UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

Vývoj SIC-HILIC metody pro stanovení resveratrolu v potravních doplňcích

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové 2015

Ivana Jíchová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci citovány. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. “

V Hradci Králové dne ……. ……..

Ivana Jíchová

Velmi ráda bych poděkovala Doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za jeho odborné vedení, rady, nápady a především trpělivost během vypracování této práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Ivana Jíchová

Školitel: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj SIC-HILIC metody pro stanovení resveratrolu v potravních doplňcích

V této diplomové práci byla předmětem validace a vývoj metody SIC-HILIC pro stanovení látky resveratrolu v potravních doplňcích. Stanovení probíhalo v potravních doplňcích Resveratrol RX 800, Evelor Resveratrol 50 mg a Resveratrol antiaging. Analýzy byly provedeny v chromatografickém systému s kolonou Chromolith NH_2 (MERCK), 50 x 4,6 mm a testovány byly různé kombinace složení mobilní fáze jako ACN/0,5% kys. octová, ACN/0,5% kyselina mravenčí, ACN/0,1% kyselina fosforečná. Nejvhodnější kombinace ACN/0,5% kyselina octová pak byla testována při čtyřech různých pH a provedena byla optimalizace objemu této mobilní fáze. Průtoková rychlost byla 1,0 ml/min a detekce probíhala při vlnové délce 305 nm prostřednictvím DAD detektoru při konstantní teplotě a tlaku. Měřením byl také ověřen deklarovaný obsah látky RES v přípravcích.

Klíčová slova: Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), sekvenční injekční analýza (SIA), sekvenční injekční chromatografie (SIC), resveratrol, polydatin

Abstract

Charles University in Prague
Fakulty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Analytical chemistry

Candidate: Ivana Jíchová
Supervisor: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Title of diploma thesis: SIC-HILIC methods development for the determination of resveratrol in nutraceuticals.

The subject of this diploma thesis was validation and development of SIC-HILIC method for determination of resveratrol substance in food supplements. Food supplements Resveratrol RX 800, Evelor Resveratrol 50 mg and Resveratrol antiaging were analyzed. Chromatography column Chromolith NH_2 (MERCK), 50x 4,6mm was used for separation in HILIC mode. Different combinations of composition of mobile phase, as ACN/0.5% acetic acid, ACN/0.5% formic acid, ACN/0.1% phosphoric acid, were tested. The best combination, ACN/ 0.5% acetic acid, was then tested on four levels of pH and optimization of volume of this mobile phase was performed. Flow rate of mobile phase was 1.0 ml/min, detection was performed at wavelength 305 nm with DAD detector. The separation was carried out at laboratory temperature and column pressure was constant. This measurement also confirmed the declared level of resveratrol content in analyzed food supplements available on the Czech market.

Keywords: Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC), Sequential Injection Analysis (SIA), Sequential Injection Chromatography (SIC), resveratrol, piceid

OBSAH

1. ÚVOD…….....11

2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE……12

3. TEORETICKÁ ČÁST……13

3.1 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)……...13
3.1.1 Mechanismus separace……..13
3.1.2 Stacionární fáze…….14
3.1.3 Mobilní fáze……...15
3.1.4 Instrumentace HPLC metody……15
3.1.4.1 Chromatografické kolony……...16
3.1.5 Aplikace HILIC metody……....18
3.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)……...19
3.2.1 Instrumentace SIA…….19
3.2.2 Využití SIA……20
3.3 Sekvenční injekční chromatografie (SIC)……...21
3.3.1 Instrumentace SIC……..…21
3.4 Resveratrol……..22
3.4.1 Struktura a deriváty……22
3.4.2 Vlastnosti a výskyt……..…22
3.4.3 Izolace resveratrolu……23
3.4.4 Účinky a využití resveratrolu…….23
3.4.5 Stanovení resveratrolu a polydatinu……..…24
3.4.5.1 Metody stanovení resveratrolu……24
3.4.5.2 Metody stanovení resveratrolu a polydatinu……...25
3.4.5.3 Extrakce resveratrolu a polydatinu…….25

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST……..26

4.1.1 Přístroje……..…26

4.1.2 Pomůcky……26
4.1.3 Standardy……...27
4.1.4 Chemikálie…….27
4.1.5 Analyzované potravní doplňky……..27
4.2 Příprava roztoků……..28
4.2.1 Zásobní roztoky standardů…….28
4.2.2 Zásobní roztok pro kalibraci……..28
4.2.3 Pracovní roztoky pro kalibraci……...28
4.3 Příprava vzorků……...29
4.3.1 Příprava vzorků pro stanovení obsahu……...29
4.3.2 Příprava vzorků pro přesnost…….30
4.3.3 Příprava vzorků pro správnost……...30

5. VÝSLEDKY A DISKUSE……..31

5.1 Optimalizace metody……..31
5.1.1 Optimalizace mobilní fáze pomocí HPLC…….31
5.1.2 Optimalizace programu SIC……..36
5.1.3 Optimalizace mobilní fáze pomocí metody SIC……37
5.1.4 Optimální podmínky pro analýzu a validaci metody…….42
5.2 Validace metody…….44
5.2.1 Linearita (kalibrace)……...44
5.2.1.1 Kalibrační závislost pro resveratrol……45
5.2.1.2 Kalibrační závislost pro polydatin……..45
5.2.2 Opakovatelnost……..47
5.2.3 Přesnost……..48
5.2.3.1 A1 - Resveratrol 800 RX……48
5.2.4 Výtěžnost (správnost)……49
5.2.5 Stanovení obsahu resveratrolu v potravních doplňcích…….50
5.2.5.1 Evelor resveratrol 50 mg…….…50
5.2.5.2 Resveratrol anti-aging…….52
5.2.5.3 A1 - Resveratrol 800 RX……53

6. ZÁVĚŘ…….…55

Seznam obrázků

Obr. 1: Difuzní vrstva vody na povrchu stacionární fáze

Obr. 2: Schéma kapalinového chromatografu

Obr. 3: Schéma SIA systému

Obr. 4: Schéma SIC systému

Obr. 5: Chemická struktura resveratrolu a polydatinu v obou izoformách

Obr. 6: Grafické znázornění retenčních časů v mobilní fázi ACN:0,1% kyselina fosforečná při různých poměrech ACN

Obr. 7: Grafické znázornění retenčních časů v mobilní fázi ACN:0,5% kyselina mravenčí při různých poměrech ACN

Obr. 8: Grafické znázornění retenčních časů v mobilní fázi ACN:0,5% kyselina octová při různých poměrech ACN

Obr. 9: Optimalizace 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (80/20) + 1000 µl ACN

Obr 10: Optimalizace 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (85/15) + 1000 µl ACN

