USA), kolony (Zorbax SB, 150 mm 9 × 4,6 mm, 5 μm, Agilent, USA), gradientová eluce 10 mM octanem amonným obsahujícím 0,1% kyseliny mravenčí (eluent A) a methanolem (eluent B). Detekce MS-MS (ESI). [32]

Druhá práce stanovovala koncentraci troxerutinu v krysí moči a plazmě drůbeže:

- RP - HPLC/UV - HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) instrument, kolona VP-ODS (150 mm × 4,6 mm i. d., 5 μm), izokratická eluce, mobilní fáze směs vody, methanolu a kyseliny octové (57 : 43 : 1) o pH 3,0; 35 °C. UV detekce při 254 nm. [33]

Další studie stanovovala obsah troxerutinu v tabletách:

- MLCEC/UV – HP<sup>3D</sup> CE instrument (Agilent, Waldbronne, Germany), monolitická kolona poly-butyl methakrylát (PBMA), celková délka 31,5 cm, efektivní délka 22,0 cm, vnitřní průměr 75 μm, mobilní fáze směs 35 mM tetraboritou sodného a acetonitrilu (50/50), pH 9,0; 16 kV, 35 °C. UV detekce (DAD) při 254 nm. [34]

V následující práci byl zkoumán vliv různých cyklodextrinů ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) na migraci troxerutinu v TLC:

- RP-TLC/UV – stacionární fáze tenká vrstva polyamidu, mobilní fáze  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pufr s různými koncentracemi cyklodextrinů, pH 9,7; 20 °C. UV detekce 254 nm. [35]

#### 4.3.6 Kyselina askorbová

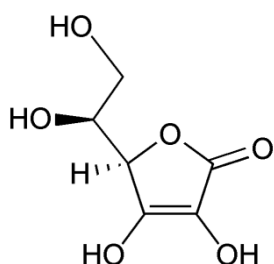
Sumární vzorec:  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$

molární hmotnost: 176,12  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

registrační číslo CAS: 50-81-7

vzhled: bílá nebo světle žlutá krystalická látka [36]

$\text{pK}_{\text{A}1}$ ,  $\text{pK}_{\text{A}2}$ : 4,04, 11,6 [36, 37]



Obrázek 7 Vzorec kyseliny askorbové [36]

Kyselina askorbová nebo také vitamin C je dobře rozpustná ve vodě. V organismu se podílí na hydroxylačních reakcích. Její přítomnost je nezbytná pro vznik hydroxyprolinu a hydroxylyzinu v kolagenu pro syntézu noradrenalinu z dopaminu.

Neméně významný je její antioxidační účinek. Je obsažena hlavně v ovoci a zelenině, kde se vyskytuje spolu s flavonoidy. V organismu působí spolu s vitaminem E na ochranu biomembrán a lipoproteinů LDL před oxidací. [38]

#### Metody stanovení kyseliny askorbové

Kyselina askorbová byla velmi často stanovována metodou kapilární elektroforézy v různých obměnách. Detekce byla UV nebo elektrochemická. Analyzovány byly džusy i biologické vzorky. V prvních dvou studiích byly analyzovány tělní tekutiny.



Analýza obsahu v slzách:

- MEKC/UV - HP<sup>3D</sup>CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), křemenná kapilára (50  $\mu\text{m}$  i. d., efektivní délka 56 cm), 25 mM borátový pufr, obsahující 100 mM SDS, pH 10,0; 25 °C, 20 kV. UV detekce (DAD) při 266 nm. [39]

Analýza v lidské moči:

- CZE/UV - CE system (Agilent Technologies, Germany), křemenná kapilára (celková délka 64,5 cm, efektivní délka 56,0 cm, 50  $\mu\text{m}$  i. d.), 50 mM borátový pufr se 3 mM  $\beta$ -cyklodextrinem, pH 8,35; -30 kV, 25 °C. UV detekce při 240 nm. [40]

V posledním případě to byla analýza grapefruitového džusu. Kyselina askorbová byla stanovována společně s rutinem:

- CZE/ED – laboratoří sestavený elektroforetický systém, křemenná kapilára (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) o délce 75 cm, 25  $\mu\text{m}$  i. d., 60 mM borátový pufr o pH 9,0; 30 kV. Ampérometrická detekce (platinová a srovnávací kalomelová elektroda). [41]

## 5 Experimentální část

### 5.1 Seznam chemikálií

Biologicky aktivní látky, léčivé přípravky a potravní doplňky:

Diosmin 95%, Sigma, (Mr = 608,56)

Hesperidin 90%, Fluka, (Mr = 610,57)

Kyselina askorbová  $\geq 99,0\%$ , Sigma, (Mr = 176,12)

Rutin hydrate 95%, Sigma Aldrich, (Mr = 610,52)

Trihydroxyethylrutin  $\geq 80\%$ , Sigma, (Mr = 742,68)

Ascorutin, výrobce: Zentiva, a. s., složení: 20 mg rutosidum trihydricum, 100 mg acidum ascorbicum v jedné tabletě.

Cilkanol, výrobce: Zentiva, k. s., složení: 300 mg troxerutinum v jedné tobolce.

Detralex, výrobce: Les Laboratoires Servier, Francie, složení: 500 mg purifikované mikronisované frakce flavonoidů – 450 mg diosminu, 50 mg hesperidinu v jedné tabletě.

Hemodin Prebio Forte, výrobce Valosun a. s., složení: 225 mg diosmin, 75 mg hesperidin, 40 mg rutin, 360 mg inulin, 20 mg vitamin C v jedné tabletě.

HemoStop ProBio, Da Vinci Academia, výrobce: Simply you, s. r. o., složení: 405 mg diosmin, 45 mg hesperidin, 20 mg rutin, 100 mg inulin, 107 mg vitamin C, 3,4 mg vitamin E ( $\alpha$ -TE),  $1,5 \cdot 10^8$  Lactobacillus acidophilus,  $4,5 \cdot 10^8$  Bifidobacterium bifidum,  $4,5 \cdot 10^8$  Bifidobacteriu longum v jedné tobolce.

Navážky standardů byly korigovány na čistotu analytů.

Vnitřní standardy:

Kyselina benzoová p. a., Fluka, (Mr = 122,12)

Kyselina skořicová  $\geq 99\%$ , Sigma - Aldrich, (Mr = 148,16)

Kyselina sorbová  $\geq 99\%$ , Sigma - Aldrich, (Mr = 112,13)

Methylparaben, čistota ČL 2009; RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, (Mr = 152,15)

Propylparaben, čistota ČL 2009; RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, (Mr = 180,20)

#### Složky základního elektrolytu:

Kyselina boritá pro elektroforézu, p. a., Sigma, (Mr = 61,83)

Tetraboritan sodný, dekahydrát, A. C. S. reagent, 99%, (Mr = 176,12)

Hydroxid sodný p. a., Ing. Petr Švec, Penta a. s., Praha, (Mr = 58,44)

Sodium dodecyl sulfate, for electrophoresis  $> 98,5\%$  (GC), Sigma (Mr = 288,38)

#### Cyklodextriny:

$\alpha$  – Cyklodextrin hydrát, p. a., Sigma, (Mr = 972,86)

$\beta$  – Cyklodextrin hydrát, p. a., Sigma, (Mr = 1137,01)

#### Rozpouštědla

Acetonitril p. a., Sigma – Aldrich, (Mr = 41,25)

Dimethylsulfoxid p. a., Sigma – Aldrich, (Mr = 78,13)

Ethanol p. a., Sigma – Aldrich, (Mr = 46,07)

Izopropylalkohol p. a., Ing. Petr Švec, Penta a. s., (Mr = 60,10)

Methanol p. a., Sigma – Aldrich, (Mr = 32,04)

*n* – Butylalkohol p. a., Lachema a. s., (Mr = 74,12)

## 5.2 Příprava roztoků

Na přípravu všech roztoků byla použita ultračistá voda připravená zařízením Milli-Q-System (Millipore, Bedford, MA, USA).

### 5.2.1 Příprava pracovních elektrolytů

Podle požadované koncentrace jsem si navázila odpovídající množství tetraboritou sodného a rozpustila ho ve vodě na ultrazvukové lázni. Přidala jsem odpovídající množství MeOH a upravila pH\* na určenou hodnotu pomocí kyseliny borité, resp. hydroxidu sodného. V odměrné baňce jsem roztok doplnila vodou po rysku.

### 5.2.2 Roztoky standardů pro optimalizaci metody

Pro optimalizaci metody byl používán roztok analytů o koncentraci 0,25 mg/ml. Zastoupení rozpouštědel v roztoku bylo 40% DMSO, 45% MeOH a 15% voda.

Do 25 ml odměrné baňky jsem pomocí nálevky navázila přesně asi 6,25 mg každého analytu (hesperidinu, diosminu, rutinu, troxerutinu a kyseliny askorbové). Navážku analytů jsem rozpustila v 10 ml DMSO na ultrazvukové lázni, přidala jsem 11,25 ml MeOH, roztok jsem ochladila na laboratorní teplotu a doplnila vodou po rysku. Roztok byl připravován čerstvý každý 4. den.

### 5.2.3 Hledání vnitřního standardu

Navázila jsem si odpovídající množství vnitřního standardu (kyselina sorbová, kyselina skořicová, methylparaben, propylparaben, kys. benzoová) a rozpustila ho v daném objemu roztoku standardů. Koncentrace analytů i vnitřního standardu v roztocích byla 0,25 mg/ml.

### 5.2.4 Zásobní roztoky

Pro dosažení širšího koncentračního rozmezí při kalibraci byl zásobní roztok každého analytu připravován separátně.

Do 10 ml odměrné baňky jsem pomocí nálevky navázila přesně asi 25 mg analytu (hesperidinu, diosminu, rutinu, troxerutinu), navážku rozpustila na ultrazvukové lázni, poté roztok ochladila na laboratorní teplotu a doplnila rozpouštědlem po rysku. Pro hesperidin a diosmin byl nejvhodnějším rozpouštědlem

DMSO. Rutin a troxerutin byly rozpouštěny MeOH. Koncentrace analytů v zásobních roztocích byla 2,5 mg/ml.

U kyseliny askorbové byl připraven zásobní roztok s koncentrací 10 mg/ml. Do 10 ml odměrné baňky jsem navážila pomocí nálevky přibližně přesně 100 mg kyseliny askorbové, navážku rozpustila ve vodě na ultrazvukové lázni, ochladila na laboratorní teplotu a doplnila vodou po rysku.

Dále byl připraven zásobní roztok vnitřního standardu o koncentraci 1 mg/ml ve slepém roztoku. Do 10 ml odměrné baňky jsem pomocí nálevky navážila přibližně přesně 10 mg vnitřního standardu a rozpustila ve 4 ml DMSO, přidala 4,5 ml MeOH a doplnila vodou po rysku.

Pro analýzu léčivých přípravků byl připraven roztok vnitřního standardu o koncentraci 1 mg/ml v MeOH. Do 10 ml odměrné baňky jsem pomocí nálevky navážila přibližně přesně 10 mg vnitřního standardu, rozpustila v MeOH a doplnila MeOH po rysku.

Tabulka 1 Složení zásobních roztoků

Analyt	Rozpouštědlo	Koncentrace
Hesperidin	DMSO	2,5 mg/ml
Diosmin	DMSO	2,5 mg/ml
Rutin	MeOH	2,5 mg/ml
Troxerutin	MeOH	2,5 mg/ml
Kyselina askorbová	voda	10 mg/ml
IS	40% DMSO, 45% MeOH, 15% voda	1 mg/ml

### 5.2.5 Kalibrační roztoky

Roztoky pro kalibrační závislosti byly připravovány ze zásobních roztoků analytů (ZR). Nejprve byl připraven směsný zásobní roztok: do 10 ml odměrné baňky byly pipetovány 2,00 ml ZR jednotlivých analytů (hesperidinu, diosminu, rutinu, troxerutinu), dále 1 ml ZR kyseliny askorbové, 0,5 ml MeOH a roztok byl doplněn vodou po rysku (ZRS). Koncentrace analytů v roztoku byly 0,50 mg/ml hesperidinu, 0,50 mg/ml diosminu, 0,50 mg/ml rutinu, 0,50 mg/ml troxerutinu a 1,00 mg/ml

kyseliny askorbové. Stejným způsobem byl připraven 6. kalibrační roztok, pouze k němu byl přidán vnitřní standard (Tab. 2).

Dále byl připraven slepý roztok (40% DMSO, 45% MeOH a 15% H<sub>2</sub>O).

Kalibrační roztoky č. 1-5 byly získány smícháním směsného zásobního roztoku analytů ZRS (0,5 mg/ml, resp. 1 mg/ml u kyseliny askorbové), zásobního roztoku IS – ZR (1 mg/ml) a slepého roztoku (SR). Příprava roztoků je uvedena v Tab. 2.

**Tabulka 2 Příprava kalibračních roztoků**

Kalibrační roztok	č. 1	č. 2	č. 3	č. 4	č. 5	č. 6
Zásobní roztok směsný (ZRS) [ml]	0,5	1	1,5	2,5	3,5	à 2,0 ml-ZR HE, DI, RU, TR + 1,0 ml ZR AA
Roztok IS zásobní (ZR) [ml]	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,50
Slepý roztok [ml]	4,25	3,75	3,25	2,25	1,25	0,50

Ředěním byly získány kalibrační roztoky v koncentračním rozmezí 0,05 - 0,50 mg/ml hesperidinu, 0,05 – 0,50 mg/ml diosminu, 0,05 – 0,50 mg/ml rutinu, 0,05 – 0,50 mg/ml troxerutinu a 0,10 – 1,00 mg/ml kyseliny askorbové. Koncentrace vnitřního standardu ve všech kalibračních roztocích byla 0,05 mg/ml.

**Tabulka 3 Koncentrace kalibračních roztoků**

Kalibrační roztok	č. 1	č. 2	č. 3	č. 4	č. 5	č. 6
c HE[mg/ml]	0,05	0,10	0,15	0,25	0,35	0,50
c DI [mg/ml]	0,05	0,10	0,15	0,25	0,35	0,50
c RU [mg/ml]	0,05	0,10	0,15	0,25	0,35	0,50
c TR [mg/ml]	0,05	0,10	0,15	0,25	0,35	0,50
c AA [mg/ml]	0,10	0,20	0,30	0,50	0,70	1,00
c IS [mg/ml]	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

## 5.2.6 Příprava vzorku z tablety

Všechny roztoky vzorků jsem před CZE analýzou přefiltrovala přes membránový filtr (0,45 µm) přímo do vialky.

### HemoStop ProBio

Z deseti tobolek přípravku jsem určila průměrnou hmotnost obsahu jedné tobolky. Průměrná hmotnost byla 0,7432 g. Obsah tobolek jsem zhomogenizovala ve třecí misce.

Pro analýzu jsem do 20 ml baňky pomocí nálevky navážila množství odpovídající přibližně čtvrtině obsahu jedné tobolky, tj. přibližně přesně 0,1858 g. Navážku přípravku jsem rozpustila v DMSO, doplnila po rysku a roztok jsem nechala 15 minut extrahovat na ultrazvukové lázni. Roztok jsem ochladila na laboratorní teplotu, odebrala jsem 10,00 ml do 25 ml odměrné baňky, přidala jsem k němu 10 ml MeOH, 1,25 ml roztoku vnitřního standardu v MeOH o koncentraci 1 mg/ml a roztok jsem doplnila vodou po rysku. Roztok jsem použila ho pro stanovení hesperidinu, rutinu a kyseliny askorbové.

Pro zjištění obsahu diosminu bylo nutné použít větší ředění. Z roztoku přípravku v DMSO jsem odebrala 1,00 ml do 25 ml odměrné baňky, přidala jsem k němu 9 ml DMSO, 10 ml MeOH, 1,25 ml roztoku vnitřního standardu v MeOH o koncentraci 1 mg/ml a roztok jsem doplnila vodou po rysku.

### Ascorutin

Z deseti tablet přípravku jsem zjistila průměrnou hmotnost tablety. Průměrná hmotnost byla 0,2290 g. Tablety jsem rozdrtila na jemný prášek ve třecí misce.

Pro analýzu jsem pomocí nálevky navážila do 50 ml odměrné baňky množství, odpovídající přibližně čtvrtině tablety, tj. přibližně přesně 0,0573 g. Navážku jsem rozpustila ve 20 ml DMSO a přípravek jsem extrahovala 15 minut na ultrazvukové lázni. Do baňky jsem přidala 20 ml MeOH a 2,5 ml roztoku vnitřního standardu v methanolu o koncentraci 1 mg/ml. Roztok jsem ochladila na laboratorní teplotu a doplnila ultračistou vodou po rysku.

## **Cilkanol**

Z deseti tobolek přípravku jsem určila průměrnou hmotnost obsahu jedné tobolky. Průměrná hmotnost byla 0,3255 g. Obsah tobolek jsem zhomogenizovala ve třecí misce.

Pro analýzu jsem do 20 ml baňky pomocí nálevky navážila množství odpovídající přibližně čtvrtině obsahu jedné tobolky, tj. přibližně přesně 0,0814 g. Navážku přípravku jsem rozpustila v DMSO, doplnila po rysku a roztok jsem nechala 15 minut extrahovat na ultrazvukové lázni. Roztok jsem ochladila na laboratorní teplotu, odebrala jsem z něj 1,00 ml do 25 ml odměrné baňky, přidala 9 ml DMSO, 10 ml MeOH a 1,25 ml vnitřního standardu v MeOH o koncentraci 1 mg/ml. Roztok jsem doplnila redestilovanou vodou po rysku.

## **Detralex**

Z deseti tablet přípravku jsem zjistila průměrnou hmotnost tablety. Průměrná hmotnost byla 0,6763 g. Tablety jsem rozdrtila na jemný prášek ve třecí misce.

Pro analýzu jsem pomocí nálevky navážila do 50 ml odměrné baňky množství odpovídající přibližně polovině tablety, tj. přibližně přesně 0,3382 g. Navážku přípravku jsem rozpustila v DMSO, doplnila po rysku a roztok jsem nechala 15 minut extrahovat na ultrazvukové lázni. Roztok jsem ochladila na laboratorní teplotu, odebrala jsem z něj 10 ml do 25 ml odměrné baňky, přidala jsem k němu 10 ml MeOH, 1,25 ml roztoku vnitřního standardu v MeOH o koncentraci 1 mg/ml a doplnila ho vodou po rysku. Roztok jsem použila pro stanovení hesperidinu.

Pro analýzu diosminu bylo potřeba další zředění roztoku. Z roztoku přípravku v DMSO jsem odebrala 1,00 ml do 20 ml odměrné baňky, přidala 7 ml DMSO, 8 ml MeOH, 1,00 ml roztoku vnitřního standardu v MeOH o koncentraci 1 mg/ml a roztok jsem doplnila vodou po rysku.