Obr 11: Optimalizace 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + 1000 µl ACN

Obr 12: Optimalizace 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (90/10) + 1000 µl ACN

Obr. 13: Optimalizace objemu 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + **400** µl ACN

Obr. 14: Optimalizace objemu 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + **600** µl ACN

Obr. 15: Optimalizace objemu 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + **800** µl ACN

Obr. 16: Optimalizace objemu 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + **1200** µl ACN

Obr. 17: : Separace RES a POL za optimálních podmínek – 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + **800** µl ACN

Obr. 18: Kalibrační křivka pro resveratrol

Obr 19: Kalibrační křivka pro polydatin

Obr. 20: Kalibrace pro roztok o koncentraci 50 mg/l

Obr. 21: SIC-HLIC záznam stanovení obsahu Evelor resveratrol 50 mg

Obr. 22: SIC-HLIC záznam stanovení obsahu Resveratrol anti-aging

Obr. 23: SIC-HLIC záznam stanovení obsahu A1-Resveratrol 800 RX

Seznam tabulek

Tab. 1: Koncentrace resveratrolu v běžných druzích potravin

Tab. 2: Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Tab. 3: Testování složení mobilní fáze ACN/0,1% kyselina fosforečná

Tab. 4: Testování složení mobilní fáze ACN/0,5% kyselina mravenčí

Tab. 5: Testování složení mobilní fáze ACN/0,5% kyselina octová

Tab. 6: Vliv pH mobilní fáze na retenci RES a POL při pH=4

Tab. 7: Vliv pH mobilní fáze na retenci RES a POL při pH=5

Tab. 8: Vliv pH mobilní fáze na retenci RES a POL při pH=6

Tab. 9: Vliv pH mobilní fáze na retenci RES a POL při pH=7

Tab. 10: testování kalibračních roztoků

Tab. 11: Parametry lineární regrese pro resveratrol

Tab. 12: Parametry lineární regrese pro polydatin

Tab. 13: Opakovatelnost pracovního roztoku pro kalibraci (100 mg/l)

Tab. 14: Opakovatelnost pracovního roztoku pro kalibraci (25 mg/l)

Tab. 15: Měření přesnosti vzorku A1-Resveratrol 800 RX

Tab. 16: Parametry přesnosti vzorku A1-Resveratrol 800 RX

Tab. 17: Výsledky měření absorbance pro výtěžnost

Tab. 18: Výtěžnost stanovení ve vzorku A1-Resveratrol 800 RX

Tab. 19: Měření obsahu vzorku Evelor resveratrol 50 mg

Tab. 20: Parametry stanovení vzorku Evelor resveratrol 50 mg

Tab. 21: Měření přesnosti vzorku Resveratrol anti-aging

Tab. 22: Parametry stanovení vzorku Resveratrol anti-aging

Seznam zkratek

A	absorbance
ACN	acetonitril
A_{st}	absorbance standardu
A_{vz}	absorbance vzorku
CE	kapilární elektroforéza
FIA	průtoková injekční analýza
GC	plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MP	mobilní fáze
NP	normální fáze
OCT	kyselina octová
POL	polydatin
RES	resveratrol
RP	reverzní fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SIA	sekvenční injekční analýza
SIC	sekvenční injekční chromatografie
SP	stacionární fáze

1. ÚVOD

V diplomové práci jsme se zaměřili na analýzu doplňků stravy, kde účinnou látkou byl resveratrol, látka běžně se vyskytující v přírodě. Díky svým antioxidačním a protizánětlivým účinkům má poměrně širokou oblast využití. Pozitivní vliv byl studován u celé řady onemocnění jako jsou například diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, ale i nádorová onemocnění. Za významný lze považovat i jeho anti-aging efekt neboli jeho působení proti stárnutí.

Měření bylo založeno na separaci resveratrolu a polydatinu vhodnou metodou a optimalizaci dané metody. Pro výběr vhodné mobilní fáze byla zvolena metoda hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), což je druh chromatografie, kdy stacionární fáze je polární a mobilní fáze je tvořena zejména složkou organickou s malým obsahem vody nebo pufru. Mechanismus této metody je poměrně složitý a nebyl zcela přesně popsán. Zkoumali jsme i vliv pH mobilní fáze na separaci látek.

Pomocí metody sekvenční injekční chromatografie (SIC) jsme dále optimalizovali složení mobilní fáze. Jedná se o metodu, jejíž hlavní principy jsou založeny na sekvenční injekční analýze (SIA) a o jejíž vznik se zasloužila Katedra analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Vznikla zapojením chromatografické monolitické kolony do systému SIA, čímž si ponechala celou řadu výhod metody SIA a byla obohacena o další pozitivní vlastnosti například separace látek v přípravcích, obsahujících více účinných látek. Díky těmto vlastnostem jsme byli schopni stanovit také obsah účinných látek resveratrolu a polydatinu v našich vzorcích a porovnat ho s deklarovaným obsahem těchto látek v námi testovaných potravních doplňcích.

2. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce byla optimalizace a validace metody sekvenční injekční chromatografie (SIC) v módu hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) a následné stanovení látek resveratrolu a polydatinu v potravních doplňcích. Pomocí optimalizované metody byl resveratrol separován a bylo provedeno ověření uvedeného obsahu látky v jednotlivých potravních doplňcích.

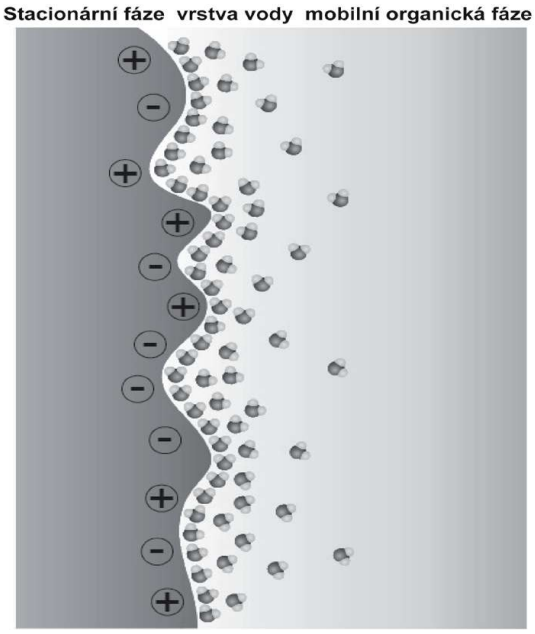
3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Označení chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC) poprvé použil Albert v roce 1990. První záznamy, s obdobným experimentálním uspořádáním, zabývající se separací sacharidů, se ale objevili již před mnoha lety. Jedná se o druh chromatografie s normálními fázemi, kde mobilní fáze obsahuje velké množství organické složky a složku hydrofilní, kterou je voda nebo pufr. Z podmínek pro HILIC vyplývá, že obsah vodné složky musí činit alespoň 2,5%. Stacionární fáze je polární. Analyzované látky se tedy separují na základě reakce s hydrofilní stacionární fází a eluce je prováděna mobilní fází obsahující vodnou složku, která představuje eluční činidlo. Pojem „hydrofilní“ vyjadřuje afinitu k vodě, která je součástí mobilních fází při HILIC separaci [1] [2].