## **Hemodin Prebio Forte**

Z deseti tablet přípravku jsem zjistila průměrnou hmotnost tablety. Průměrná hmotnost byla 1,0102 g. Tablety jsem rozdrtila na jemný prášek ve třecí misce.

Pro analýzu jsem do 20 ml baňky pomocí nálevky navážila množství odpovídající přibližně čtvrtině obsahu jedné tobolky, tj. přibližně přesně 0,2525 g. Navážku jsem



rozpustila v DMSO, doplnila po rýsku a roztok jsem nechala 15 minut extrahovat na ultrazvukové lázni. Roztok jsem ochladila na laboratorní teplotu, odebrala 10,00 ml do 25 ml odměrné baňky, přidala 10 ml MeOH, 1,25 ml roztoku vnitřního standardu v MeOH o koncentraci 1 mg/ml a roztok jsem doplnila vodou po rýsku. Tento roztok jsem použila pro stanovení hesperidinu, rutinu a kyseliny askorbové.

Pro stanovení obsahu diosminu bylo potřeba větší zředění roztoku. Z roztoku přípravku v DMSO jsem odebrala 2,00 ml do 25 ml odměrné baňky, přidala 8 ml DMSO, 10 ml MeOH, 1,25 ml roztoku vnitřního standardu v MeOH o koncentraci 1 mg/ml a roztok doplnila vodou po rýsku.

### **5.2.7 Příprava vzorku pro ověření správnosti metody**

Pro ověření správnosti metody jsem využila metodu standardního přídávku.

#### **HemoStop ProBio**

Ze zhomogenizované tabletoviny jsem navážila pomocí nálevky do 20 ml odměrné baňky přesně asi 0,1858 g, přidala 50,63 mg diosminu, 5,63 mg hesperidinu, 2,5 mg rutinu a 13,38 mg kyseliny askorbové. Vzorek jsem zpracovala stejně jako vzorek pro analýzu obsahu účinných látek (kap. 5.2.6).

Vložené koncentrace byly 0,10 mg/ml diosminu, 0,10 mg/ml hesperidinu, 0,05 mg/ml rutinu a 0,23 mg/ml kyseliny askorbové.

#### **Ascorutin**

Z rozdrčené tabletoviny jsem navážila pomocí nálevky do 20 ml odměrné baňky přesně asi 0,0573 g. K navážce jsem přidala přibližně přesně 2,5 mg rutinu a 12,5 mg kyseliny askorbové. Vzorek jsem zpracovala stejně jako vzorek pro analýzu obsahu účinných látek (kap. 5.2.6).

Vložené koncentrace byly 0,05 mg/ml rutinu a 0,28 mg/ml kyseliny askorbové.

### **Cilkanol**

Ze zhomogenizované tabletoviny jsem navážila pomocí nálevky do 20 ml odměrné baňky přesně asi 0,0814 g, přidala 37,5 mg troxerutinu. Vzorek jsem zpracovala stejně jako vzorek pro analýzu obsahu účinné látky (kap. 5.2.6).

Vložená koncentrace byla 0,06 mg/ml troxerutinu.

### **Detralex**

Z rozdrcené tabletoviny jsem navážila pomocí nálevky do 50 ml odměrné baňky přesně asi 0,0573 g, přidala přibližně přesné množství 112,5 mg diosminu a 12,5 mg hesperidinu. Vzorek jsem zpracovala stejně jako vzorek pro analýzu obsahu účinných látek (kap. 5.2.6).

Vložené koncentrace byly 0,10 mg/ml diosminu a 0,13 mg/ml hesperidinu.

### **Hemodin Prebio Forte**

Z rozdrcené tabletoviny jsem navážila pomocí nálevky přímo do 20 ml odměrné baňky přesně asi 0,2525 g, 28,13 mg diosminu, 3,75 mg hesperidinu, 5 mg rutinu a 2,5 mg kyseliny askorbové. Vzorek jsem zpracovala stejně jako vzorek pro analýzu obsahu účinných látek (kap. 5.2.6).

Vložené koncentrace byly 0,11 mg/ml diosminu, 0,07 mg/ml hesperidinu, 0,10 mg/ml rutinu a 0,06 mg/ml kyseliny askorbové.

## 5.3 Pístroje

Pro vypracování této diplomové práce byly použity následující pístroje:

- Kapilární elektroforetický systém P/ACE™MDQ Capillary Electrophoresis System, Beckman Coulter, USA, software Karat 32,
- Automatické analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo,
- Laboratorní digitální pH metr PHM 220, Radiometr Kopenhagen, Dánsko, pístroj byl kalibrován pomocí standardních pufrů (pH 7,000 a 10,012),
- Kombinovaná pH elektroda Red Rod,
- Elektromagnetická míchačka MR 1000, Heidolph, Německo,
- Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK 31, Bandelin Electronik, Německo.

### 5.3.1 Kapilární elektroforetický systém Beckman Coulter

Pístroj je vybaven UV detektorem (PDA – photo diode array). Separace probíhala v křemenné kapiláře o celkové délce 31,2 cm a efektivní délce 21 cm. Vnitřní průměr kapiláry byl 50  $\mu\text{m}$ . Komunikaci s počítačem a ovládání pístroje zajišťoval software Karat 32, kterým sloužil i ke zpracování a vyhodnocování dat.

## 5.4 Pracovní postup

Na začátku každého dne jsem zapnula počítač, elektroforetický systém a spustila jsem promývání kapiláry. Kapiláru jsem promývala při tlaku 1500 mbar po dobu 10 minut 1 M hydroxidem sodným, 10 minut 0,1 M hydroxidem sodným a 10 minut vodou. K docílení lepší separační účinnosti a reprodukovatelnosti jsem kapiláru před každou analýzou promyla 2 minuty 0,1 M hydroxidem sodným, 2 minuty vodou a 3 minuty elektrolytem, vše při tlaku 1000 mbar.

Před spuštěním analýzy jsem nastavila její parametry. Vzorek byl dávkován hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6 s. Separace probíhala při teplotě 25 °C a napětí 25 kV. Pro detekci analytů byly použity vlnové délky 200 nm, 260 nm a 280 nm. Před každou analýzou jsem vzorek a pracovní elektrolyt odplynila 5 minut na ultrazvukové lázni, resp. 15 minut, při testování vlivu SDS.

Na konci dne, po ukončení všech měření, jsem spustila stejnou promývací sekvenci jako na začátku dne.

## 5.5 Výpočty

### 5.5.1 Kalibrační závislost

Pro zjištění kalibrační závislosti jsem použila šest kalibračních roztoků. Každý roztok jsem změřila třikrát. Všechny obsahovaly stejnou koncentraci vnitřního standardu. Kalibrační závislost byla vyhodnocena pomocí PC v programu Excel metodou lineární regrese jako závislost poměru korigované plochy píku analytu ke korigované ploše píku vnitřního standardu na koncentraci stanovované látky v mg/ml. Plochy píků byly korigovány migračním časem.

### 5.5.2 Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce (LOD) udává nejnižší možnou koncentraci analytu ve vzorku, kterou je možné analyt danou metodou prokázat, ale ne spolehlivě kvantifikovat. Vyjadřuje se jako koncentrace analytu při daném poměru signálu k šumu, většinou se udává 3:1. Limit kvantifikace (LOQ) určuje nejnižší koncentraci, pro kterou lze analyt nejen detegovat, ale i kvantifikovat s dostatečnou přesností. Tyto limity je možné stanovit různými způsoby. Pro určení limitů jsem použila následující vztahy s daty získanými z kalibrační křivky:

$$LOD = \frac{3,3s_n}{k}$$

$$LOQ = \frac{10s_n}{k}$$

kde  $s_n$  je reziduální odchylka

$k$  je směrnice regresní přímky. [42]

### 5.5.3 Opakovatelnost metody

Pro zjištění opakovatelnosti metody jsem použila roztok o koncentraci 0,15 mg/ml hesperidinu, 0,15 mg/ml diosminu, 0,15 mg/ml rutinu, 0,15 mg/ml troxerutinu, 0,30 mg/ml kyseliny askorbové. Koncentrace vnitřního standardu byla

0,05 mg/ml. Roztok jsem změřila šestkrát. Pro výpočet průměru, směrodatné a relativní směrodatné odchylky jsem použila vzorce:

Průměr hodnot výsledků měření  $\bar{x}$ :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Směrodatná odchylka:

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

Relativní směrodatná odchylka:

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

Pro všechny uvedené vzorce platí, že  $n$  je počet měření a  $x_i$  je jednotlivá hodnota měření.

#### 5.5.4 Rozlišení

Rozlišení ( $R_s$ ) mezi dvěma píky s podobnými výškami se vypočítá podle vztahu:

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

kde  $t_R$  jsou migrační časy látek [s], kde platí  $t_{R2} > t_{R1}$ ,  
 $w_h$  jsou šířky píků v polovině jejich výšky [s]. [43]

#### 5.5.5 Faktor asymetrie píku

Faktor asymetrie píku ( $A_s$ ) se vypočte za vztahu:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

kde  $w_{0,05}$  je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky [s],

$d$  je vzdálenost mezi kolmicí spuštěné z vrcholu píku a vzestupné části píku v jedné dvacetině jeho výšky. [43]

### 5.5.6 Účinnost separace

Účinnost elektroforetického systému se vyjadřuje pomocí výškového ekvivalentu teoretického patra  $N$ , případně pomocí výškového ekvivalentu teoretického patra  $HETP$ .

Počet teoretických pater se vypočítá podle vztahu:

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

kde  $t_R$  je migrační čas analytu [s]

$w_h$  je šířka píku v polovině jeho výšky [s]. [43]

Výškový ekvivalent teoretického patra lze vypočítat pomocí vztahu:

$$HETP = \frac{l}{N}$$

kde  $l$  je efektivní délka kapiláry [m]

$N$  je počet teoretických pater. [7]

### 5.5.7 Správnost metody

$$R(\%) = \frac{\text{hodnota nalezená}}{\text{hodnota vložená}} \cdot 100 \quad [44]$$

## 6 Výsledky a diskuze

### 6.1 Optimalizace separačních podmínek

Cílem této práce bylo vytvořit metodu pro současnou separaci, resp. stanovení kyseliny askorbové a flavonoidů hesperidinu, diosminu, rutinu, troxerutinu. Při hledání optimálních podmínek separace byl testován vliv pH, iontové síly pufru, přídavku organického rozpouštědla a optimalizace jeho koncentrace, byl testován přídavek některých cyklodextrinů. V různých podmínkách byl vyzkoušen vliv surfaktantu SDS. Dále byl testován vliv teploty na kvalitu separace a vliv tlaku a doby nástřiku vzorku. Nakonec by zvolen vnitřní standard. Vytvořená metoda byla aplikována na analýzu přípravků HemoStop ProBio, Ascorutin, Cilkanol, Detralex a Hemodin Prebio Forte.

#### 6.1.1 Volba vhodné vlnové délky pro detekci

Nejdříve bylo potřeba najít nejlepší vlnové délky pro detekci analytů. Přístroj Beckman Coulter, na kterém bylo prováděno měření, je vybaven DAD detektorem (UV). Pro odečet optimálních vlnových délek byla provedena měření v borátovém pufru s 15% MeOH.

Troxerutin vykazoval absorpční maxima při 200 a 252 nm, hesperidin při 195 a 280 nm, diosmin při 200 a 260 nm, rutin při 200 a 266 nm a kyselina askorbová při 190 a 263 nm. Vzhledem k velkému počtu analytů bylo nutné zvolit takové vlnové délky, aby vyhovovaly pokud možno všem analytům. Pro detekci byly zvoleny tři vlnové délky: 200 nm, 260 nm a 280 nm.

#### 6.1.2 Volba základního elektrolytu

Podle dostupné literatury [3, 4, 5] jsem zjistila, že pro separaci hesperidinu, diosminu a rutinu je nejvhodnější borátový pufr, jiný druh pufru nebyl testován. Identifikace píků byla provedena přídavkem standardů.

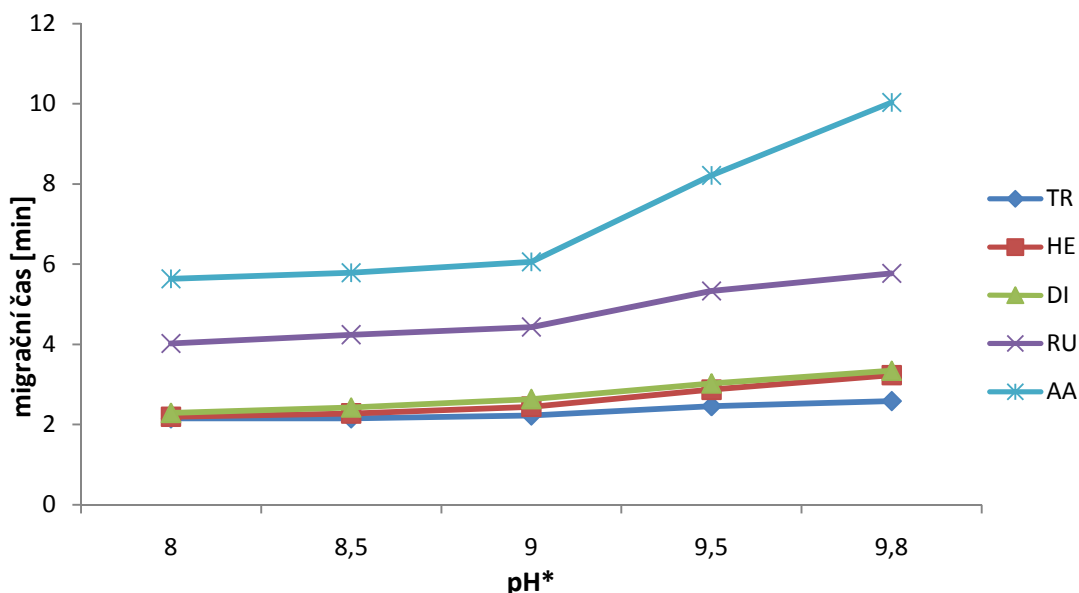
#### 6.1.3 Optimalizace hodnoty pH\*

Velmi důležitým parametrem pro kvalitní separaci analytů je pH\* BGE. Ovlivňuje počet negativně nabitých silanolových skupin na vnitřní stěně kapiláry (tedy i hodnotu EOT) a stupeň disociace analytů. Vzhledem k acidobazickým vlastnostem

analyzovaných látek bylo pro CZE analýzu zvoleno pH\* v alkalické oblasti. BGE rovněž obsahoval přídavky organických rozpouštědel kvůli nerozpustnosti analytů ve vodě a CZE nebylo možné provádět v čistě vodném prostředí.

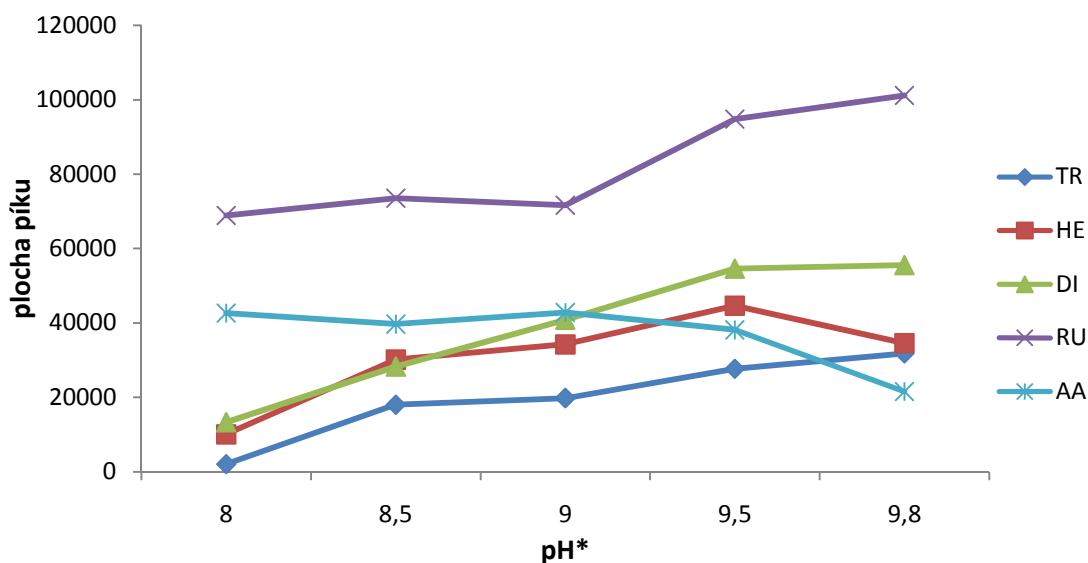
Sledovala jsem vliv pH\* pracovního elektrolytu v rozmezí 8,0 až 9,8; toto rozmezí pokrývalo konkrétní pH\* 8,00; 8,50; 9,00; 9,50 a 9,80. Hodnota pH\* byla upravována pomocí 0,5M kyseliny borité, resp. 0,1M hydroxidu sodného. Se zvyšující se hodnotou pH\* se prodlužovaly migrační časy analytů, což vedlo k prodloužení doby analýzy, ale zároveň docházelo k lepšímu oddělení píků. U nižších hodnot pH\* (8,0 a 8,5) nebyla separace příliš úspěšná. U hodnoty 8,0 se vůbec neoddělily první tři píky (troxerutin, hesperidin a diosmin). Při hodnotě 8,5 k separaci látek došlo, ale píky hesperidinu a diosminu měly velmi špatný tvar. U pH 9,8 byla analýza poměrně dlouhá (11 min) a generovaný proud dosahoval vysokých hodnot (105  $\mu$ A). Nejlépe se jevilo pH\* 9,0 a 9,5, ale u pH 9,0 byla v některých měřeních zaznamenána deformace až štěpení píku hesperidinu, pravděpodobně v důsledku nehomogenity určitých parametrů v kapiláře (viz také vliv teploty při separaci, kap. 6.1.9). (Obr. 8)

Jako optimální pH\* jsem proto vybrala 9,50. U této hodnoty pH\* byly také největší plochy píků, píky byly oddělené a čas analýzy nebyl relativně příliš dlouhý (Obr. 9).