3.1.1 Mechanismus separace

Přesný mechanismus hydrofilních interakcí doposud není zcela popsán. Předpokládá se však, že se zde uplatňuje celá řada interakcí [1]. Předpokládalo se, že stacionární fáze interaguje svými polárními skupinami s hydroxylovými skupinami analyzovaných látek [3][4]. Bylo ale zjištěno, že tato teorie se vztahuje pouze na analyty, obsahující ve své struktuře hydroxylové skupiny. Současná teorie vychází z toho, že polární skupiny stacionární fáze přitahují molekuly vody a dochází k vytvoření vodné vrstvy na povrchu stacionární fáze (SP) (Obr. 1). Analyzovaný vzorek, rozpuštěný v mobilní fázi je tedy rozdělován mezi nepohyblivou vodnou vrstvou stacionární fáze a hydrofobní mobilní fázi za účasti vodíkových vazeb, jejichž rozsah závisí na aciditě a bazicitě analytu. Čím je analyzovaná látka polárnější, tím se separace posouvá směrem k nepohyblivé vodné vrstvě a retence se zvyšuje. Uvádí se také vliv hydrofobních a iontových interakcí [5].



Obr. 1: Difuzní vrstva vody na povrchu stacionární fáze[2]

3.1.2 Stacionární fáze

Z podmínek pro HILIC vyplývá, že SP je polární. Nejčastěji používanou stacionární fází stále zůstává silikagel, přestože kolony mohou být zhotoveny také z polymerního nebo hybridního materiálu. Silikagel může být modifikován celou řadou polárních skupin například amidovou, diolovou nebo zwitteriontovou skupinou. Pro přehlednost lze podle polárních skupin SP rozdělit na 3 typy [2][11]:

Neutrální SP

Polárními skupinami těchto kolon jsou amido, kyano, diol, anebo cyklodextrinová skupina. Protože jsou neutrální, jejich náboj není ovlivňován pH mobilní fáze a nedochází tak k elektrostatickým interakcím [11].

Nabité SP

Díky svému náboji poskytují tyto SP silné elektrostatické interakce, které mají významný vliv na retenci látek a selektivitu.

Pozitivně nabité SP – pro tyto fáze je typickým představitelem silikagel modifikovaný pomocí amino skupiny. Dále sem můžeme také nově zařadit i SP modifikované imidazolovou nebo triazolovou skupinou.

Negativně nabité SP – zástupcem této fáze je poly(asparagová kyselina) nebo poly(2-sulfoethylaspartamid). Řadíme sem ale i nemodifikovaný silikagel [11].

Zwitteriontové SP

Zde dominují sulfobetainové skupiny (ZIC-HILIC), které poskytují slabé elektrostatické interakce. Jejich výhoda spočívá zejména v možnosti analyzovat jak kyselé tak bazické skupiny díky tomu, že ve své struktuře obsahují kyselou sulfonovou kyselinu a zároveň bazickou kvartérní amoniovou sůl [11].

3.1.3 Mobilní fáze

Mobilní fáze obsahuje polární organické rozpouštědlo a malé procento vody nebo pufru. Volba správné mobilní fáze, včetně parametrů, jako jsou pH mobilní fáze nebo koncentrace pufru, je rozhodující pro výslednou analýzu. Při výběru optimální mobilní fáze se řídíme pravidlem, že eluční síla organických rozpouštědel se zvyšuje s rostoucí polaritou rozpouštědla [8].

acetonitril > ethanol > methanol > voda

Nejčastěji požívaným rozpouštědlem v HILIC je bezesporu acetonitril. Obsah vody v mobilní fázi se obvykle pohybuje mezi 5-30 %. I malé zvýšení koncentrace vody vede k razantnímu poklesu retence, proto je potřeba, u látek s nízkou retencí, snížit obsah vodné složky pod 5% [5].

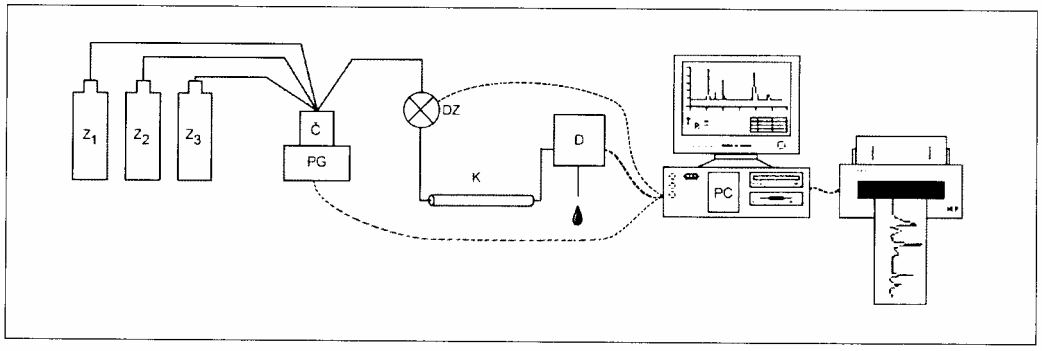
Povaha analyzovaných látek a typ SP významně ovlivňuje pH mobilní fáze. Často se k acetonitrilu, nebo jiné mobilní fázi, přidávají pufry, které pak ovlivňují samotnou retenci. Při analýze vycházíme z toho, že retence látek se snižuje s rostoucí koncentrací pufru, jako následek toho, že elektrostatické síly mezi SP a analytem se redukují. Platí, že u látek s opačným nábojem se redukují síly přitažlivé a naopak u látek se stejným nábojem se redukují síly odpudivé čili retence je zvýšena [1][9].

Velmi důležitý je ale i správný výběr rozpouštědla při přípravě vzorku. Vycházíme z toho, že by mělo být použito rozpouštědlo složením a vlastnostmi blízké mobilní fázi [10].

3.1.4 Instrumentace HPLC metody

Systém kapalinové chromatografie je tvořen několika částmi jako je zásobník mobilní fáze (Z_1, Z_2, Z_3), ten přivádí odplyněnou mobilní fázi přes filtr do čerpadla (Č). Odplynění mobilní fáze je důležité zejména z toho důvodu, aby se předešlo vzniku bublinek, které by mohli ovlivňovat detekci. Odplynění provádíme nejčastěji ultrazvukem, ale také pomocí podtlaku nebo probubláváním inertním plynem. Mobilní fáze je dále čerpána čerpadlem, které zajišťuje

konstantní průtok mobilní fáze. Optimální složení a rychlost průtoku MP pak volíme pomocí programovací jednotky (PG). Následuje dávkovací zařízení (DZ), které slouží k dávkování vzorku na kolonu (K). Kolony jsou homogenní trubice naplněné stacionární fází, kde dochází k rozdělení analyzované směsi na jednotlivé složky. Dle charakteru sorbetu máme v současné době k dispozici velké množství kolon. Dále je eluovaná látka z kolony přiváděna do diferenciálního detektoru (D), zde dochází pomocí vhodného snímače ke sledování vhodné vlastnosti vzorku a zesílený signál je přiváděn do počítače (PC) [12][13] [14].



Obr. 2: Schéma kapalinového chromatografu [12]

Z_1,Z_2,Z_3 - zásobníky mobilní fáze, **Č** - vysokotlaké čerpadlo, **PG** – programovací jednotka, **DZ** – dávkovací zařízení, **K** – chromatografická kolona, **D** – diferenciální detektor, **PC** - počítač

3.1.4.1 Chromatografické kolony

Pod pojmem chromatografická kolona rozumíme trubici nebo kapiláru, několik cm dlouhou, která je součástí chromatografického systému a kde dochází k rozdělení analyzované směsi na jednotlivé složky. Nejčastěji používaným materiálem při výrobě kolon je nerezová ocel, používají se ale i kolony zhotovené z plastu nebo skla. Plášť kolony musí splňovat určité podmínky, mezi které patří zejména schopnost odolávat vysokým tlakům a chemická inertnost. Náplň kolony je tvořená sorbentem. Jako sorbent se nejčastěji používá silikagel vlastní nebo modifikovaný. Modifikace probíhá substitucí vhodnou skupinou. Účinnost separace je tedy dána zejména kvalitou sorbetu, kdy hodnotíme hlavně velikost a stejnoměrnost částic, jejich tvar, porozitu a strukturu [12][13].

Monolitické kolony

SP lze podle charakteru sorbentu rozdělit na monolitické a konvenční SP. Monolitické kolony jsou tvořeny zpravidla jedním kusem pórovitého materiálu bez interpartikulárních prostor, narozdíl od konvenčních kolon, které jsou tvořeny jednotlivými částicemi sorbentu z vhodného materiálu a požadované velikosti. Strukturu monolitických kolon tvoří jak velké póry tzv. makropóry, tak i středně velké póry tzv. mesopóry, přičemž každá ze struktur má v systému nezastupitelnou funkci. Makropóry zrychlují konvenční tok MP a urychlují tak přenos hmoty mezi SP a MP, zatímco mesopóry jsou odpovědny za vysokou separační kapacitu kolony. Hlavní rozdíl je ale dán průchodem veškeré mobilní fáze monolitickou kolonou, což významně ovlivňuje rychlost přenosu hmoty. Využití těchto kolon je tedy hlavně tam, kde je požadována rychlá separace nebo nízký zpětný tlak. Na rozdíl od partikulárních kolon je lze použít při vyšších průtocích, kdy tlaky jsou totožné. V některých zdrojích se proto můžeme setkat s pojmem stacionární fáze čtvrté generace. Můžeme předpokládat, že se jimi bude v budoucnu zabývat řada výzkumů, díky jejich nezastupitelným vlastnostem, mezi které patří právě tolerance k vysokým průtokům a snadná příprava [15][16][17].

Na základě chemických vlastností a způsobu přípravy monolitické SP dělíme na:

- Anorganické monolity
- Makroporézní polymerní monolity
- Stlačitelné monolity (tzv. komprimované gely)

Anorganické monolity

Jsou připravovány hydrolytickou polymerací tetramethoxysilanu nebo tetraethoxysilanu ve vodném roztoku kyseliny octové za přítomnosti polyethylenglykolu. Na rozdíl od organických monolitických SP se uplatňují především při separaci malých molekul [18].

V experimentální části této diplomové práce byla použita kolona Chromolith SpeedROD NH_2 50mm x 4,6 μm, Merk. Jedná se o monolitickou kolonu právě na silikagelové bázi modifikovanou $–NH_2$ skupinou. Dalším příkladem anorganických kolon mohou být třeba kolony Onyx od firmy Phenomenex.

Makroporézní polymerní monolity

Vznikají přímo v polymerační koloně, která se naplní požadovanou směsí a proběhne polymerace za tepla. Nepolymerizované složky monolitu se odstraní promytí vhodným rozpouštědlem. Typickým příkladem jsou polymerní gely charakteru hydroxyethyl-methakrylátu, glycidyl-methakrylátu a polystyrenu [18][19].

Stlačitelné monolity (komprimované gely)

Lze připravit polymerací vodného roztoku N, N'-methylen-bisakrylamidu a kyseliny akrylové v přítomnosti anorganické soli a následného stlačení až na 10% původního objemu [20].

3.1.5 Aplikace HILIC metody

Tato metoda je vhodná zejména pro analýzu látek polárních, především aminokyselin, peptidů a sacharidů. V systémech s normálními fázemi (NP), kde stacionární fáze je polárnější než mobilní, jsou látky příliš zadržovány, zatímco v systémech s reverzními fázemi (RP), je retence těchto látek příliš nízká [2].

Výhodou je, že lze tuto metodu využít ve spojení s hmotnostní spektrometrií, kde zvyšuje odezvu při ionizaci elektrosprejem, díky vysokému obsahu ACN v mobilní fázi. Předností je rovněž i možnost použití vyššího průtoku mobilní fáze, se zachováním nižšího zpětného tlaku v soustavě (při vyšším obsahu organické složky se snižuje viskozita mobilní fáze). Přímý nástřik analyzovaného vzorku v acetonitrilu bez dalších úprav (pokud to matrice vzorku dovoluje) je bezesporu další výhodou [6][7].