Obrázek 8 Závislost migračních časů analytů na pH\*; BGE 40mM tetraboritan sodný, 15%MeOH, napětí 20 kV, teplota 25°C;  $\lambda = 280$  nm





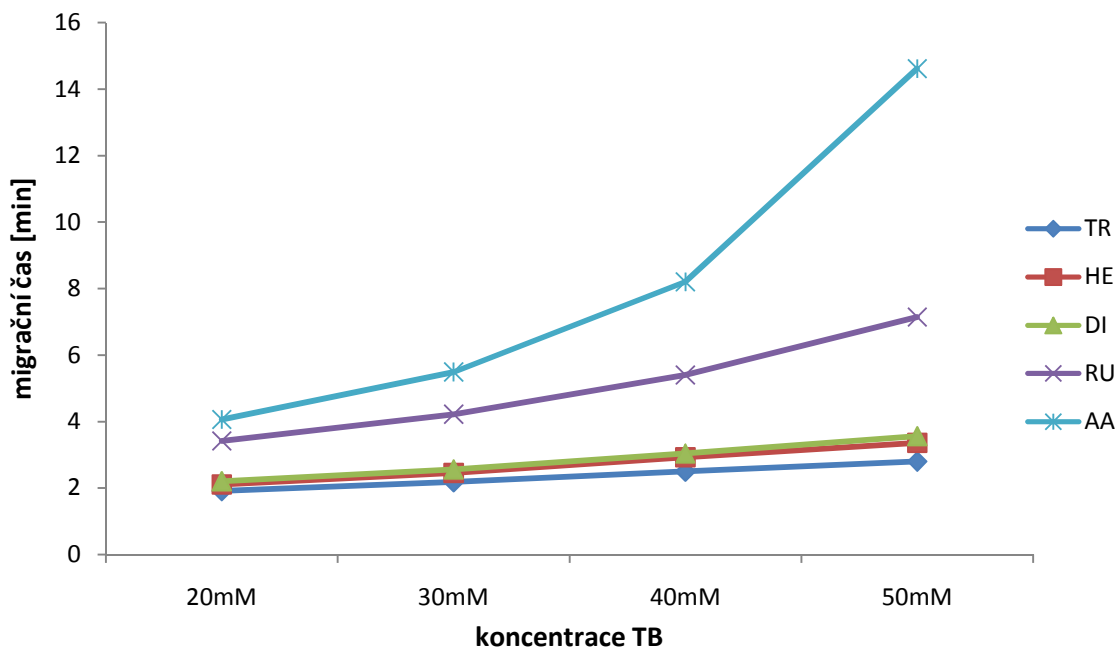
Obrázek 9 Závislost plochy píků na pH\*; BGE 40mM tetraboritan sodný, 15%MeOH, napětí 20 kV, teplota 25 °C;  $\lambda = 280 \text{ nm}$

Vliv pH\* na citlivost analýzy se projevil nejvíce u nejrychleji migrujících analytů (troxerutinu, hesperidinu a diosminu), Obr. 9.

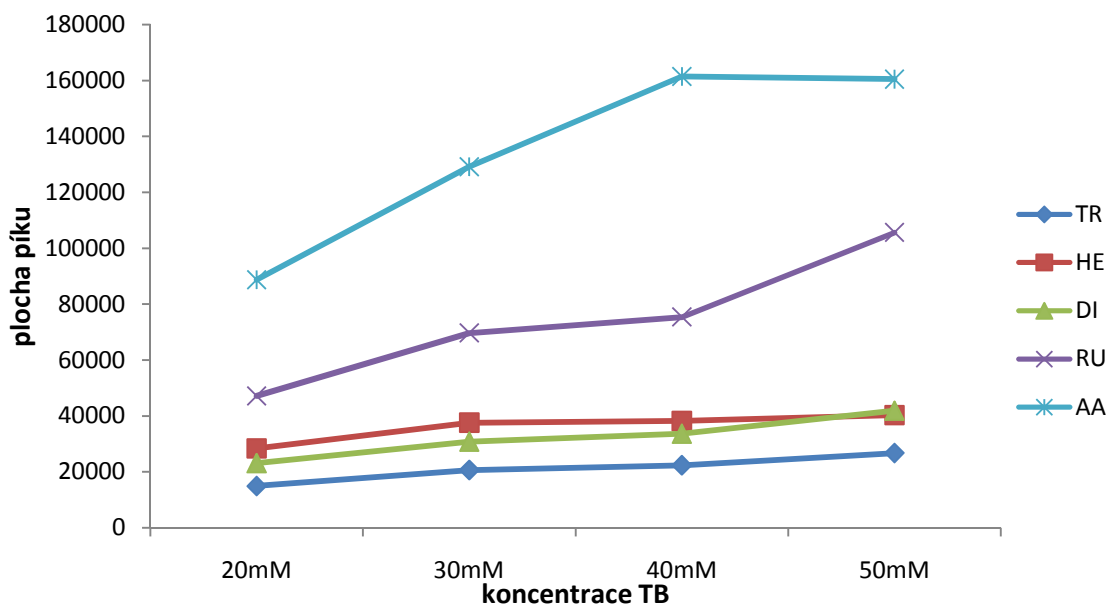
#### 6.1.4 Vliv koncentrace pufru

Jako složka základního elektrolytu byl zvolen tetraboritan sodný. Zjišťovala jsem vliv jeho koncentrace na kvalitu separace. Testovala jsem tyto koncentrace TB: 20 mM, 30 mM, 40 mM a 50 mM. Se zvyšující se koncentrací pufru se prodlužovala délka analýzy. Při koncentraci pufru 20 mM trvala analýza do 4,5 min, ale první pík (troxerutin) se nacházel blízko elektroosmotického toku. Ve 30 mM pufru probíhala CZE analýza podobně, ale pík hesperidinu byl nesymetrický. U 50 mM pufru byla analýza poměrně dlouhá (16 min). Různá koncentrace BGE ovlivňovala nejvíce migrační čas AA.

Pro další analýzy jsem zvolila pufr o koncentraci 40 mM. První pík byl v dostatečné vzdálenosti od elektroosmotického toku, pík hesperidinu měl nejlepší tvar a analýza probíhala do 8,5 min (Obr. 10).



Obrázek 10 Závinnost migrčních časů analytů na koncentraci borátového pufru; BGE 15% MeOH, pH\* 9,5, napětí 20 kV, teplota 25 °C;  $\lambda = 280$  nm



Obrázek 11 Závinnost plochy píků na koncentraci borátového pufru; BGE 15% MeOH, pH\* 9,5, napětí 20 kV, teplota 25 °C;  $\lambda = 280$  nm

Optimalizace koncentrace pufru měla vliv hlavně na rychlost separace a tvar píku hesperidinu. Citlivost analýzy z hlediska zvyšující se koncentrace BGE nebyla prakticky ovlivněna u TR, DI a HE, mírný pozitivní vliv byl zjištěn u RU a AA (Obr. 11).

### 6.1.5 Vliv organického rozpouštědla

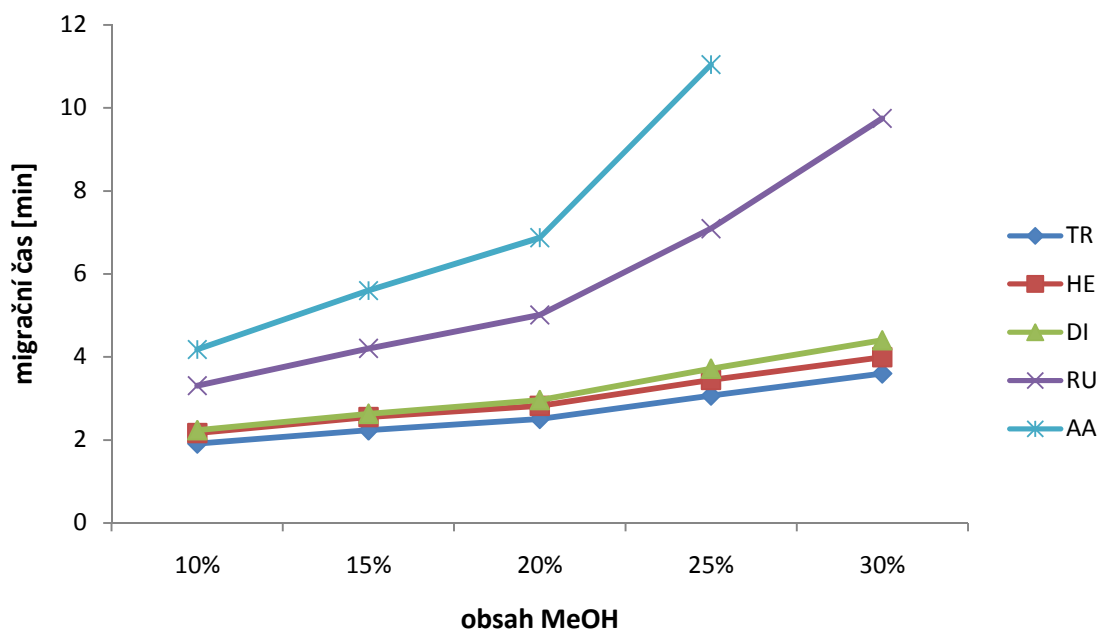
Přídavek organických rozpouštědel do BGE obvykle prodlužuje migrační časy analytů (zpomaluje EOT) a tím zlepšuje rozlišení mezi píky. V předběžných pokusech jsem testovala rozpouštědla MeOH, EtOH a acetonitril s obsahem 10% (v/v) v BGE.

Uvedená rozpouštědla prodlužovala migrační časy, nejvýraznější byl tento vliv u MeOH. Při 10% koncentraci rozpouštědel nebyly píky hesperidinu a diosminu dostatečně oddělené, ale vyšší koncentrace v případě EtOH a acetonitrilu nebylo možné při optimálním pH\* a koncentraci BGE připravit pro špatnou rozpustnost tetraboritou sodného. Proto byl jako organická složka zvolen MeOH a byl vyzkoušen vliv koncentrace na kvalitu separace.

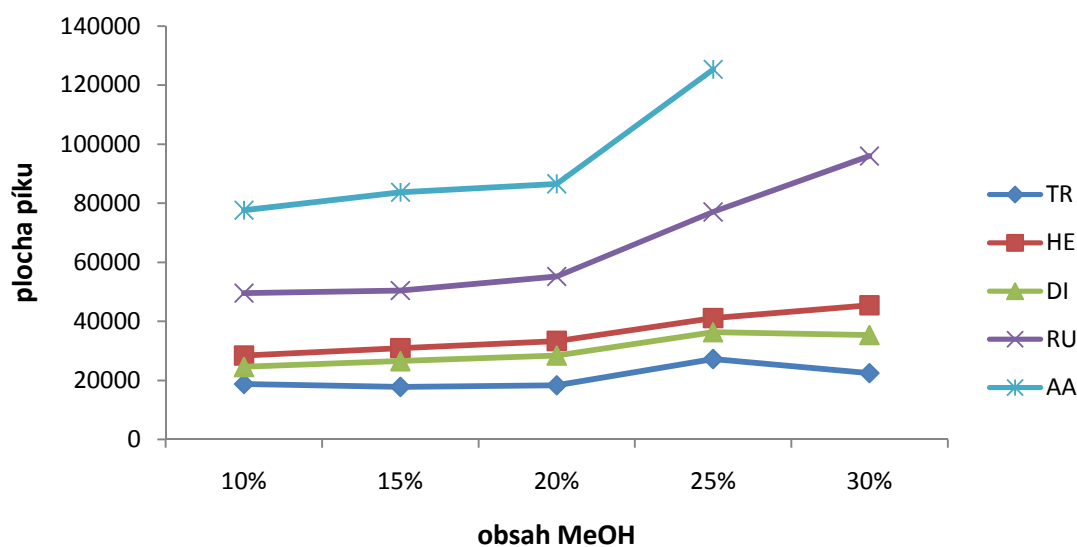
#### Vliv koncentrace MeOH v BGE

Připravila jsem sérii pufrů s koncentrací 5%, 10%, 15%, 25% a 30% MeOH. Při hodnocení výsledků jsem se zaměřila hlavně na schopnost oddělit jednotlivé píky. Přídavek organického rozpouštědla ovlivňuje také EOT a velikost proudu při analýze a tím teplotní poměry uvnitř kapiláry. S rostoucí koncentrací MeOH klesala hodnota proudu a docházelo k prodlužování migračních časů. Při koncentraci 5% nebylo možné udržet stabilní proud, proto tato koncentrace není hodnocena. Při koncentraci 10% nebyly píky hesperidinu a diosminu odděleny a proud byl vysoký – okolo 90  $\mu\text{A}$ . U koncentrace 15% píky již byly odděleny téměř na základní linii, ale rozlišení bylo malé. Při další rostoucí koncentraci MeOH se dále zvyšovaly migrační časy analytů, ale při koncentraci 30% MeOH již byla analýza velmi dlouhá (poslední migrující kyselina askorbová měla migrační čas nad 15 minut). Navíc se objevila nesymetrie píku hesperidinu a nestabilita proudu (dosahoval hodnot okolo 55  $\mu\text{A}$ ).

Jako nejlepší jsem vybrala koncentraci 25% MeOH. Všechny píky byly dokonale odděleny a jejich plochy byly největší (Obr. 12 a 13).



Obrázek 12 Závislost migračních časů na obsahu methanolu v BGE; 40 mM tetraboritan sodný, pH\* 9,5, napětí 20 kV, teplota 25 °C;  $\lambda = 280$  nm



Obrázek 13 Závislost plochy píkú na obsahu methanolu v BGE; 40 mM tetraboritan sodný, pH\* 9,5, napětí 20 kV, teplota 25 °C;  $\lambda = 280$  nm

### 6.1.6 Ovlivnění separace přidavkem cyklodextrinů do BGE

Podle dostupné literatury [4, 5] jsem vybrala cyklodextriny, které by mohly mít na separaci analytů vliv a připravila je v koncentraci 5 mM a 10 mM. Testovala jsem vliv elektroneutrálních cyklodextrinů  $\alpha$  a  $\beta$ . U 5 mM a 10 mM  $\alpha$ -cyklodextrinu došlo

k prodloužení analýzy asi o 2 minuty, přičemž tvar píků zůstal nezměněn. 5 mM  $\beta$ -cyklodextrin působil spíše negativně na tvar píku diosminu, vliv na trvání analýzy byl nepodstatný. Při přípravě 10 mM  $\beta$ -cyklodextrinu se objevil problém s jeho rozpustností, proto byl z testování vyřazen.

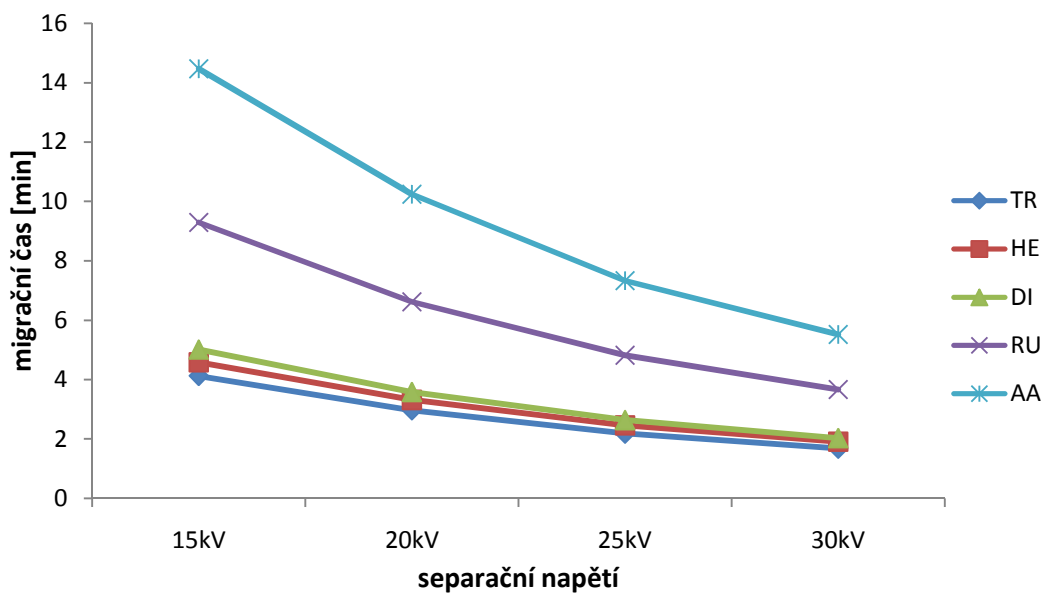
Při použití cyklodextrinů nedošlo k žádnému zlepšení oproti klasickému pufru bez CD, proto jsem od jejich dalšího použití a testování upustila.

### **6.1.7 Vliv SDS**

Jako další jsem vyzkoušela vliv přídavku SDS do BGE. U 40 mM borátového pufru nebylo možné udržet stabilní proud, proto jsem při testování vlivu SDS použila místo tetraboritou sodného 100 mM kyseliny boritou (pH\* upravováno hydroxidem sodným na hodnotu 9,0). Vliv detergentu jsem zkoušela v koncentracích 40, 80, 100, 120 a 150 mM. Jak se při analýzách ukázalo, tento krok nepřinesl pozitivní výsledky. Píky byly malé, nesymetrické a ani při jedné z koncentrací SDS počet píků neodpovídal počtu analytů.

### **6.1.8 Optimalizace separačního napětí**

V optimalizovaném pufru jsem zkoušela změnu separačního napětí za účelem zkrácení doby celé analýzy. Testovala jsem napětí 15 kV, 20 kV, 25 kV a 30 kV. Čas separace je nepřímo úměrný vloženému napětí. Podle očekávání se doba analýzy s rostoucím napětím zkracovala, jak je znázorněno v grafu závislosti migračního času na vloženém napětí. S rostoucím napětím se zmenšovaly plochy píků, ale zlepšoval se jejich tvar, byly užší a vyšší. Při napětí 30 kV byla tedy analýza nejrychlejší (do 6 minut), ale proud dosahoval vysokých hodnot (okolo 120  $\mu$ A). Jako optimální napětí jsem zvolila 25 kV. Proud dosahoval hodnot do 90  $\mu$ A a analýzy probíhala do 8 minut (Obr. 14).



Obrázek 14 Závislost migračních časů na separačním napětí; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C;  $\lambda = 280 \text{ nm}$

### 6.1.9 Vliv teploty

S rostoucí teplotou se zvyšuje pohyblivost iontů a analýza bývá rychlejší, oproti tomu může nižší teplota snížit šum základní linie. Systém Beckman Coulter je vybaven chlazením kapiláry chladicí kapalinou a umožňuje tak analýzy za konstantní teploty. Vyzkoušela jsem tyto teploty: 15 °C, 20 °C, 25 °C a 30 °C. Při teplotách nad 25 °C, bylo patrné negativní ovlivnění tvaru píku hesperidinu. Analýzy byly prováděny při teplotě 25 °C.