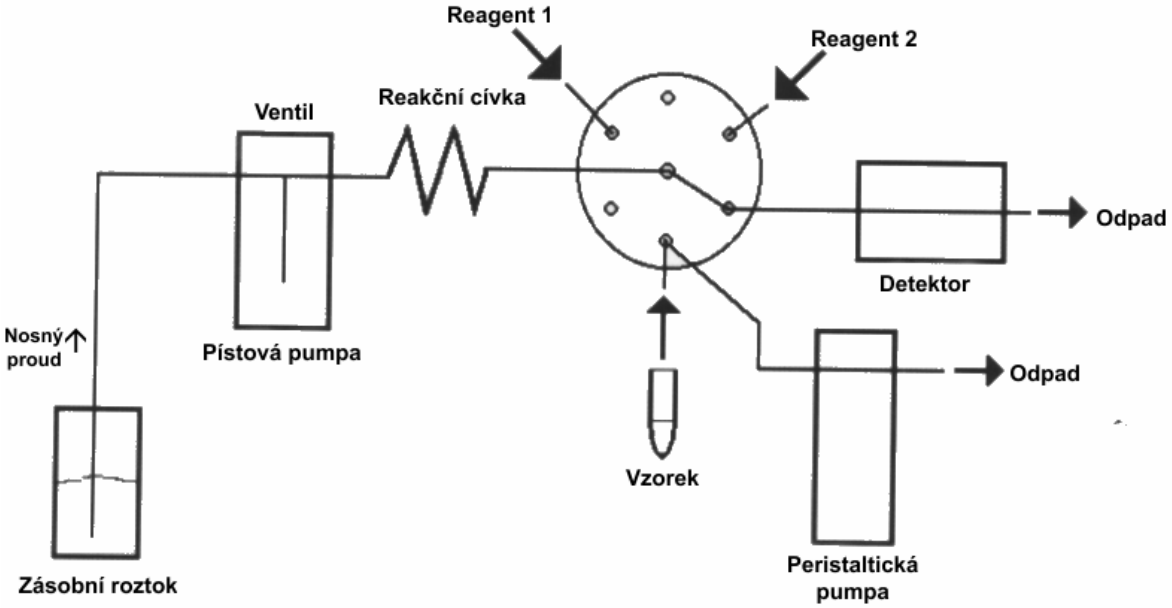
3.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis = SIA) je odvětvím analytické chemie, která spolu s průtokovou injekční analýzou (Flow Injection Analysis = FIA) patří mezi průtokové neseparační metody. Tyto metody vznikly v důsledku zvýšených nároků na citlivost, rychlost a přesnost analýz s možností snadné automatizace. S touto metodou se poprvé setkáváme v roce 1990, kdy ji poprvé popsal profesor Růžička spolu s Marshallem. Vychází z průtokové injekční analýzy s níž má shodné některé charakteristiky jako je například nesegmentovaný tok nosného proudu nebo principy kontrolované parciální disperze, navíc umožňuje další výhody, mezi které například patří snadná automatizace analýz velkého počtu vzorků. Další výhodou je bezesporu menší spotřeba vzorku a činidel a tedy též menší produkce odpadu díky pohybu nosného proudu, který není kontinuální jako u FIA. Za další přínos SIA můžeme považovat i to, že požadavky pro analýzu, týkající se aspirace, míchání a eluce, jsou voleny přes počítač a není tedy nutné do systému fyzicky zasahovat. Další významný rozdíl mezi FIA a SIA se týká nosného proudu. Ve FIA systému se nosný proud pomocí peristaltické pumpy pohybuje stále jedním směrem a je čerpán neustále, oproti SIA systému, kde jsou peristaltické pumpy nahrazeny pumpami pístovými, které jsou zodpovědné za změnu toku proudu [21][22].

3.2.1 Instrumentace SIA

Systém je tvořen jednokanálovou obousměrnou pístovou pumpou, která umožňuje aspiraci vzorku a mobilní fáze. Pístová pumpa je pak spojena s dvoucestným selekčním ventilem, který je přes mísící cívku napojen na vícecestný selekční ventil. Hlavním úkolem mísící cívky pak je zabránit vniknutí vzorku a činidel do pístové pumpy. Při pohybu pístové pumpy slouží vícecestný selekční ventil k nadávkování jednotlivých zón činidel a vzorku, a pokud je směr toku nosného proudu obrácen, jednotlivé zóny se promísí a vzniká reakční produkt. Jako další nezbytná složka SIA systému následuje vhodný detektor, kam je dále transportován reakční produkt. Mezi vícecestný selekční ventil a průtokovou celu detektoru lze ještě umístit další mísící cívku. Detektor volíme vždy podle charakteru analyzované látky, přičemž nejčastěji používané detektory pracují na principu fluorescenčním, elektrochemickém a spektrofotometrickém [21][24][25].

Schematické uspořádání SIA systému je znázorněno na obrázku 3.



Obr. 3: Schéma SIA systému [23]

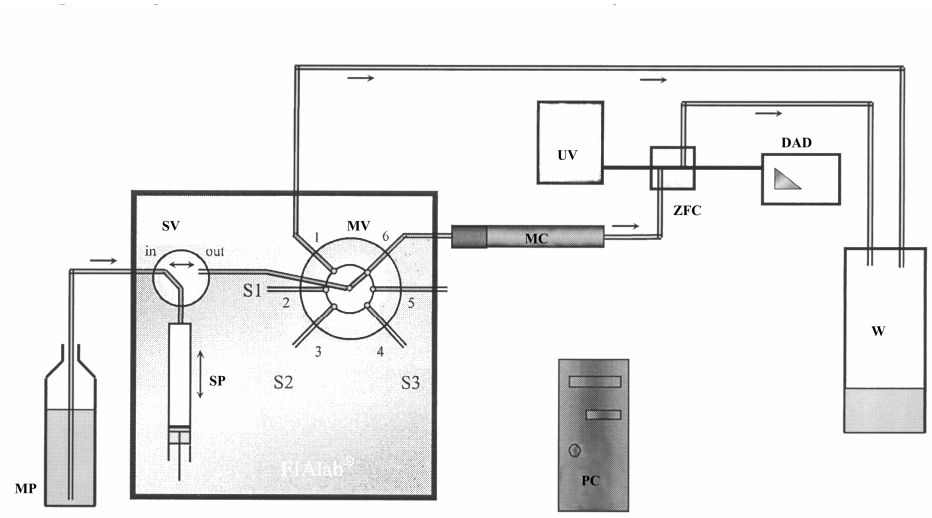
3.2.2 Využití SIA

Tato metoda nachází uplatnění především tam, kde je nutné analyzovat velké množství látek. Jako příklad lze uvést analýzu vod nebo potravin. Dále ji využíváme tam, kde je nutné sledovat změny koncentrace analyzovaných látek v průběhu nejrůznějších procesů, což je typické zejména pro monitorování hladin léčiv v tělních tekutinách, nebo ve farmaceutické oblasti při sledování disolučních a liberačních studií. Očekává se také její rozvoj v oblasti imunoanalýzy. Hlavní uplatnění ve farmacii je zejména v oblasti kontroly, kvality a účinnosti léčiv. Ve farmaceutické technologii zajišťuje stejnoměrnost obsahu účinné látky ve farmaceutických přípravcích a rychlost uvolňování z lékové formy [25].