### 6.1.10 Vliv doby a tlaku při nástřiku vzorku

Jako poslední parametr jsem optimalizovala dobu a tlak při nástřiku vzorku. Testovala jsem dvě hodnoty tlaku 50 mbar a 100 mbar. Při tlaku 50 mbar jsem zkoušela doby nástřiku vzorku 6 s, 9 s a 12 s, při tlaku 100 mbar jsem testovala dobu nástřiku 6 s kvůli předdefinovanému nastavení přístroje. U všech podmínek, kromě výchozích, se změna projevila na separaci negativně, proto jsem dále používala dávkování tlakem 50 mbar po dobu 6s.

### 6.1.11 Volba vnitřního standardu

Jako vnitřní standard byly testovány tyto látky:

- kyselina sorbová
- kyselina skořicová
- methylparaben
- propylparaben
- kyselina benzoová

Jako nejvhodnější jsem vybrala kyselinu skořicovou. Látka při vybrané vlnové délce dobře absorbuje, migruje za studovanými analyty jako poslední a pík je symetrický. Ostatní standardy nevyhovovaly citlivostí nebo migračním časem.

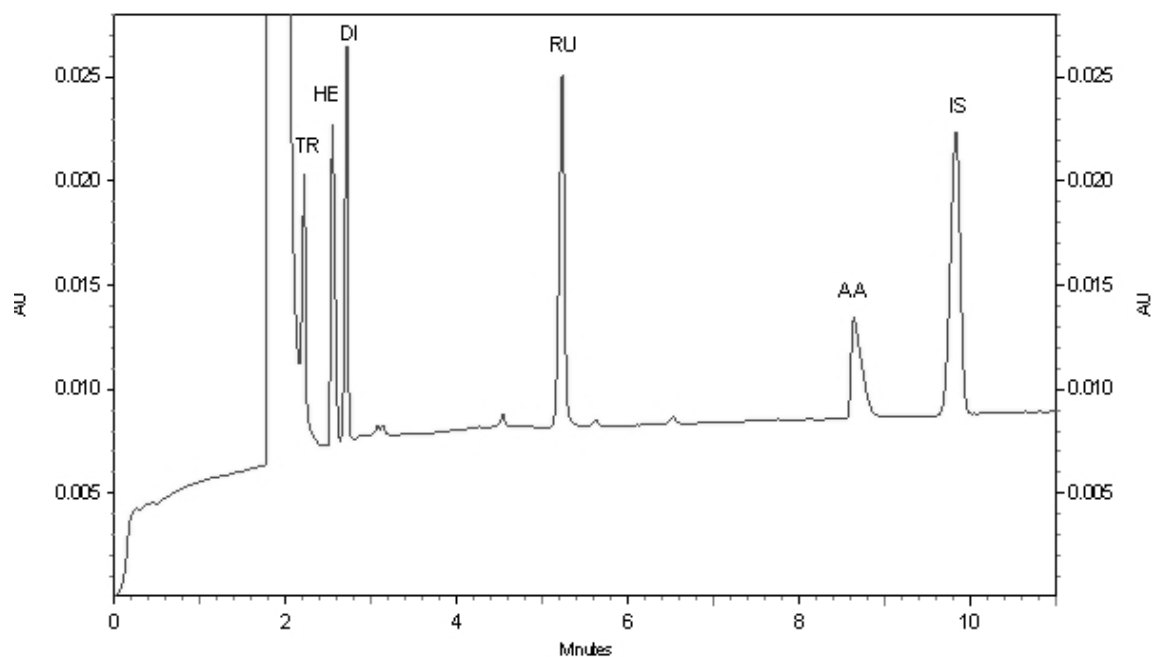
### 6.1.12 Optimální podmínky separace a složení pracovního elektrolytu

Na základě vyhodnocení všech uvedených údajů jsem zvolila podmínky, které jsou uvedeny v Tab. 4.

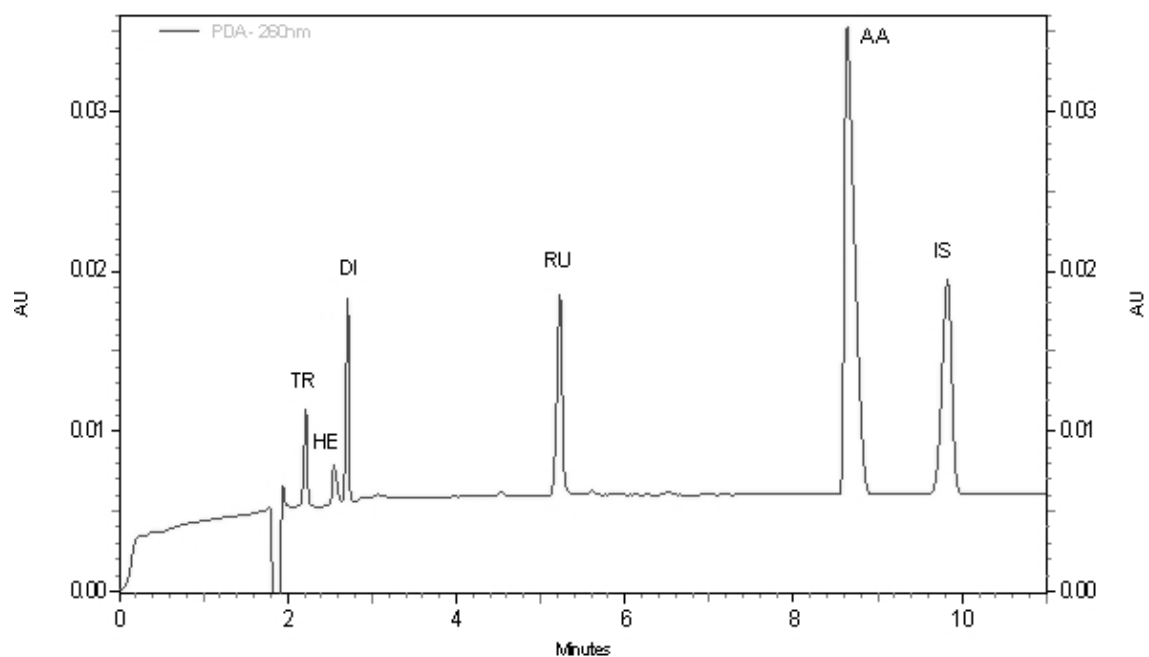
Tabulka 4 Optimální podmínky separace

BGE (tetraboritan sodný)	40 mM
Organické rozpouštědlo v BGE	25% MeOH
pH*	9,50 (upraveno kys. boritou)
Vnitřní standard	Kyselina skořicová 0,05 mg/ml
Napětí	25 kV
Teplota	25 °C
Dávkování	Hydrodynamickým tlakem 50 mbar, 6 s
Detekce	200 nm, 260 nm, <b>280 nm</b>
Kapilára	Křemenná i. d. = 50 µm, efektivní délka 21 cm, celková délka 31,2 cm

Záznamy standardů jsou uvedeny na Obr. 15 až 17.

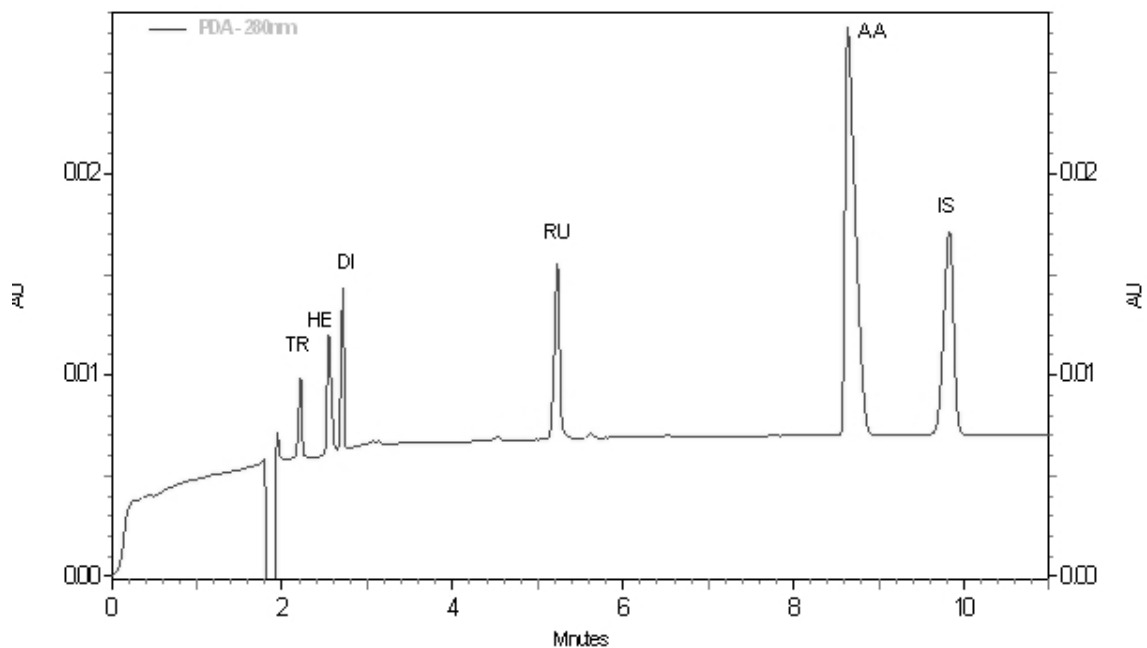


**Obrázek 15** Separace standardů při vlnové délce 200 nm; TR-troxerutin, HE-hesperidin, DI-diosmin, RU-rutin, c=0,15 mg/ml; AA-kyselina askorbová, c=0,30 mg/ml; IS-kyselina skořicová, c=0,05 mg/ml; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV



**Obrázek 16** Separace standardů při vlnové délce 260 nm. Ostatní parametry jako u Obr. 15.





Obrázek 17 Separace standardů při vlnové délce 280 nm. Ostatní parametry jako u Obr. 15.

## 6.2 Způsobnost systému

Údaje o rozlišení, asymetrii píku a počtu teoretických pater byly získány přímo pomocí softwaru Karat 32 a bylo použito hodnocení podle USP.

### 6.2.1 Rozlišení

Podle ČL odpovídá rozlišení 1,5 rozdělání píků na základní linii. Rozlišení pro všechny analyty je dostatečné a odpovídá rozdělání píků na základní linii. [43]

Výsledky jsou uvedeny v Tab. 5.

Tabulka 5 Rozlišení píků

Dvojice analytů	Rozlišení $R_s$
TR-HE	3,96
HE-DI	2,10
DI-RU	27,54
RU-AA	19,38
AA-IS	5,32

## 6.2.2 Faktor asymetrie

Data uvedená v tabulce slouží k představě o ideálnosti píku. Ideálně symetrický pík má faktor asymetrie 1. Nejvíce asymetrický je pík kyseliny askorbové, který migruje jako poslední před píkem vnitřního standardu. Nejméně asymetrické jsou píky hesperidinu, rutinu a vnitřního standardu.

Tabulka 6 Asymetrie elektroforetických píků

Analyt	Faktor asymetrie $A_s$
TR	0,83
HE	1,38
DI	0,81
RU	0,88
AA	2,08
IS	0,88

## 6.2.3 Účinnost separace

Data o počtu teoretických pater (N) byla získána podle USP s využitím přístrojového softwaru. Údaje o výškovém ekvivalentu teoretického patra (HETP) byly získány pomocí výpočtu ze strany 38. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 7. Hodnoty N se pohybují od 11560,7 do 33191. Nejvyšší hodnotu počtu teoretických pater vykazuje pík rutinu, nejnižší pak pík hesperidinu. Hodnoty HETP jsou počítány pro efektivní délku kapiláry.

Tabulka 7 Počet teoretických pater a výškový ekvivalent teoretického patra

Analyt	N	HETP
TR	15569	2,00
HE	11560,7	2,73
DI	28023,7	1,16
RU	33191	0,94
AA	21495,3	1,46
IS	32929,8	0,95

### 6.3 Kvantitativní analýza

Kalibrační závislost byla proměřena za použití optimálního pracovního elektrolytu o složení, které shrnuje Tab. 3. Jako kvantitativní parametr byl použit poměr korigované plochy píku ke korigované ploše píku vnitřního standardu. Plochy byly korigovány migračním časem. Hodnoty ploch píků byly získány programem Karat 32. Pro každou koncentraci jsem provedla tři měření. Kalibrační závislost byla hodnocena metodou lineární regrese v programu Excel.

Obecný tvar rovnice přímky:

$$y = kx + q$$

Kde je:

$y$  – korigovaná plocha píku analytu/korigovaná plocha vnitřního standardu (korigováno migračním časem)

$k$  – směrnice přímky

$x$  – koncentrace látky [mg/ml]

$q$  – absolutní člen (posunutí)

### 6.3.1 Kalibrační závislost pro troxerutin

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,35 mg/ml a 0,5 mg/ml.

#### Parametry lineární regrese:

Rovnice přímky  $y = 4,2506x - 0,0316$

$k = 4,2506 \pm 0,0508$

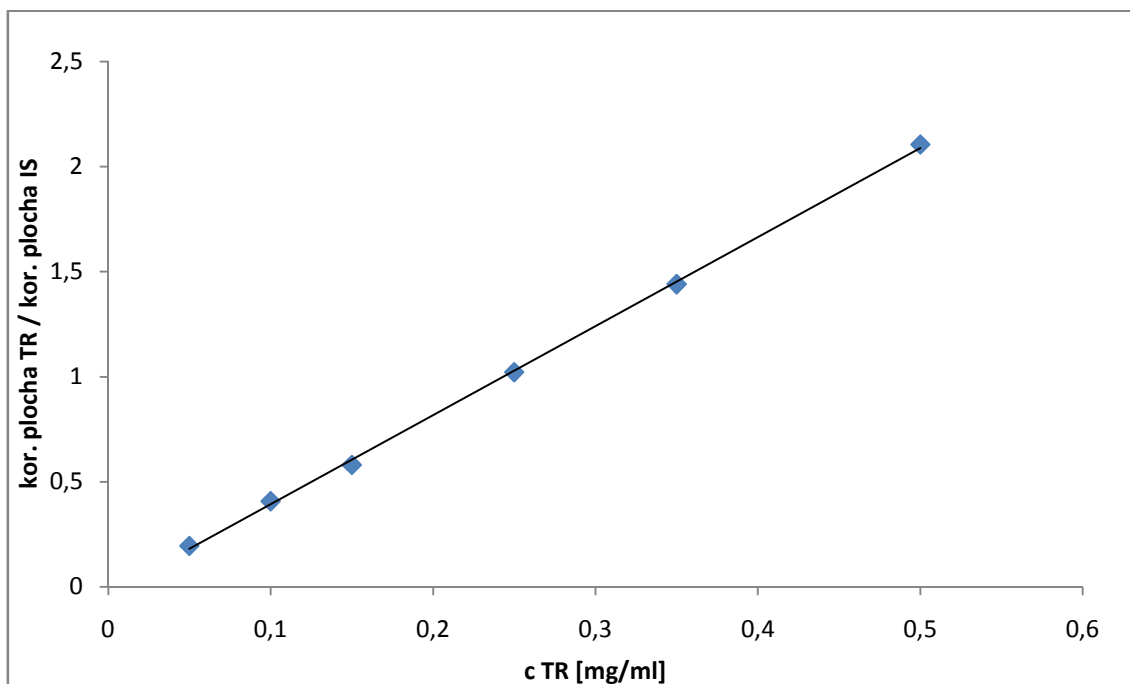
$q = -0,0316 \pm 0,0142$

korelační koeficient  $r = 0,9997$

reziduální odchylka  $s_n = 0,0192$

Počet bodů: 6

Počet stupňů volnosti: 3



Obrázek 18 Kalibrační závislost pro troxerutin; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV; 280 nm

Ve sledovaném rozmezí koncentrací troxerutinu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9997).

### 6.3.2 Kalibrační závislost pro hesperidin

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,35 mg/ml a 0,5 mg/ml.

#### Parametry lineární regrese:

Rovnice přímky  $y = 6,8836x - 0,0378$

$k = 6,8836 \pm 0,0944$

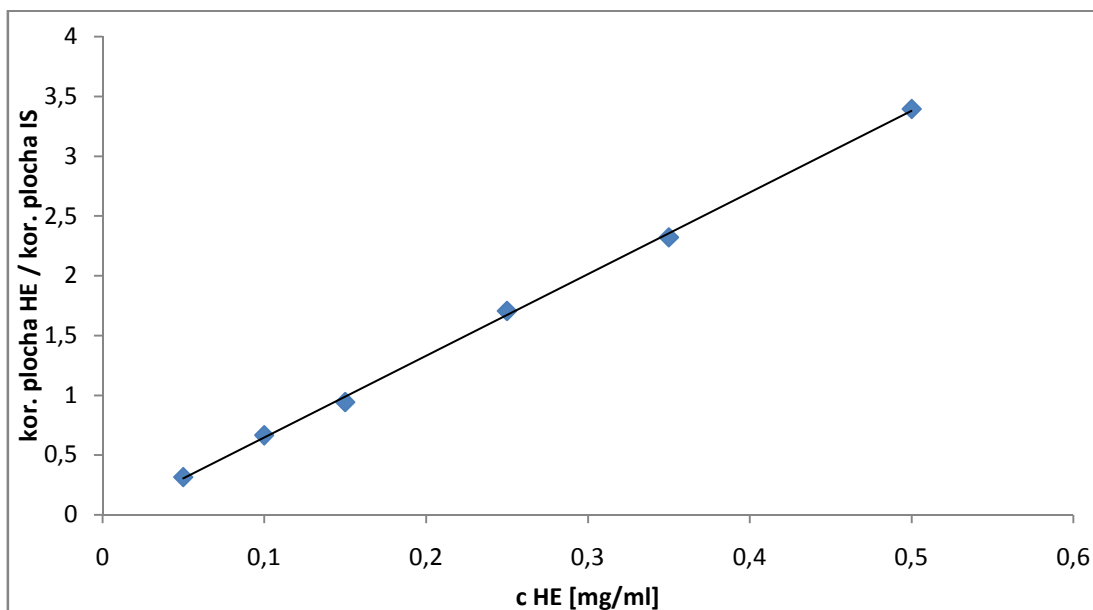
$q = -0,0378 \pm 0,0262$

korelační koeficient  $r = 0,9996$

reziduální odchylka  $s_n = 0,0355$

Počet bodů: 6

Počet stupňů volnosti: 3



Obrázek 19 Kalibrační závislost pro hesperidin; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV; 280 nm

Ve sledovaném rozmezí koncentrací hesperidinu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9996).

### 6.3.3 Kalibrační závislost pro diosmin

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,35 mg/ml a 0,5 mg/ml.