3.3 Sekvenční injekční chromatografie (SIC)

Sekvenční injekční chromatografie (SIC) je oblastí analytické chemie, která patří spolu s dvoudimenzionální sekvenční injekční chromatografií (2D-SIC) mezi průtokové separační metody. SIC vychází ze SIA systému, kde je připojena výše zmíněná monolitická chromatografická kolona. Tento systém uspořádání byl poprvé sestrojen na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové v roce 2002, kde pracovníci na katedře analytické chemie zapojili monolitickou kolonu mezi vícecestný selekční ventil a průtokovou selekční celu. Nová metoda si ponechala výhody SIA, mezi které patří například nízká spotřeba vzorku a činidel, rychlost analýzy, a automatizace. Metoda navíc umožňuje i další benefity, jako je například možnost stanovení vícesložkových analytů, které byli doposud stanovovány pomocí metod plynové chromatografie (GC), vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo kapilární elektroforézou (CE) kde SIC-HILIC metoda nebyla doposud zatím použita[26][27][28].

3.3.1 Instrumentace SIC



Obr. 4: Schéma SIC systému [28]

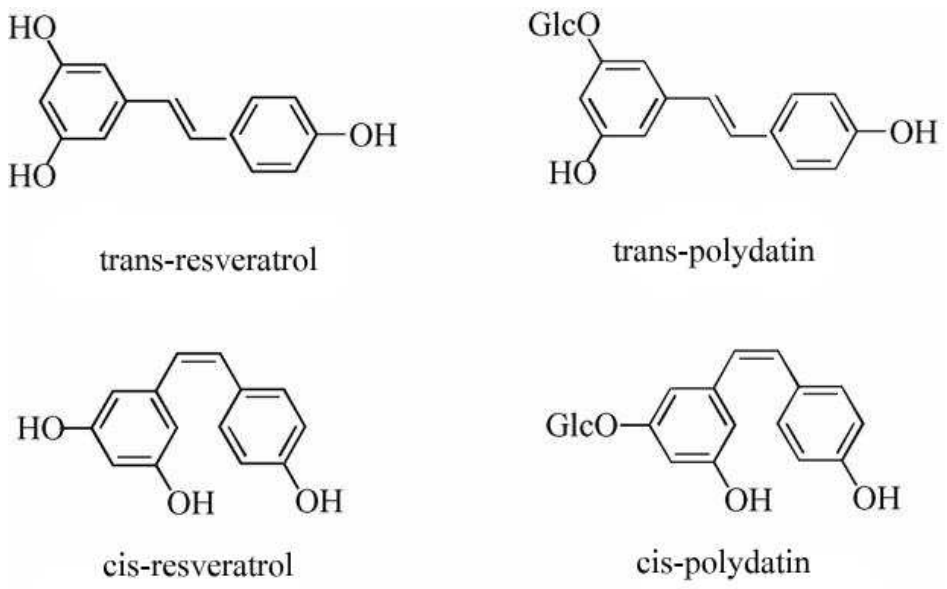
MP – mobilní fáze, **SP** – pístová pumpa, **SV** – solenoidní ventil, **MV** – 6cestný selekční ventil, **S1, S2, S3** – porty pro vzorek a standardy, **MC** – monolitická kolona, **ZFC** – průtoková cela, **DAD** – detektor, **UV**- zdroj UV, **W** – odpad, **PC** – počítač

3.4 Resveratrol

Resveratrol (RES) je látka izolovaná z některých druhů rostlin, kde plní funkci fytoalexinů (tzv. rostlinných antibiotik), což jsou látky tvořené v rostlinách jako odpověď na stres např. při napadení patogenními organismy, zářením nebo toxickou látkou. Tato látka je významná nejen pro rostliny, ale byl popsán i příznivý účinek resveratrolu na lidský organismus [29].

3.4.1 Struktura a deriváty

Resveratrol je polyfenolická sloučenina jehož systematický název je 3,5,4´-trihydroxystilben. V přírodě se vyskytuje ve dvou stereoizomerních formách a to jako cis- nebo trans-resveratrol, přičemž každá izomerní forma vykazuje různé účinky. Za stabilnější je považován trans izomer této látky a k jejich přeměně dochází vlivem ultrafialového záření. Nejznámějším derivátem resveratrolu je jeho glykosid 3-O-β-D-glukosid, jehož triviální název je polydatin [29][30].



Obr. 5: Chemická struktura resveratrolu a polydatinu v obou izoformách [30]

3.4.2 Vlastnosti a výskyt

Jedná se o pevnou a relativně lipofilní látku slabě kyselé povahy. Je rozpustný v ethanolu (50 mg/ml), ve vodě se rozpouští velmi omezeně [31].

Jak již bylo zmíněno, je produkován celou řadou rostlin, z nichž nejvýznamnější je vinná réva, dalšími typickými zástupci pak jsou např. podzemnice olejná (arašídy), moruše, ale i borůvky, brusinky nebo červená řepa. Uvádí se, že poprvé byl izolován v roce 1963 z křídlatky kopinaté (Polygonum cuspidatum) [29]. Jeho obsah v různých druzích potravin je uveden v následující tabulce č. 1.

Rostlina	Resveratrol [mg/kg suš]	Sušina [%]	Resveratrol [mg/kg]	Množství [kg] obsahující 1mg RES
Zelí čínské	9	5	0,5	2,2
Kapusta hlávková	7	14	1	1
Kapusta růžičková	15	17	2,6	0,4
Zelí červené	15	16	2,4	0,4
Zelí bílé	8	7	0,6	1,8
Brokolice	15	12	1,8	0,6
Čekanka	20	5	1	1
Petržel naťová	5	19	1	1,1
Mrkev karotka	4	10	0,4	2,5
Červená řepa	8	22	1,8	0,6
Česnek	2	29	0,6	1,7
Cibule žlutá	17	9	1,5	0,7
Cibule červená	12	9	1,1	0,9
Podzemnice olejná	2	94	1,9	0,5
Čajovník čínský	1	94	0,9	1,1

Tab. 1: Koncentrace resveratrolu v běžných druzích potravin [32]

3.4.3 Izolace resveratrolu

RES byl získáván izolací z rdesna kadeřavého (*Polygonum cuspidatum*). Získávání chemicky čistého resveratrolu z rostlinného materiálu je ale poměrně obtížné, nejen díky tomu, že je často doprovázen celou řadou látek obdobné struktury, ale také díky tomu, že jako antioxidant je citlivý na působení vzdušného kyslíku, proto v současné době dáváme přednost získávání RES syntetickou cestou. Bohužel i tato cesta má řadu nevýhod, mezi které patří zejména ty, že úplná syntéza RES je časově náročná a některé suroviny špatně dostupné [32].

3.4.4 Účinky a využití resveratrolu

Na základě mnoha studií bylo zjištěno, že RES má příznivý vliv na lidský organismus. Podle těchto studií RES ovlivňuje zejména buněčnou smrt tzv. apoptózu a proliferaci buněk, dále se uplatňuje během novotvorby cév a inhibice metastáz. Jeho působení proti toxickému vlivu

ethanolu je rovněž známo. Některé zdroje uvádějí, že působí též proti neurodegenerativním změnám [29][33].

Jako potravinové doplňky se na trh dostávají přípravky obsahující buď čistý RES nebo směs polyfenolů. Můžeme se setkat i s tím, že RES je součástí nejrůznějších vitaminových komplexů. Uváděny jsou zejména jeho antioxidační, antimutagenní a protizánětlivé účinky. Biologické účinky RES jsou neustále studovány a je považován za velmi perspektivní látku v oblasti příznivého působení na lidské zdraví [32].

3.4.5 Stanovení resveratrolu a polydatinu

V dostupné literatuře je popsána řada postupů pro stanovení resveratrolu a polydatinu. Nejčastěji byla při těchto analýzách využívána metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Jednotlivá stanovení jsou podrobněji rozepsána v následujících kapitolách.

3.4.5.1 Metody stanovení resveratrolu

V této metodě byla jako mobilní fáze použita mobilní fáze, která měla charakter roztoku 0,1 % kyseliny octové ve vodě a 0,1 % kyseliny octové v methanolu v poměru 70:30. Tato analýza probíhala za použití monolitické kolony Chromolith Performance RP-18e (100 x 4,6 mm). Detekce byla uskutečněna pomocí UV detektoru a fluorescenčního detektoru, při vlnové délce 310 nm pro UV detektor a pro fluorescenční detektor byla emisní vlnová délka 403 nm a excitační vlnová délka byla 310 nm. Celá analýza probíhala při teplotě 25° C. Průtok mobilní fáze byl 5 ml/min a eluční čas analytu tak byl 2,0 min [34].

Pro provedení separace u další metody byla mobilní fází směs 0,5 % kyseliny octové v methanolu a destilovaná voda v poměru 52:48. Použitým detektorem zde byl opět UV detektor o vlnové délce 303 nm. Analýza probíhala na koloně Hypersil C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 μm) při laboratorní teplotě. Eluce analytu dosáhla 10 min [35].

Za použití kolony Kromasil C_{18} (250 x 4,6 mm; 5 μm) probíhala též následující analýza s mobilní fází 0,5 % kyseliny octové v methanolu a destilované vody v poměru 50:50. K detekci vzorku byl opět použit UV detektor tentokrát o vlnové délce 304 nm a 286 nm. Nástřik vzorku resveratrolu byl v tomto případě 50 μl. Retenční čas byl 11 min při teplotě 30° C [36].

Následující metoda pracovala s kolonou C_{18} RP Nucleosil (250 x 4 mm; 5 μm) a mobilní fází 25% ACN s 0,1% H_3PO_4 a NaCl v demineralizované vodě. Jednalo se o isokratickou eluci o průtoku 1,0 ml/min a nástřiku 20 μl. Detekce probíhala díky UV o vlnové délce 306 nm za laboratorní teploty [37].

Kolona Waters Nova-Pack C_{18} (150 x 3,9 mm, 4 μm) byla aplikována do další metody. Mobilní fáze A byla tvořena roztokem v režimu lineárního gradientu methanolem, kyselinou octovou a vodou v poměru 10:2:88 a mobilní fázi B tvořily stejné složky tzn. methanol, kyselina octová a voda ale v poměru 90:2:8. Detekce měla dvojí charakter, byla prováděna UV detektorem a vlnové délce 280 nm a fluorescenčním detektorem, u něhož byla excitační vlnová délka 360 nm a emisní 374 nm. Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml/min a retence trvala 24 min od nástřiku vzorku o objemu 20 μl [38].

3.4.5.2 Metody stanovení resveratrolu a polydatinu

V této metodě, kde byl současně stanoven resveratrol i polydatin, se pracovalo s kolonou Agilent Zorbax SB- C_{18} (250 x 436 mm; 5 μm). Mobilní fáze byla tvořena složkou A, kterou tvořil acetonitril a složkou B, kterou tvořila voda s 0,1% kyslinou mravenčí. Průtok mobilní fáze byl 1,0 ml/min a k detekci byl použit detektor diodového pole (DAD) o vlnové délce 306 nm. Analýza probíhala při teplotě 25° C s nástřikem 10 μl testovaného vzorku. Retenční čas RES byl v tomto případě delší než u polydatinu tj. 26,4 min. Polydatin se eluoval rychleji a to v retenčním čase 14,1 min [39].

Pro následující stanovení byla vybrána monolitická kolona Chromolith Performance RP-18e (100 x 4,6 mm). Jako mobilní fáze byl zvolen roztok v režimu gradientu tvořený látkami voda:kyselina octová (94:6) a voda:acetonitril:kyselina octová (65:30:5) o průtoku 7,0 ml/min. Látka byla detekována pomocí DAD detektoru při vlnové délce 285 nm a 306 nm. Objem vzorku pro nástřik byl 20 μl. Polydatin se eluoval za 5,7 min a resveratrol za 10,2 min [40].

3.4.5.3 Extrakce resveratrolu a polydatinu

Pro tuto analýzu byla jako léková forma přípravku zvolena šumivá tableta. 20 těchto tablet bylo důkladně rozetřeno a potřebné množství vzniklé práškovité látky bylo smíseno s 25 ml směsi methanol:voda (60:40). Po protřepání byla celá směs vložena na 10 min do ultrazvukové lázně. K odstřeďování se odebral 1 ml a k analýze pak 250 μl zředěného supernatanu [41].

Pro extrakci látek bylo nejprve 10 tablet potravního doplňku, obsahujícího resveratrol a polydatin pečlivě homogenizováno a následujících 15 minut mixováno s 10 ml směsi methanol:voda (80:20). Výsledný roztok pro analýzu pak musel být přefiltrován přes PTFE filtr o velikosti pórů 0,45 μm [42].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1.1 Přístroje

HPLC systém:

Chromatograf:	Schimazdu LC-10
Pumpy :	LC-10 AD VP
Degasser:	DGU-14 A
Autosampler:	SIL-HTA
Termostat kolony:	CTO-10 AC VP
Detektor:	DAD detektor SPD-M10A VP
Kolona:	Chromolith NH_2 (MERCK), 50x 4,6 mm

Analýzy byly prováděny při teplotách 30°C. Detekce analyzovaných látek probíhala při vlnové délce 305 nm. Testovány byly 3 mobilní fáze – 0,5% kyselina octová, 0,5% kyselina mravenčí a 0,1% kyselina fosforečná. Dále byly testovány 4 možnosti složení mobilní fáze a to v poměrech 80:20, 85:15, 88:12, 90:10 ACN/0,5% kys. octová. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 1,0 ml/min.