#### Parametry lineární regrese:

Rovnice přímky  $y = 5,9244x + 0,0099$

$k = 5,9244 \pm 0,0662$

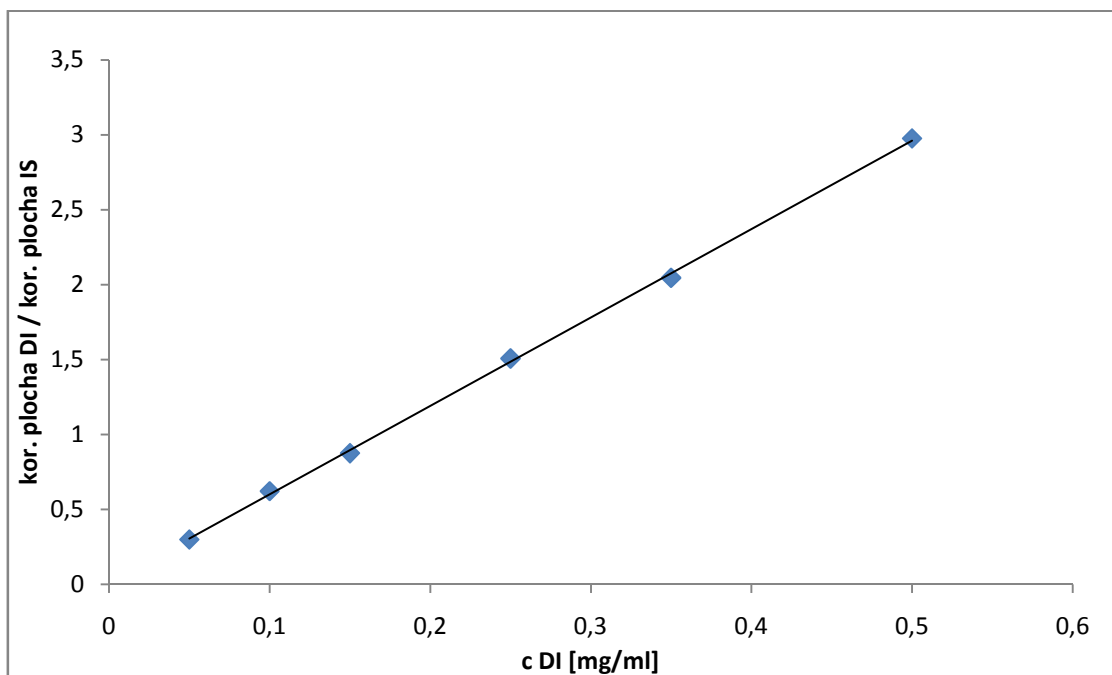
$q = 0,0099 \pm 0,0185$

korelační koeficient  $r = 0,9998$

reziduální odchylka  $s_n = 0,0250$

Počet bodů: 6

Počet stupňů volnosti: 3



Obrázek 20 Kalibrační závislost pro diosmin; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV; 280 nm

Ve sledovaném rozmezí koncentrací diosminu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9998).

### 6.3.4 Kalibrační závislost pro rutin

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,05 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,35 mg/ml a 0,5 mg/ml.

#### Parametry lineární regrese:

Rovnice přímky  $y = 6,1827x + 0,0024$

$k = 6,1827 \pm 0,0969$

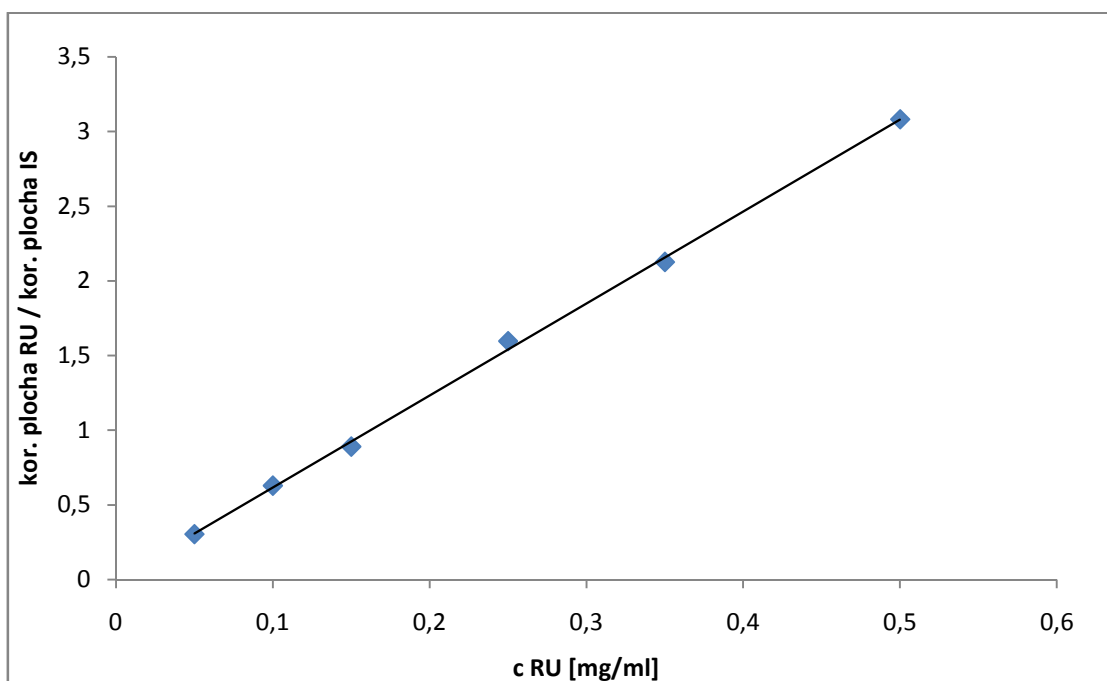
$q = 0,0024 \pm 0,0270$

korelační koeficient  $r = 0,9995$

reziduální odchylka  $s_n = 0,0365$

Počet bodů: 6

Počet stupňů volnosti: 3



Obrázek 21 Kalibrační závislost pro rutin; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV; 280 nm

Ve sledovaném rozmezí koncentrací rutinu je závislost lineární (korelační koeficient 0,9995).

### 6.3.5 Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace: 0,10 mg/ml; 0,20 mg/ml; 0,30 mg/ml; 0,50 mg/ml; 0,70 mg/ml a 1,00 mg/ml.

#### Parametry lineární regrese:

Rovnice přímky  $y = 9,6831x - 0,4375$

$k = 9,6831 \pm 0,1624$

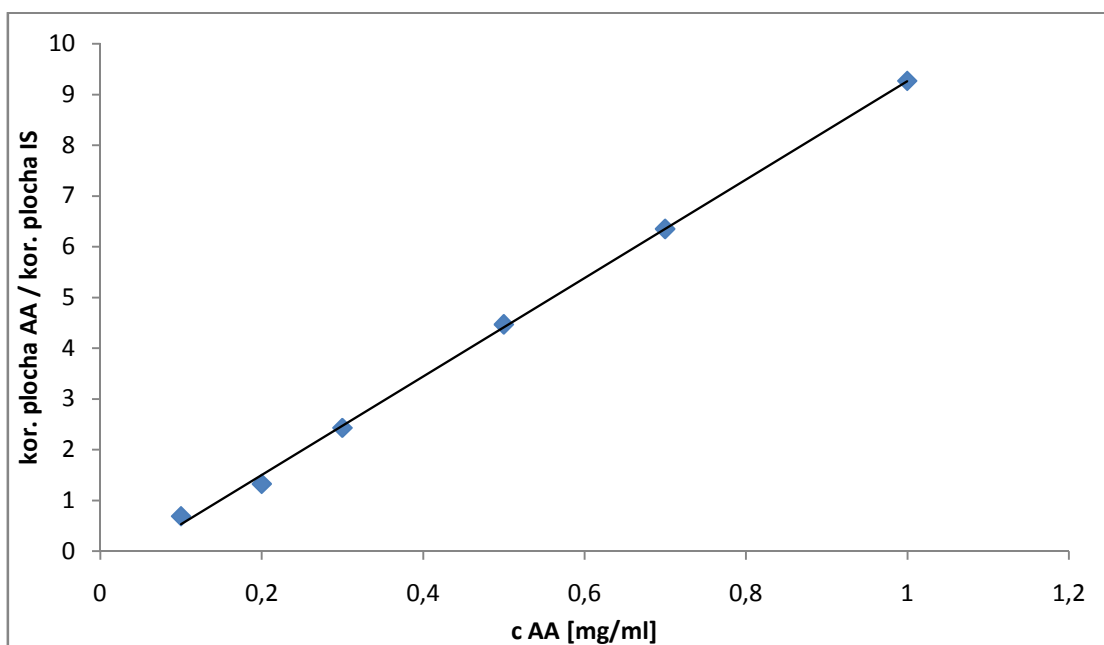
$q = -0,4375 \pm 0,0910$

korelační koeficient  $r = 0,9994$

reziduální odchylka  $s_n = 0,1231$

Počet bodů: 6

Počet stupňů volnosti: 3



Obrázek 22 Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV; 280 nm

Ve sledovaném rozmezí koncentrací kyseliny askorbové je závislost lineární (korelační koeficient 0,9994).



### 6.3.6 Limity detekce a kvantifikace

Pro výpočet limitů detekce a kvantifikace jsem použila vztahy uvedené na straně 36, založené na výpočtu z kalibrační závislosti. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 8.

**Tabulka 8** Limit detekce a kvantifikace

Analyt	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
TR	0,015	0,045
HE	0,017	0,052
DI	0,014	0,042
RU	0,019	0,059
AA	0,042	0,127

LOQ se pohybují těsně pod nejnižší kalibrační hladinou, u rutinu a kyseliny askorbové jsou mírně nad touto koncentrací. U těchto dvou analytů s relativně nejcitlivější odezvou byly limity určeny ještě metodou na základě analýzy výšky šumu v okolí píku. Došla jsem k nižším hodnotám: rutin - LOD 0,004 mg/ml, LOQ 0,01 mg/ml; kyselina askorbová - LOD 0,01 mg/ml a LOQ 0,04 mg/ml. Výsledky byly následně experimentálně ověřeny.

### 6.3.7 Opakovatelnost metody

Pro ověření opakovatelnosti migračních časů a poměru korigovaných ploch píků bylo provedeno celkem šest měření pro danou koncentraci. Směrodatná odchylka byla vypočítána podle vztahu uvedeného na straně 37. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 9 a 10.

**Tabulka 9 Opakovatelnost migračních časů**

Analyt	c [mg/ml]	Migrační čas [min]	s [min]	s <sub>r</sub> [%]
TR	0,15	2,23	0,028	1,27
HE	0,15	2,55	0,028	1,08
DI	0,15	2,71	0,027	0,99
RU	0,15	5,23	0,081	1,54
AA	0,30	8,82	0,090	1,02;

Relativní směrodatná odchylka migračních časů se pohybovala v rozmezí od 0,99 do 1,54 %. Nejvyšší hodnoty dosáhla u rutinu a nejnižší u diosminu.

**Tabulka 10 Opakovatelnost poměru korigované plochy píku analytu ke korigované ploše píku vnitřního standardu (korekce migračním časem)**

Analyt	c [mg/ml]	Kor. plocha píku / kor. plocha píku IS	s	s <sub>r</sub> [%]
TR	0,15	0,5726	0,0095	1,65
HE	0,15	0,9381	0,0067	0,72
DI	0,15	0,8684	0,0082	0,94
RU	0,15	0,8783	0,0131	1,49
AA	0,30	2,4292	0,0528	2,17

Relativní směrodatná odchylka poměru korigované plochy píku analytu ke korigované ploše vnitřního standardu se pohybovala v rozmezí od 0,72 do 2,17 %. Nejvyšší hodnoty dosáhla u kyseliny askorbové, která migrovala jako poslední a nejnižší u hesperidinu.

## 6.4 Stanovení účinných látek ve farmaceutických přípravcích

Vypracovaná metoda byla použita pro analýzu léčivých přípravků HemoStop ProBio, Ascorutin, Cilkanol, Detralex a Hemodin ProBio Forte metodou vnitřního standardu. Léčivé přípravky měly různé zastoupení analytů, v různém množství.

HemoStop ProBio obsahoval 405 mg diosminu, 45 mg hesperidinu, 20 mg rutinu a 107 mg kyseliny askorbové. Ascorutin obsahoval 20 mg rutinu a 100 mg kyseliny askorbové. Cilkanol obsahoval 300 mg troxerutinu. Detralex obsahoval 450 mg diosminu a 50 mg hesperidinu. Hemodin Prebio Forte obsahoval 225 mg diosminu, 75 mg hesperidinu, 40 mg rutinu, a 20 mg kyseliny askorbové. Obsah analytů je uveden v jedné tabletě, resp. tobolce. Pro lepší přehled je jejich obsah uveden v Tab. 11.

Tabulka 11 Obsah účinných látek v přípravcích (mg/ tabl.-tob.)

Léčivý přípravek	Troxerutin	Hesperidin	Diosmin	Rutin	Kyselina askorbová
HemoStop ProBio	-	45	405	20	107
Ascorutin	-	-	-	20	100
Cilkanol	300	-	-	-	-
Detralex	-	50	450	-	-
Hemodin Prebio Forte	-	75	225	40	20

V přípravcích, kde je přítomen diosmin, se daný flavonoid vyskytuje v řádově vyšší koncentraci než ostatní analyty. Protože rozlišení mezi všemi analyty je dostatečné, nebyla tato skutečnost na závadu. Pro stanovení obsahu diosminu v těchto přípravcích proto bylo použito dvojí ředění. Jako srovnávací roztok pro výpočet obsahu analytů ve všech přípravcích, kromě Detralexu, byl paralelně připravován roztok č. 3 z kalibrační závislosti. U Detralexu byl jako srovnávací roztok připraven roztok č. 4.

Všechny analyty absorbovaly při všech třech nastavených vlnových délkách. Při 200 nm citlivost stoupá v řadě AA – TR – HE – DI – RU, pík TR je však v oblasti, ve které absorbuje DMSO použitý při přípravě vzorku a kyselina askorbová při této vlnové délce

absorbuje relativně málo. Při vlnové délce 260 nm citlivost stoupá v řadě HE – TR – DI – RU – AA. Při této vlnové délce absorbují dobře všechny analyty kromě hesperidinu. Při 280 nm stoupá citlivost v řadě TR – HE – DI – RU – AA a všechny analyty absorbují dobře.

Analyty byly vyhodnocovány při vlnové délce 280 nm, která vyhovuje všem analytům i HE. Ostatní analyty by bylo možné stanovit i při vlnové délce 260 nm.

Měření HVLP bylo prováděno celkem šestkrát pro navážku přípravku, stejně jako pro měření roztoku standardů. Všechny látky byly stanoveny při 280 nm.

**Množství stanovovaných látek bylo vypočítáno ze vzorce:**

$$m = \frac{A_{VZ} \cdot c_{ST} \cdot Zř \cdot m_{TAB}}{A_{ST} \cdot m_{HVLP}}, \text{ kde}$$

$m$  – obsah látky v tabletě, resp. tobolce [mg]

$A_{VZ}$  – poměr korigované plochy píku analytu ke korigované ploše píku vnitřního standardu ve vzorku HVLP (korigováno migračním časem)

$A_{ST}$  – poměr korigované plochy píku analytu ke korigované ploše píku vnitřního standardu ve standardu (korigováno migračním časem)

$c_{ST}$  – koncentrace ve standardu [mg/ml]

$Zř$  – zředění

$m_{TAB}$  – průměrná hmotnost tablety, resp. obsahu tobolky [g]

$m_{HVLP}$  – navážka HVLP [g]

**% deklarovaného obsahu jsem vypočítala ze vzorce:**

$$\% = \frac{m \cdot 100}{m_{DEK}}$$

$m_{DEK}$  – je deklarovaný obsah účinné látky v tabletě, resp. tobolce [mg].

Výpočty směrodatné a relativní odchylky byly provedeny podle vzorce ze str. 37.

### 6.4.1 Správnost metody

Správnost metody byla ověřena metodou analýzy reálného vzorku s přidavkem standardních látek, protože nebylo k dispozici placebo ani jiná validovaná metoda pro stanovení sledovaných účinných látek v uvedených farmaceutických přípravcích. Správnost byla opět hodnocena pro vlnovou délku 280 nm. Toto měření bylo provedeno šestkrát.

### 6.4.2 HemoStop ProBio

#### Stanovení obsahu účinných látek

Vzorek jsem připravila tak, jak je uvedeno v experimentální části na str. 31. Teoretické koncentrace látek v měřeném roztoku vzhledem k deklarovanému obsahu analytů byly 0,20 mg/ml diosminu, 0,23 mg/ml hesperidinu, 0,10 mg/ml rutinu a 0,54 mg/ml kyseliny askorbové.

Výsledky jsou uvedeny v Tab. 12.

**Tabulka 12 Stanovení účinných látek v doplňku stravy HemoStop ProBio, tob.**

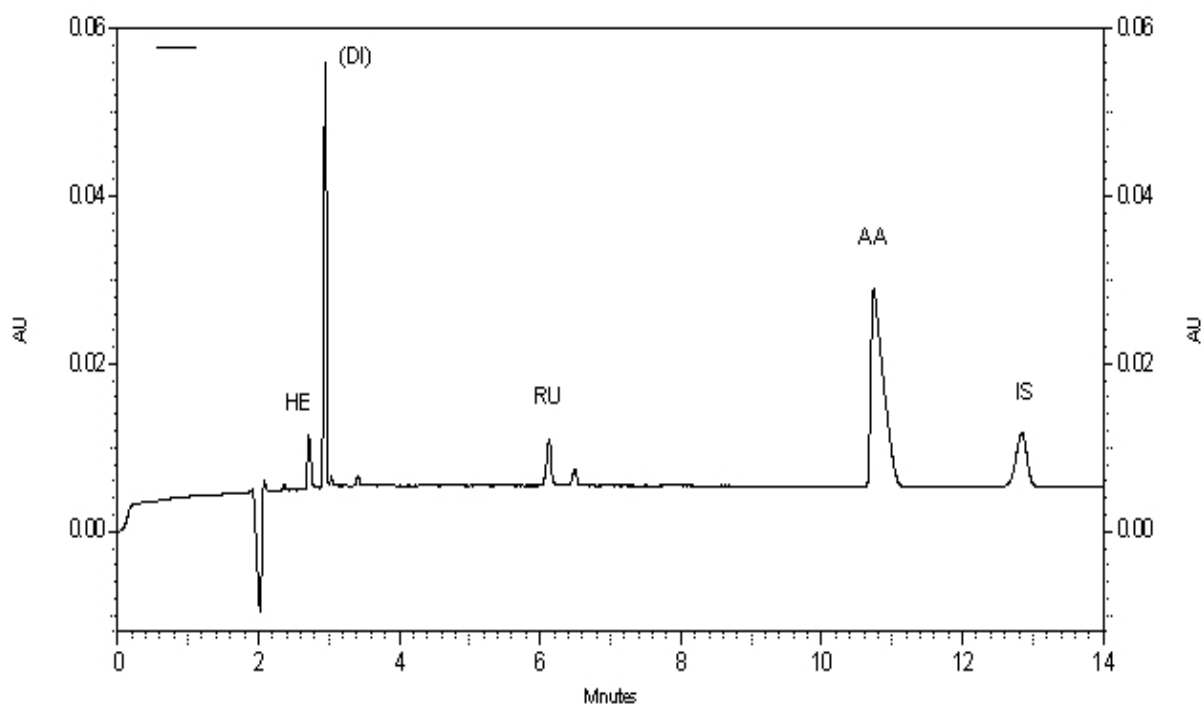
Analyt	Deklarovaný obsah [mg/tobolka]	Zjištěný obsah [%]	s	S <sub>R</sub> [%]
DI	405	98,77	0,035	3,12
HE	45	98,10	0,046	3,86
RU	20	97,77	0,006	1,01
AA	107	101,60	0,093	1,78

Zjištěný obsah analytů je v rozmezí od 97,77% do 101,60% deklarovaného obsahu výrobcem. Relativní směrodatná odchylka se pohybuje od 1,01% do 3,86%, kdy nejvyšší hodnoty dosahuje u hesperidinu.

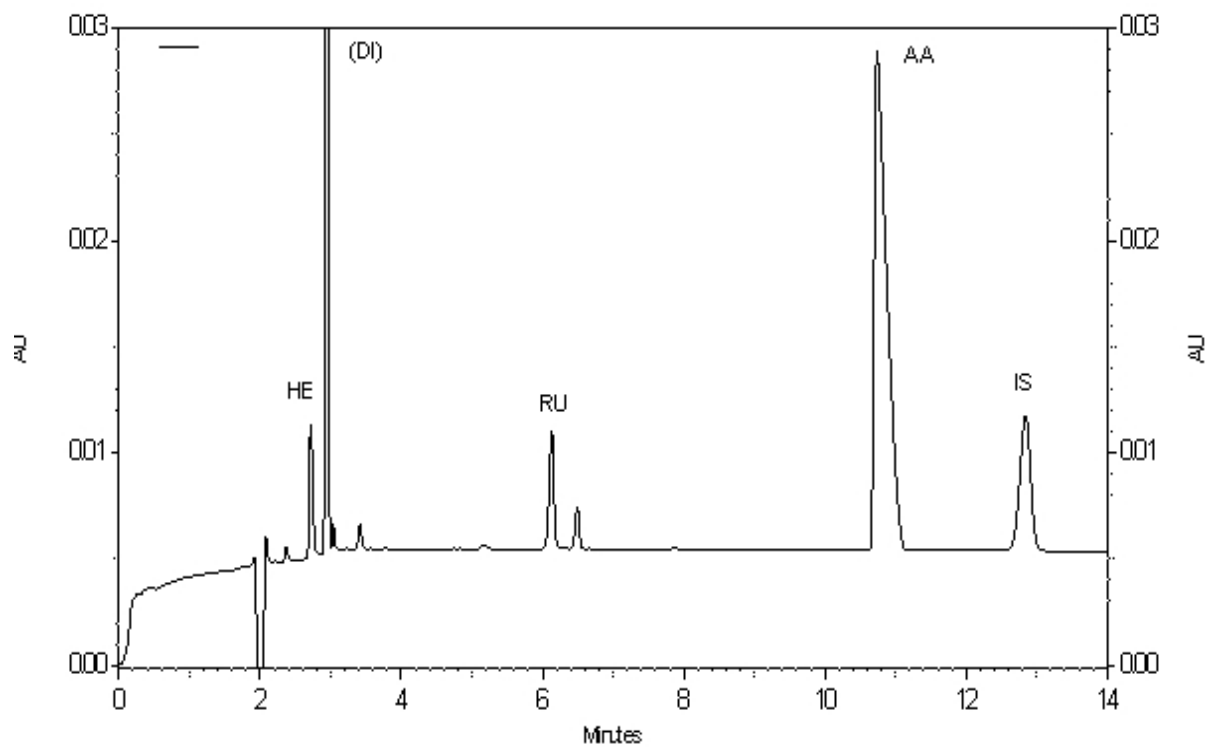
Kromě pík analytů obsahují záznamy při detekci 280 nm další pík umístěný za rutinem (~6,4 min), dále dva velmi malé píky před hesperidinem (~2,4 min) a za diosminem (~3,4 min), které nebyly identifikovány, ale které neruší CZE stanovení kvůli dostatečnému rozlišení od pík obsahových látek. Jako další látky v přípravku uvádí

výrobce inulin, stearan hořečnatý, tokoferol acetát, seleničitan sodný, želatinu a oxid titaničitý. Z uvedených sloučenin absorbuje v UV oblasti tokoferol acetát při 292 nm (rozpuštědlo etanol), ale vzhledem ke své struktuře nemigruje v CZE [45]. Tyto píky se objevují na elektroforeogramech dalších analyzovaných přípravků pouze tehdy, jestliže obsahují DI a HE. Píky jsou také patrné při zvětšení záznamu standardů.

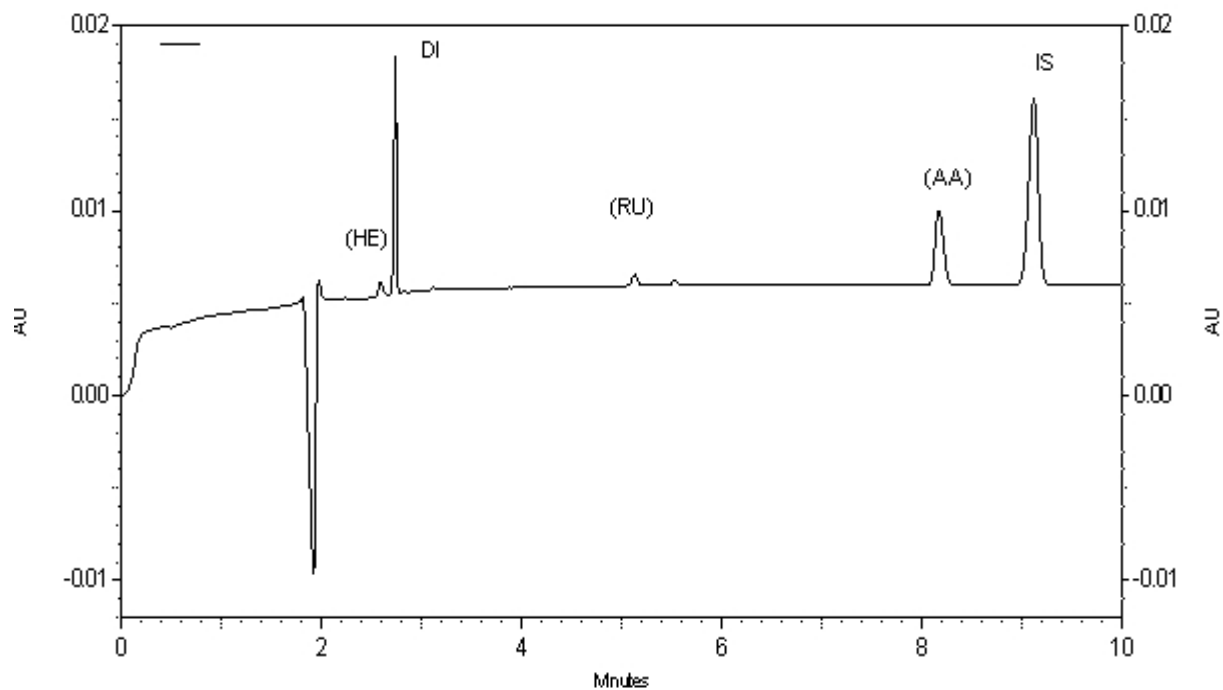
Záznamy doplňku stravy HemoStop ProBio jsou uvedeny na Obr. 23 - 25.



**Obrázek 23** Elektroforeogram přípravku HemoStop ProBio pro stanovení HE, RU a AA, 280 nm; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV



**Obrázek 24** Elektrofogram přípravku HemoStop ProBio pro stanovení HE, RU a AA, 280 nm (zvětšeno); ostatní parametry jako u Obr. 23



**Obrázek 25** Elektrofogram přípravku HemoStop ProBio pro stanovení DI, 280 nm; ostatní parametry stejné jako u Obr. 23

## Ověření správnosti metody

Vzorek byl připraven podle postupu v experimentální části na str. 33. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 13.

**Tabulka 13 Recovery – CZE analýza doplňku stravy HemoStop ProBio, tob.**

Analyt	Zjištěná koncentrace [µg/ml]	Vložená koncentrace [µg/ml]	Recovery [%]
DI	286	299	95,64
HE	313	323	96,96
RU	144	148	97,29
AA	739	765	96,59

U všech analytů byla zjištěna hodnota recovery nad 95%. Nejnižší hodnoty dosahuje u diosminu, naopak nejlepší výsledek byl získán u rutinu (97,59%).

## 6.4.3 Ascorutin

### Stanovení obsahu účinných látek

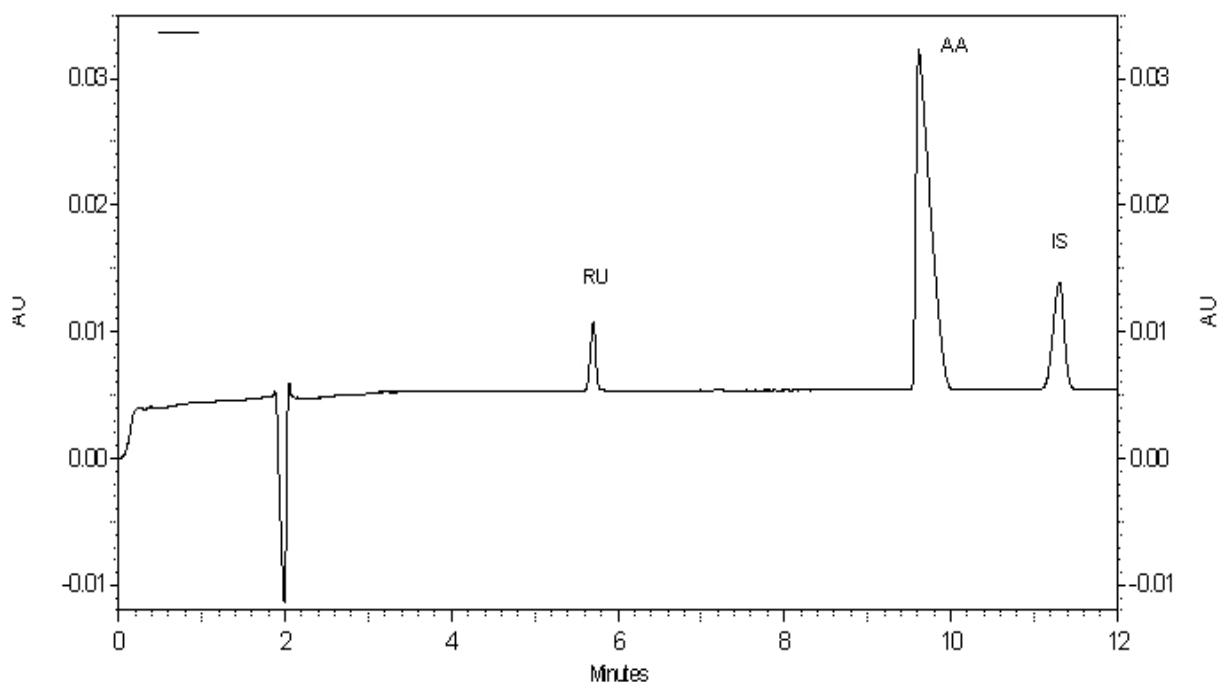
Vzorek pro stanovení obsahu účinných látek byl připraven tak, jak je uvedeno v experimentální části na str. 31. Teoretické koncentrace látek v měřeném roztoku vzhledem k deklarovanému obsahu analytů byly 0,1 mg/ml rutinu a 0,5 mg/ml kyseliny askorbové. Výsledky stanovení obsahu analytů shrnuje Tab. 14.

**Tabulka 14 Stanovení účinných látek v přípravku Ascorutin, tabl.**

Analyt	Deklarovaný obsah [mg/tab. ]	Zjištěný obsah [%]	s	s <sub>R</sub> [%]
RU	20	96,34	0,003	0,57
AA	100	98,95	0,111	2,36

Zjištěný obsah analytů odpovídá hodnotám, které udává výrobce.





**Obrázek 26** Elektroforeogram přípravku Ascorutin, 280 nm; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV

### Ověření správnosti metody

Vzorek byl připraven podle postupu na straně 33. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

**Tabulka 15** Recovery – CZE analýza přípravku Ascorutin, tabl.

Analyt	Zjištěná koncentrace [µg/ml]	Vložená koncentrace [µg/ml]	Recovery [%]
RU	149	151	98,52
AA	772	781	98,85

U obou analytů byla zjištěna hodnota recovery 98% a lze konstatovat, že CZE metoda poskytuje správné výsledky.

## 6.4.4 Cilkanol

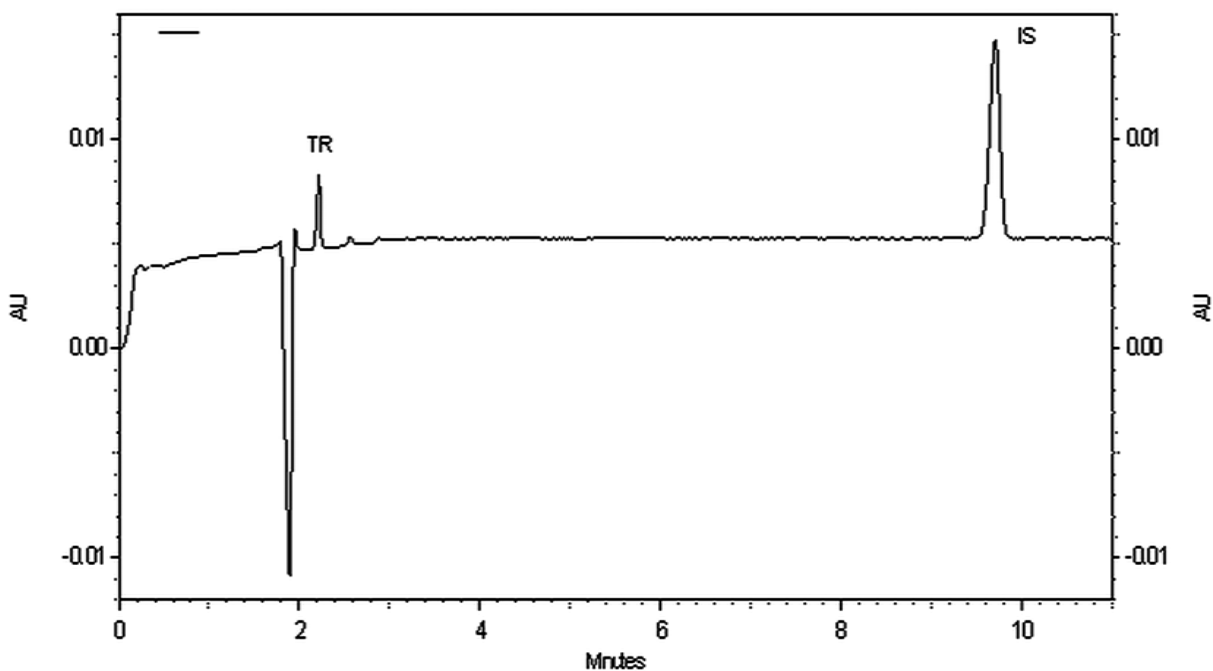
### Stanovení obsahu účinných látek

Vzorek byl připraven podle postupu uvedeného v experimentální části na straně 32. Koncentrace měřeného roztoku byla teoreticky 0,15 mg/ml.

Tabulka 16 Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Cilkanol, tob.

Analyt	Deklarovaný obsah [mg/tabl. ]	Zjištěný obsah [%]	s	S <sub>R</sub> [%]
TR	300	97,63	0,018	2,74

Obsah troxerutinu odpovídá hodnotě udané výrobcem, relativní směrodatná odchylka byla 2,74%.



Obrázek 27 Elektroforeogram přípravku Cilkanol, 280 nm; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV

### Ověření správnosti metody

Pro ověření správnosti metody byl vzorek připraven podle postupu v experimentální části na str. 34. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 17.

**Tabulka 17 Recovery – CZE analýza přípravku Cilkanol, tob.**

Analyt	Zjištěná koncentrace [µg/ml]	Vložená koncentrace [µg/ml]	Recovery [%]
TR	195	203	96,17

Hodnota recovery 96,17% udává, že vyvinutá metoda poskytuje správné výsledky.

Zde je třeba poznamenat, že Cilkanol je monokomponentní přípravek s obsahem derivátu rutinu - troxerutinu, který neobsahuje ostatní citrusové flavonoidy ani kyselinu askorbovou, které byly součástí směsi testovaných látek s antioxidačním účinkem. Zejména rutin a kyselina askorbová mají delší migrační časy a tomu odpovídá výběr IS. V konkrétním případě CZE analýzy Cilkanolu použití kyseliny skořicové jako IS prodlužuje analýzu a bylo by vhodnější použít IS s kratším migračním časem. V takovém případě by analýza trvala pod 3 min.

#### 6.4.5 Detralex

##### Stanovení obsahu účinných látek

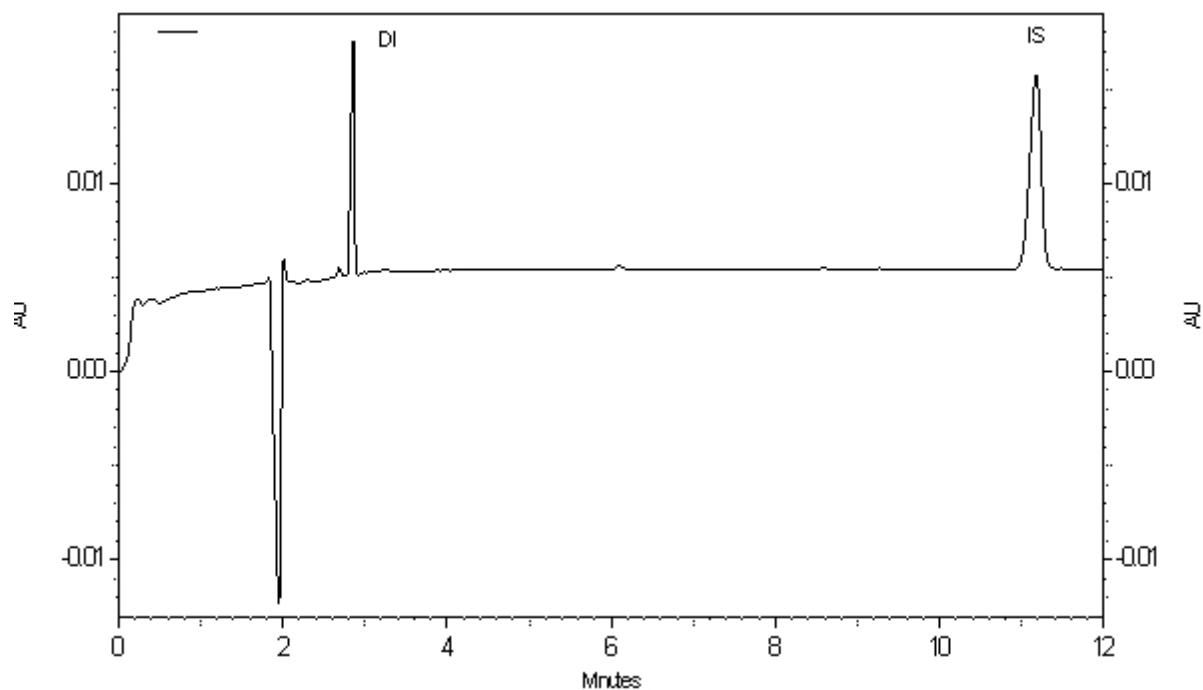
Vzorek jsem připravila tak, jak je uvedeno v experimentální části na str. 32. Teoretické koncentrace analytů v měřeném roztoku byly 0,23 mg/ml diosminu a 0,20 mg/ml hesperidinu. Zjištěné hodnoty obsahu účinných komponent jsou uvedeny v Tab. 18.

**Tabulka 18 Stanovení účinných látek v přípravku Detralex, tabl.**

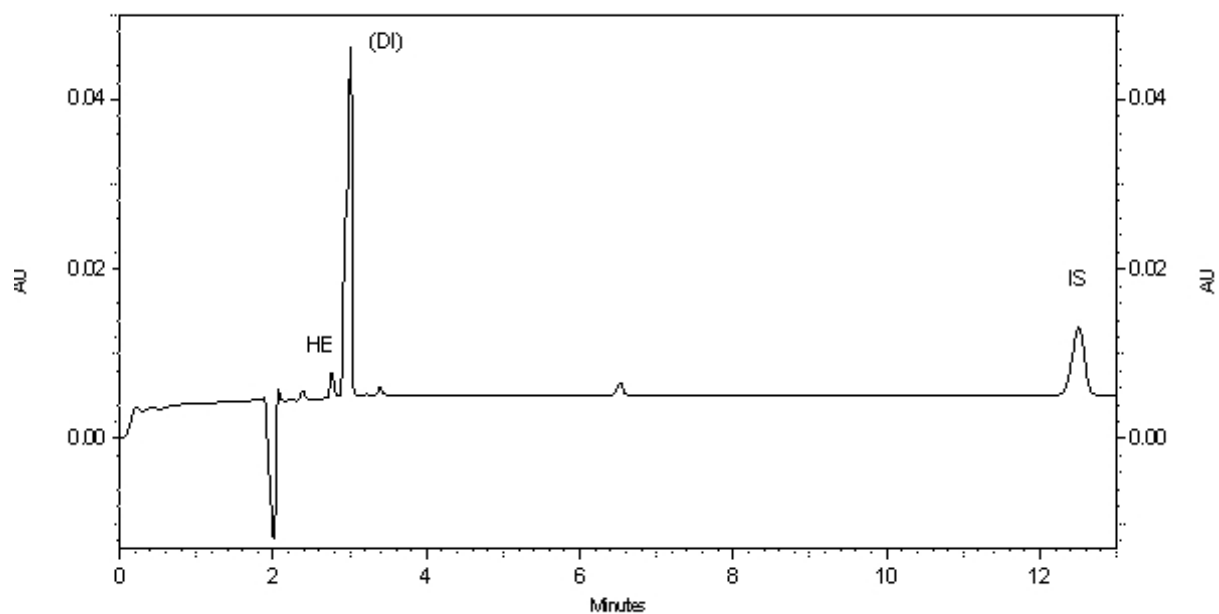
Analyt	Deklarovaný obsah [mg/tabl. ]	Zjištěný obsah [%]	s	S <sub>R</sub> [%]
DI	450	99,59	0,041	2,80
HE	50	95,79	0,004	0,81

Zjištěný obsah obou analytů odpovídá hodnotě uváděné výrobcem přípravku. Na záznamu (Obr. 28-30) se kromě píků hesperidinu a diosminu objevují další píky blíže neidentifikovaných látek, tak jak je diskutováno výše. Jako pomocné látky jsou uvedeny v přípravku Detralex glycerol, červený a žlutý oxid železitý, oxid titaničitý, magnesiumstearát, mastek aj. Podobně jako u přípravku Cilkanol také při CZE analýze tablet

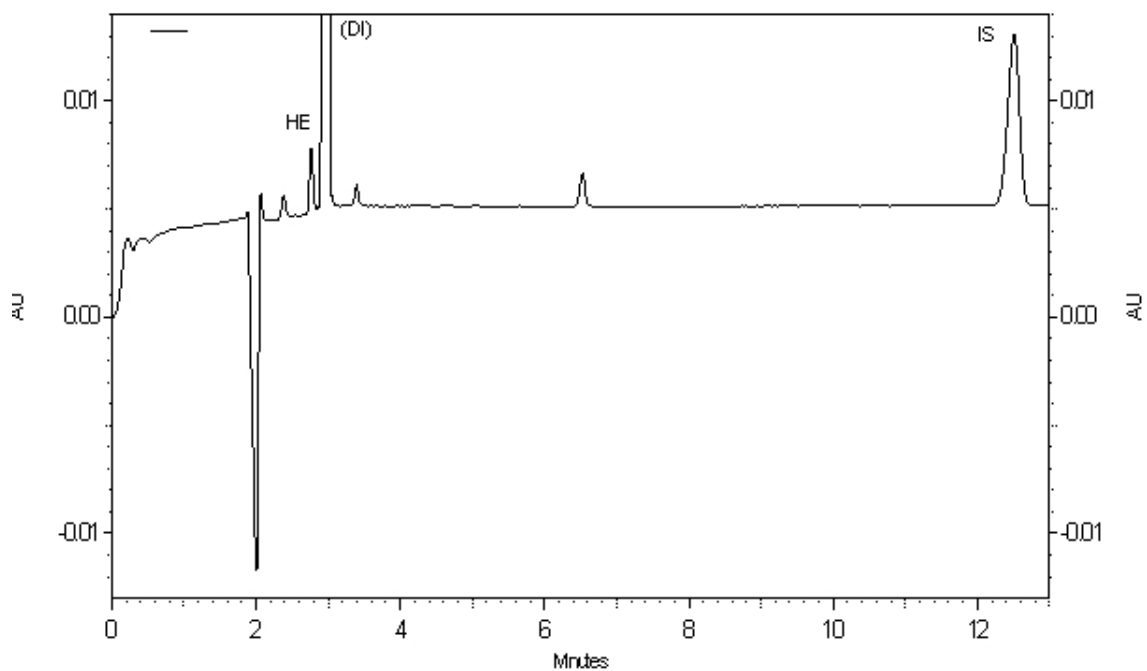
Detralexu by byl vhodnější IS s kratším migračním časem než je kyselina skořicová a doba analýzy by se zkrátila asi na 3 min.



Obrázek 28 Elektroforeogram přípravku Detralex pro stanovení DI, 280 nm; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV



Obrázek 29 Elektroforeogram přípravku Detralex pro stanovení HE, 280 nm; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV



**Obrázek 30** Elektroforeogram přípravku Detralex pro stanovení HE, 280 nm (zvětšeno); BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV

### Ověření správnosti metody

Vzorek byl připraven podle postupu na straně 34. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

**Tabulka 19** Recovery – CZE analýza přípravku Detralex, tabl.

Analyt	Zjištěná koncentrace [µg/ml]	Vložená koncentrace [µg/ml]	Recovery [%]
DI	345	361	95,50
HE	353	356	99,12

Z uvedených hodnot recovery v Tab. 19 vyplývá, že vypracovaná CZE metoda poskytuje správné výsledky.

## 6.4.6 Hemodin Prebio Forte

### Stanovení obsahu účinných látek

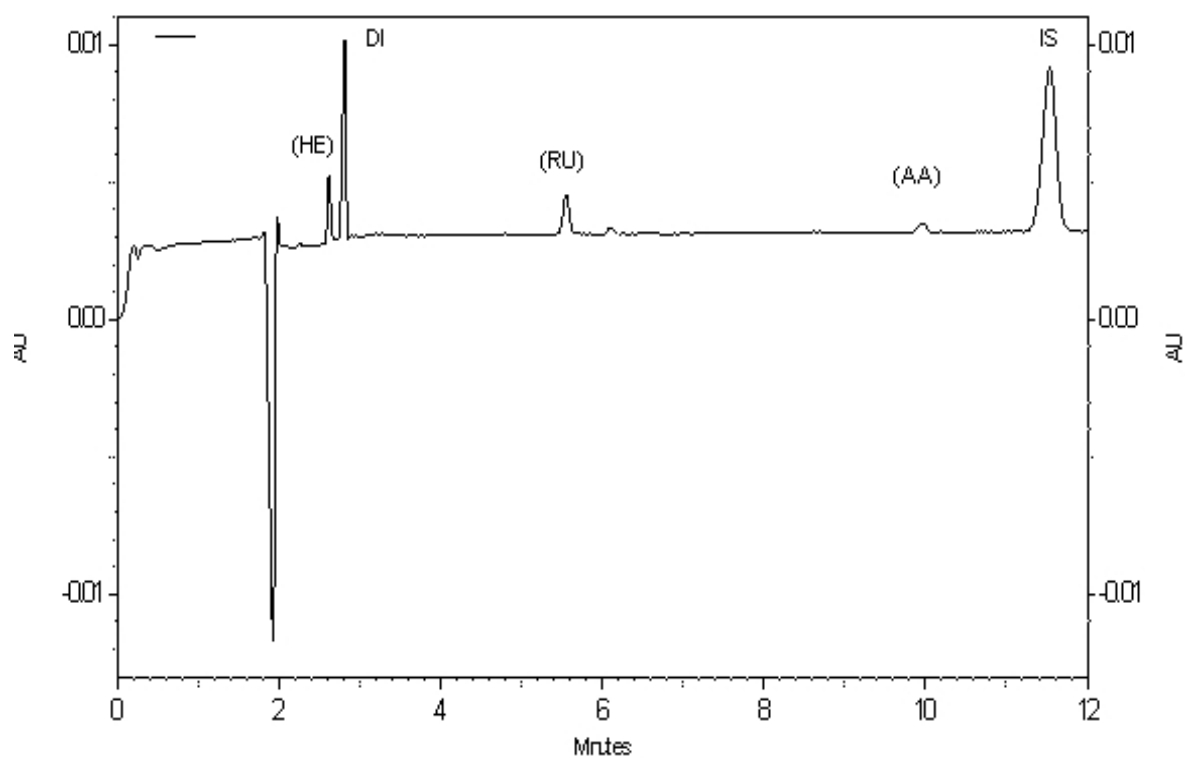
Vzorek Hemodin Prebio Forte je doplněk stravy a byl připraven podle postupu v experimentální části na straně 32. Teoretické koncentrace analytů v měřeném roztoku byly 0,23 mg/ml diosminu, 0,38 mg/ml hesperidinu, 0,2 mg/ml rutinu a 0,1 mg/ml kyseliny askorbové.

Tabulka 20 Stanovení účinných látek v přípravku Hemodin Prebio Forte, tabl.

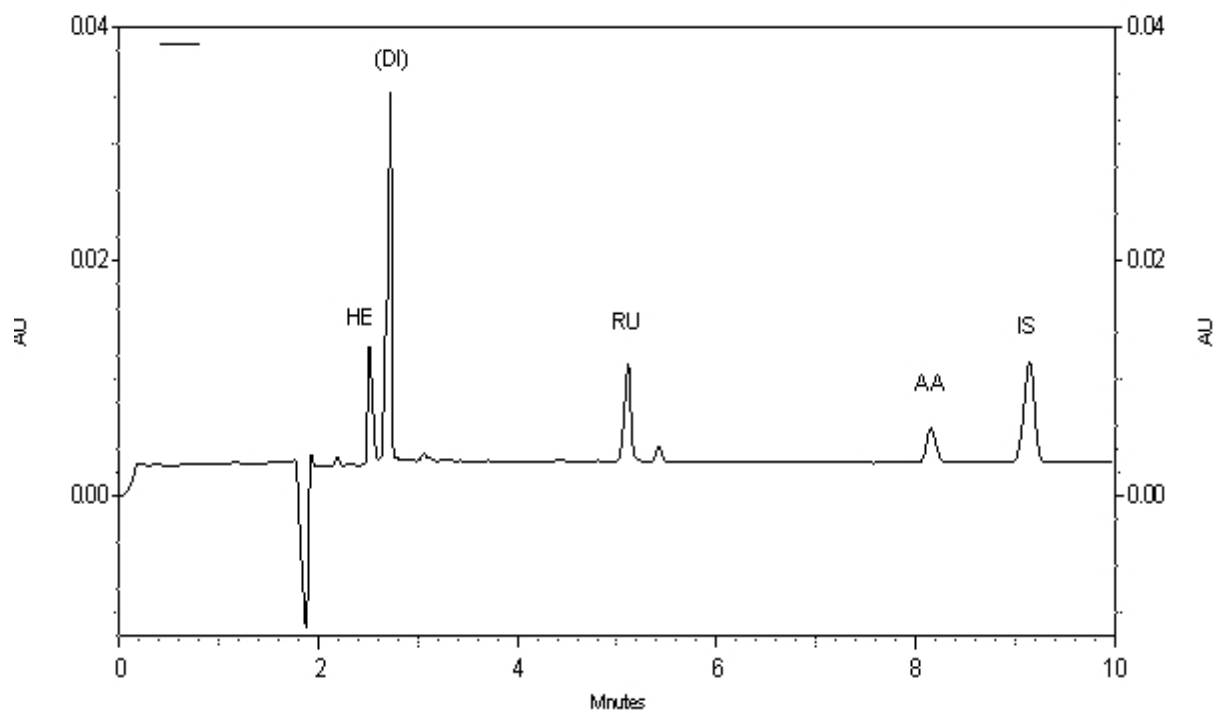
Analyt	Deklarovaný obsah [mg]	Zjištěný obsah [%]	s	s <sub>R</sub> [%]
DI	225	98,56	0,036	2,92
HE	75	97,09	0,081	4,44
RU	40	96,45	0,013	1,13
AA	20	99,71	0,013	2,32

Zjištěný obsah analytů (Tab. 20) odpovídá obsahu uvedenému výrobcem (96,45% - 99,71% deklarováného obsahu). Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí od 1,13% do 4,44%.

Kromě píků HE, DI, RU a AA se na záznamu objevují další tři píky zaznamenané při vlnové délce 280 nm, ke kterým jsem zaujala stanovisko výše v diplomové práci na str. 61 a 62. Pomocné látky v tomto doplňku stravy (talek, stearan hořečnatý, mikrokrystalická celulóza a polyvinylpyrrolidon) nemohou elektroforeticky interferovat s účinnými složkami přípravku.



**Obrázek 31** Elektroforeogram výživového doplňku Hemodin Prebio Forte pro stanovení DI, 280 nm; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV



**Obrázek 32** Elektroforeogram výživového doplňku Hemodin Prebio Forte pro stanovení HE, RU a AA, 280 nm; BGE 40 mM tetraboritan sodný, 25% MeOH, pH\* 9,5, teplota 25 °C, napětí 25 kV

## Ověření správnosti metody

Vzorek pro ověření správnosti metody byl připraven podle postupu uvedeného v experimentální části na straně 34. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 21.

**Tabulka 21 Recovery – CZE analýza doplňku stravy Hemodin Prebio Forte**

Analyt	Zjištěná koncentrace [µg/ml]	Vložená koncentrace [µg/ml]	Recovery [%]
DI	319	331	96,45
HE	407	408	99,61
RU	251	252	99,75
AA	127	129	98,13

Hodnota recovery se pohybuje v rozmezí od 96,45 do 99,75%.

V dostupné literatuře nebyla nalezena metoda, která by se zabývala současným stanovením hesperidinu, diosminu, rutinu, troxerutinu a kyseliny askorbové. V jedné ze studií [41], byla vyvinuta metoda, která umožnila stanovení hesperidinu, rutinu a kyseliny askorbové (kromě toho byly stanovovány další tři flavonoidy) v plodech a nápojích z grapefruitu.

Tato metoda byla založena na stejném principu (CZE), používala stejný druh pufru (borátový) a podobné pH (9,0), podmínky separace jsou shrnuty na straně 25. Jako první migroval hesperidin, pak rutin a jako poslední kyselina askorbová, podobně jako v této práci. Čas separace ve studii (22 min) byl ale téměř dvakrát delší než u předložené metody (11 min), a navíc poskytuje horší rozlišení mezi píky rutinu a kyseliny askorbové. V navržené práci se podařilo zkrátit trvání CZE analýzy použitím kapiláry s efektivní délkou 21 cm. Korelační koeficienty byly srovnatelné u obou metod. Publikovaná metoda s elektrochemickou detekcí byla vyvinuta pro nižší koncentrační rozmezí a dosahuje nižších limitů detekce a kvantifikace.

Jiná práce [34], se zabývala stanovením troxerutinu v léčivém přípravku. Byla založena na principu CEC s UV detekcí, separační podmínky jsou shrnuty na straně 23. Korelační koeficient kalibrační závislosti byl 0,9991 pro nepříliš široké koncentrační



rozmezí 0,2022–0,8088 mg/ml. Metoda vyvinutá ve studii [34] dosahuje nižších limitů detekce a kvantifikace (LOD 2,2 µg/ml); hodnota recovery byla vyšší (100,9%).

Jedna z prací se zabývala analýzou troxerutinu a rutinu v plazmě a moči metodou RP - HPLC s UV detekcí. [33] Podmínky separace jsou uvedeny na straně 23. Doba analýzy byla 5, resp. 6 min pro rutin, resp. troxerutin. Je srovnatelná pro rutin, ale pro troxerutin je separace výrazně pomalejší než v této práci. Metoda je výrazně citlivější (LOD 0,05 µg/ml pro TR a 0,03 µg/ml pro RU).

Shrnutí. Závěrem je možné konstatovat, že na základě dosažených výsledků byla navržena metoda CZE pro stanovení kyseliny askorbové a flavonoidů hesperidinu, diosminu, rutinu a troxerutinu ve farmaceutických přípravcích a potravních doplňcích HemoStop ProBio, Ascorutin, Cilkanol, Detralex a Hemodin Prebio Forte. Validovaná metoda poskytuje spolehlivé výsledky a může sloužit ke kontrole jakosti uvedených léčivých přípravků a potravních doplňků. U polykomponentních přípravků trvá analýza okolo 11 min, u monokomponentních pak pod 3 min.

## 7 Závěry

- Cílem této práce bylo vypracovat elektroforetickou metodu pro stanovení kyseliny askorbové a citrusových flavonoidů hesperidinu, diosminu, rutinu a troxerutinu a tuto metodu aplikovat na analýzu léčivých přípravků, resp. doplňků stravy.
- Byla provedena analýza hesperidinu (HE), diosminu (DI), rutinu (RU), troxerutinu (TR) a kyseliny askorbové (AA) pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE) s UV detekcí.
- Separace probíhala v nepotažené křemenné kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , celkové délce 31,2 cm a efektivní délce 21 cm.
- Pro separaci byl zvolen základní elektrolytový systém (BGE) připravený z tetraboritanu sodného.
- Optimální základní elektrolyt měl složení: 40 mM tetraboritan sodný, 25 % methanol, pH\* elektrolytu bylo upraveno na 9,5 pomocí 0,5M kyseliny borité.
- Optimalizací separačních podmínek bylo vybráno vkládané napětí 25 kV, dávkování vzorku probíhalo hydrodynamickým tlakem 50 mbar po dobu 6s, separace probíhala při teplotě 25°C.
- Detekce probíhala při vlnových délkách 200 nm, 260 nm a 280 nm, vyhodnocování bylo prováděno při 280 nm.
- Jako vnitřní standard pro kvantitativní analýzu byla použita kyselina skořicová o koncentraci 0,05 mg/ml.
- Byly změřeny kalibrační závislosti analytů metodou s vnitřním standardem. Kalibrační závislosti byly změřeny pro koncentrace c(HE, DI, RU, TR)

0,05 - 0,50 mg/ml a c(AA) 0,10 – 1,00 mg/ml. Korelační koeficienty:  $r = 0,9997$  (TR);  $0,9996$  (HE);  $0,9998$  (DI);  $0,9995$  (RU) a  $0,9994$  (AA).

- Jako kvantitativní parametr byla použita plocha píku korigovaná migračním časem.
- Pro ověření opakovatelnosti metody bylo provedeno šest po sobě následujících měření o koncentraci c (HE, DI, RU, TR) 0,15 mg/ml, c (AA) 0,3 mg/ml. Obsah kyseliny skořicové (IS) byl 0,05 mg/ml. Relativní směrodatná odchylka migračních časů byla v rozmezí 0,99 – 1,54 %, v případě korigovaných ploch  $s_R = 0,72 - 2,17$  %.
- Migrační čas troxerutinu byl 2,23 min, hesperidinu 2,55 min, diosminu 2,71 min, rutinu 5,23 min a 8,82 min u kyseliny askorbové. Kyselina skořicová (IS) migrovala jako poslední v čase 9,84 min.
- Bylo vypočítáno rozlišení mezi píky  $R_s$ , jeho hodnota se pohybovala v rozmezí od 2,10 do 27,54.
- Byl vypočítán faktor asymetrie jednotlivých píků  $A_s$ , jeho hodnota se pohybovala od 0,81 – 2,01.
- Byl vypočítán počet teoretických pater  $N$  a výškový ekvivalent teoretického patra HETP pro efektivní délku kapiláry. Hodnota  $N$  byla v rozmezí 11560,7 - 33191, HETP od 0,94 - 2,73.
- Vypracovaná metoda byla aplikována na stanovení hesperidinu, diosminu, rutinu a kyseliny askorbové v přípravcích HemoStop ProBio a Hemodin Prebio Forte, rutinu a kyseliny askorbové v přípravku Ascorutin, troxerutinu v přípravku Cilkanol a pro stanovení hesperidinu a diosminu v přípravku Detralex. Zjištěný obsah analytů odpovídá obsahu deklarovanému výrobcem. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí 1,01 – 3,06 % v přípravku HemoStop ProBio, 0,57 – 2,36 % v přípravku Ascorutin, 2,74 % v přípravku Cilkanol, 0,81 - 2,80 % v přípravku Detralex a 1,13 – 4,44 %

v přípravku Hemodin Prebio Forte. U polykomponentních přípravků trvá analýza okolo 11 min, u monokomponentních pod 3 min.

- Správnost metody CZE byla ověřena metodou analýzy vzorku s přidavkem standardních látek. Zjištěné hodnoty recovery byly v rozmezí 95,5 – 99,75 %.

## 8 Seznam obrázků a tabulek

### Seznam obrázků

Číslo obrázku	Název obrázku	Citace	Strana
1	Elektroforetická aparatura	[9]	15
2	Schéma CE	[7]	16
3	Vzorec hesperidinu	[19]	19
4	Vzorec diosminu	[24]	20
5	Vzorec rutinu	[27]	21
6	Vzorec troxerutinu	[30]	23
7	Vzorec kyseliny askorbové	[36]	24
8	Závislost migračních časů analytů na pH*		40
9	Závislost plochy píků na pH*		41
10	Závislost migračních časů analytů na koncentraci borátového pufru		42
11	Závislost plochy píků na koncentraci borátového pufru		42
12	Závislost migračních časů na obsahu methanolu v BGE		44
13	Závislost plochy píků na obsahu methanolu v BGE		44
14	Závislost migračních časů na separačním napětí		46
15	Separace standardů při vlnové délce 200 nm		48
16	Separace standardů při vlnové délce 260 nm		48
17	Separace standardů při vlnové délce 280 nm		49
18	Kalibrační závislost pro troxerutin		52
19	Kalibrační závislost pro hesperidin		53
20	Kalibrační závislost pro diosmin		54
21	Kalibrační závislost pro rutin		55
22	Kalibrační závislost pro kyselinu askorbovou		56
23	Elektroforeogram přípravku HemoStop ProBio pro stanovení HE, RU a AA, 280 nm		62
24	Elektroforeogram přípravku HemoStop ProBio pro stanovení HE, RU a AA, 280 nm (zvětšeno)		63
25	Elektroforeogram přípravku HemoStop ProBio pro stanovení DI, 280 nm		63
26	Elektroforeogram přípravku Ascorutin, 280 nm		65
27	Elektroforeogram přípravku Cilkanol, 280 nm		66
28	Elektroforeogram přípravku Detralex pro stanovení DI, 280 nm		68

29	Elektroforeogram přípravku Detralex pro stanovení HE, 280 nm	68
30	Elektroforeogram přípravku Detralex pro stanovení HE, 280 nm (zvětšeno)	69
31	Elektroforeogram výživového doplňku Hemodin Prebio Forte pro stanovení DI, 280 nm	71
32	Elektroforeogram výživového doplňku Hemodin Prebio Forte pro stanovení HE, RU a AA, 280 nm	71

### Seznam tabulek

Číslo tabulky	Název tabulky	Strana
1	Složení zásobních roztoků	29
2	Příprava kalibračních roztoků	30
3	Koncentrace kalibračních roztoků	30
4	Optimální podmínky separace	47
5	Rozlišení píků	49
6	Asymetrie elektroforetických píků	50
7	Počet teoretických pater a výškový ekvivalent teoretického patra	50
8	Limit detekce a kvantifikace	57
9	Opakovatelnost migračních časů	58
10	Opakovatelnost poměru korigované plochy píku analytu ke korigované ploše vnitřního standardu	58
11	Obsah účinných látek v přípravcích	59
12	Stanovení účinných látek v doplňku stravy HemoStop ProBio, tob.	61
13	Recovery – CZE analýza doplňku stravy HemoStop ProBio, tob.	64
14	Stanovení účinných látek v přípravku Ascorutin, tabl.	64
15	Recovery – CZE analýza přípravku Ascorutin, tabl.	65
16	Stanovení obsahu účinných látek v přípravku Cilkanol, tob.	66
17	Recovery – CZE analýza přípravku Cilkanol, tob.	67
18	Stanovení účinných látek v přípravku Detralex, tabl.	67
19	Recovery - CZE analýza přípravku Detralex, tabl.	69
20	Stanovení účinných látek v přípravku Hemodin ProBio Forte, tabl.	70
21	Recovery – CZE analýza doplňku stravy Hemodin ProBio Forte, tabl.	72

## 9 Použitá literatura

- [1] KAŠIČKA, V.: Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod. *Chem. Listy*. 1997, 91 (5), 321 - 325.
- [2] JABEEN, R., PAYNE, D., WIKTOROWICZ, J., MOHAMMAD, A., PETERSEN, J.: Capillary electrophoresis and the clinical laboratory. Review. *Electrophoresis*, 2006, 27, 2413 - 2438.
- [3] HONEGR, J.: *Využití elektroforetických metod v analýze látek přírodního původu*. Hradec Králové, 2007, 68 s. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na Katedře analytické chemie. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.
- [4] NOVOTNÁ, M.: *Kapilární elektroforéza v analýze bioflavonoidů a fytofarmak*. Hradec Králové, 2008, 51 s. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na Katedře analytické chemie. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.
- [5] VAŠIČKOVÁ, T.: *Analýza diosminu, hesperidinu a rutinu v potravních doplňcích metodou kapilární elektroforézy*. Hradec Králové, 2010, 82 s. Diplomová práce na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy na Katedře analytické chemie. Vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Marie Pospíšilová, CSc.
- [6] BÍLKOVÁ, K., KRÁLOVÁ, B.: *Izolace biomakromolekul*. 1. vydání. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1997, s. 142, 143. ISBN 80-7080-288-X.
- [7] KLOUDA, P.: *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, s. 9, 20, 33, 35. ISBN 80-86369-07-2.
- [8] MAJER, J., JOKL, V., SCHILLER, P., SVOBODOVÁ, D., KARLÍČEK R., KETTMAN V., PAVELČÍK, F., KOTRLÝ, S.: *Analytická chemia: Učebnica pre farmaceutické fakulty*. 1. vydání. Martin: Osveta, 1989, s. 229, 263, 264.
- [9] MIKKELSEN, S. R., CORTÓN, R.: *Bioanalytical chemistry*. 1. vydání. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2004. s. 167, ISBN 0-471-54447-7.
- [10] POUCHLÝ, J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 1. vydání. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 1998. s. 132, 133. ISBN 80-7080-331-2.

- [11] HOLME, D. J., PECK, H.: *Analytical biochemistry*. 3. vydání. Harlow: Prentice Hall, 1998, s. 144. ISBN 0 582 29438-X.
- [12] MIKKELSEN, S. R., CORTÓN, R.: *Bioanalytical chemistry*. 1. vydání. Hoboken, New Jersey: Wiley-Interscience, 2004. s. 231 - 239, ISBN 0-471-54447-7.
- [13] PECKOVÁ, K., MOCKO, V., OPEKAR, F., SWAIN, G. M., ZIMA, J., BAREK, J.: Miniaturizované ampérometrické detektory pro HPLC a kapilární zónovou elektroforézu. *Chem. Listy*. 2006, 100 (2), s. 124 - 132.
- [14] Wikipedia, antioxidanty, dostupné z:  
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Antioxidant> (citováno 16. 4. 2011)
- [15] Wikipedia, flavonoidy, dostupné z:  
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Flavonoidy> (citováno 16. 4. 2011)
- [16] SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E.: Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chem. Listy*. 2004, 98 (5), s. 239 - 245.
- [17] MATĚJKOVÁ, Š., GUT, I.: Polyfenoly v potravě jako projektivní látky v aterosklerotickém procesu. *Remedia*. 2000, 4, s. 272 - 281.
- [18] LONDÓNO- LONDÓNO, J., DE LIMA, V. R., LARA, O., GIL, A., CRECSYNSKI PASA, T. B., ARANGO, G. J., PINEDA, J., R., R.: Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chem*. 2010, 119 (1), s. 81 - 87.
- [19] Wikipedia, Hesperidin, dostupné z:  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Hesperidin> (citováno 18. 4. 2011)
- [20] SERRA, H., MENDES T., BRONZE, M. R., SIMPLÍCIO, A., L.: Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones. *Bioorg. Med. Chem*. 2008, 16 (7), s. 4009 - 4018.
- [21] ČOPÍKOVÁ, J., UHER, M., LAPČÍK, O., MORAVCOVÁ, J., DRAŠAR, P.: Přírodní barevné látky. *Chem. Listy*. 2005, 99 (11), s. 802 - 816.
- [22] BARANOWSKA, I., MAGIERA, S.: Analysis of izoflavones and flavonoids in human urine by UHPLC. *Anal. Bioanal. Chem*. 2011, 399 (9), s. 3211 - 3219.



- [23] HAMDAN, D., EL-READI, M., Z., TAHRANI, A., HERRMANN, F., KAUFMANN, D., FARRAG, N., EL-SHAZLY, A., WINK, M.: Chemical composition and biological activity of Citrus jambhiri Lush. *Food Chem.* 2011, 127 (2), s. 394 - 403.
- [24] Wikipedia, Diosmin, dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Diosmin> (citováno 19. 4. 2011)
- [25] KLIMEK, B., OLSZEWSKA, M. A., TOKAR, M.: Simultaneous determinativ of flavonoids and phenylethanoids in the flowers of *Verbascum densiflorum* and *V. phlomoides* by high-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.* 2010, 21 (2), s. 150 - 156.
- [26] EL-SHAFAE, A. M., EL-DOMIATY, M. M.: Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 26 (4), s. 539 - 545.
- [27] Wikipedia, Rutin, dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Rutin> (citováno 20. 4. 2011)
- [28] JOVANOVIĆ, S. V., STEENKEN, S., TOSIĆ, M., MARJANOVIĆ, B., SIMIĆ, M. G.: Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116 (11), s. 4846 - 4851.
- [29] PEREZ, R. G., MICKE, G. A., TAVARES, M. F. M., RODRIGUES-AMAYA, D. B.: Multivariate optimization, validation, and application of capillary electrophoresis for simultaneous determination of polyphenols and phenolic acids in Brazilian wines. *J. Sep. Sci.* 2009, 32 (21), s. 3822 - 3828.
- [30] Wikipedia, Troxerutin, dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Troxerutin> (citováno 20. 4. 2011)
- [31] China GreatVista Chemicals, dostupné z: <http://www.greatvistachemicals.com/vitamins-vitamin/troxerutin-vitamin-p4.html> (citováno 20. 4. 2011)
- [32] CUI, X. Y., ZHANG, M. L., GUAN, X., YIN, L., SUN, Y. T., FAWCETT, J. P., GU, J. K.: LC-MS-MS Determination of Troxerutin in Plasma and Its Application to a pharmacokinetic Study. *Chromatographia.* 2011, 73 (1-2), s. 165 - 169.

- [33] YANG, G. J., LIU, P., QU, X. L., XU, M. J., QU, Q. S., WANG, CH. Y., HU, X. Y., WANG, Z. Y.: The simultaneous separation and determination of six flavonoids and troxerutin in rat urine and chicken plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detection. *J. Chromatogr. B.* 2007, 856 (1-2), s. 222-228.
- [34] GUO, H. Z., WANG, L. L., BI, K. S., SUN, Y. Q.: Determination of Troxerutin in Troxerutin Tablets by Monolithic Capillary Electrochromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2005, 28 (5), s. 647 - 658.
- [35] GUO, X. L., SHUANG, S. M., WANG, X. P., DONG, C., PAN, J. H., ABOUL-ENEIN, H. Y.: Comparative study on the inclusion behavior of cyclodextrin derivatives with venoruton and rutin by thin layer chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 2004, 18 (8), s. 559 - 563.
- [36] Wikipedia, Ascorbic acid, dostupné z:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Ascorbic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Ascorbic_acid) (citováno 20. 4. 2011)
- [37] HIROKAWA, T., NISHINO, M., AOKI, N., KISO, Y., SAWAMOTO, Y., YAGI, T., AKIYAMA, J. I.: Table of isotachophoretic indices: I. Simulated quantitative indices of 287 anionic substances in the range pH 3-10. *J. Chromatogr. A.* 1983, 271 (2), s. D1 - D106.
- [38] RACEK, J., EISELT, J., FRIDECKÝ, B., HOLEČEK, V., NEKULOVÁ, M., PITTROVÁ, H., RUŠAVÝ, Z., SENFT, V., ŠAVLOVÁ, M., TĚŠÍNSKÝ, P., VERNER, M.: *Klinická biochemie*. 2. přepracované vydání. Praha: Galén, 2006, s. 144. ISBN 80-7262-324-9.
- [39] GEORGAKOPOULOS, C. D., LAMARI, F. N., KARATHANASOPOULOU, I. N., GARTAGANIS, V. S., PHARMAKAKIS, N. M., KARAMANOS, N. K.: Tear analysis of ascorbic acid, uric acid and malondialdehyde with capillary electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.* 2010, 24 (8), s. 852 - 857.
- [40] EL-HADY, D. A., GOTTI, R., EL-MAALI, N. A.: Selective determination of catechin, epicatechin and ascorbic acid in human urine using chiral capillary electrophoresis. *J. Sep. Sci.* 2008, 31 (12), s. 2252 – 2259.
- [41] WU, T., GUAN, Y. Q., YE, J. N.: Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chem.* 2007, 100 (4), s. 1573 – 1579.

- [42] ICH Topic Q2B: Validation of Analytical Procedures: Methodology. *The European agency for The Evaluation of Medicinal Products; Human Medicines Evaluation Unit*. 1996, Consensus Guideline, Step 4, s. 1 – 9.
- [43] Český lékopis 1997, kapitola 2. 2. 47 – Kapilární elektroforéza a kapitola 2. 2. 46 – Chromatografické separační metody, dostupné z: [www.lekopis.cz](http://www.lekopis.cz) (citováno 20. 4. 2011)
- [44] ŠABARTOVÁ, J.: Věštník SÚKL 1/1994, Validace analytických metod, Státní ústav pro kontrolu léčiv, Praha, 1993, s. 6.
- [45] [http://hplc1.sweb.cz/Vitamin/ch\\_vitaminE.htm](http://hplc1.sweb.cz/Vitamin/ch_vitaminE.htm)