SIC systém:

FIAlab® automatický SIA systém (FIAlab® Instruments, USA)

Software FIAlab for Windows 5.9®

UV-VIS-NIR Micropack DH-2000-CAL (Ocean Optics Inc., USA)

UV-VIS detektor 2000 –FL (Ocean Optics Inc., USA)

Optická vlákna o průměru 400 µm

Hadičky (PTFE) o průměru 0,7 mm

Mísící cívka o objemu 1,25 ml

4.1.2 Pomůcky

Analytické váhy (Sartorius analytic 2004 MP, SRN)

Digitální pH-metr PHM 220 MeterLab (Radiometer Analytical, Francie)

PTFE filtry (0,45 µm)

Pipety (BRAND)

Špičky na automatické pipety

Třecí miska s tloučkem

Ultrazvuková lázeň (Bandelin Sonorex RK 52, SRN)

Vialky 5ml

Laboratorní sklo a pomůcky běžné potřeby

4.1.3 Standardy

Resveratrol 99% (Sigma-Aldrich)

Polydatin 95% (Sigma-Aldrich)

4.1.4 Chemikálie

Acetonitril (Sigma-Aldrich)

Kyselina octová (Sigma-Aldrich)

Methanol (Sigma-Aldrich)

Ultračistá voda čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Berford)

Vnitřní standardy: p-nitrofenol

3-nitrofenol

Nitrobenzen

p-aminobenzoová kyselina

p-nitroanilin

1-nitroso-2-naftol

Meta-nitrobenzoová kyselina

4.1.5 Analyzované potravní doplňky

A1 Resveratrol 800 RX (složení: 80mg v jedné tabletě)

výrobce A1 Pharma s. r. o.

Evelor Resveratrol 50mg (složení: 50mg v jedné tobolce)

výrobce Medochemie

Resveratrol antiaging (složení: 50mg v jedné kapsli)

výrobce TheraTech

4.2 Příprava roztoků

4.2.1 Zásobní roztoky standardů

Z navážky resveratrolu byl připraven zásobní roztok o koncentraci 4920 mg/l rozpuštěním 49,20 mg RES v methanolu a doplněním po rysku v 10 ml odměrné baňce. Z navážky polydatinu byl připraven zásobní roztok o koncentraci 5000 mg/l rozpuštěním 50,00 POL mg v methanolu a doplněním po rysku v 10ml odměrné baňce. Zásobní roztoky byly skladovány při teplotě 4°C.

4.2.2 Zásobní roztok pro kalibraci

5,10 ml zásobního roztoku standardu RES bylo smíseno s 5,00 ml zásobního roztoku standardu POL v odměrné 25ml baňce a doplněno acetonitrilem po rysku. Roztok byl skladován při teplotě 4°C.

4.2.3 Pracovní roztoky pro kalibraci

Bylo připraveno 9 pracovních roztoků pro kalibraci v rozmezí koncentrací 5-200 mg/l a to smísením zásobního roztoku pro kalibraci viz 4.2.2 s ACN v různých poměrech uvedených v tabulce.

KONCENTRACE (mg/l)	**OBJEM ZÁS. ROZTOKU (µl) c=1000 mg/l**	**OBJEM ACN (µl)**
5	5	995
10	10	990
15	15	985
25	25	975
50	50	950
75	75	925
100	100	900
150	150	850
200	200	800

Tab. 2: Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Příprava vzorků pro stanovení obsahu

A1-Resveratrol 800 RX

Pět tablet tohoto přípravku bylo zváženo a byla stanovena jejich hmotnost 2,0146 g. Z jejich hmotnosti pak byla odvozena průměrná hmotnost jedné tablety 0.40292 g. Následně proběhlo rozdrcení a homogenizace tablet ve třecí misce. Na přípravu jednoho vzorku byla použita navážka asi jedné čtvrtiny tablety tj. 0,10073 g. Navážka 0,1 g vzorku byla methanolem doplněna po rysku do 25 ml odměrné baňky. Takto připravený roztok byl na 15 minut umístěn do ultrazvukové lázně a poté přefiltrován přes membránový filtr (0,45μm). Do vialky pak bylo pipetou odebráno 100 μl tohoto roztoku a přidáno 900 μl acetonitrilu. Tímto způsobem byly připraveny k analýze 3 vzorky.

Evelor resveratrol 50mg

Tato příprava probíhala obdobně. Zváženo bylo 5 tobolek tohoto přípravku o výsledné hmotnosti 1,5137 g. Průměrná hmotnost jedné tobolky tedy byla 0,30274 g. Po rozdrcení a homogenizaci tobolky byla na přípravu jednoho vzorku použita její jedna polovina tj. 0,15137 g. Navážka 0,15 g vzorku byla doplněna po rysku methanolem v 25 ml odměrné baňce a odměrná baňka s tímto roztokem byla umístěna na 15 minut na ultrazvukovou lázeň a poté přefiltrována přes membránový filtr (0,45 μm). Do vialky pak byla odebráno 100 μl tohoto roztoku a přidáno 900 μl acetonitrilu. Takto byly připraveny tři vzorky.

Resveratrol anti-aging

Zvážením byla zjištěna hmotnost 5 tobolek tohoto přípravku 1,3073 g, ze které byla odvozena průměrná hmotnost jedné tobolky tj. 0,26146 g. Tobolka byla rozdrcena a homogenizována a na přípravu jednoho vzorku byla použita její jedna polovina tj. 0,13073 g. Navážka 0,13 g vzorku byla doplněna po rysku methanolem v 25 ml odměrné baňce. Takto připravený roztok byl na 15 minut vložen do ultrazvukové lázně a poté přefiltrován pomocí membránového filtru (0,45 μm). 100 μl tohoto roztoku pak bylo nepipetováno do vialky a přidáno 900 μl acetonitrilu. Připraveny byly tři vzorky.

4.3.2 Příprava vzorků pro přesnost

Parametr přesnosti metody byl stanoven opakovanou analýzou vzorků (n=6) potravního doplňku A1-Resveratrol 800 RX. Pět tablet tohoto přípravku bylo zváženo a následně proběhlo rozdrcení a homogenizace tablet ve třecí misce. Na přípravu jednoho vzorku byla použita navážka asi jedné čtvrtiny tablety tj. 0,10073 g. Navážka 0,1 g vzorku byla methanolem doplněna po rysku do 25 ml odměrné baňky. Takto připravený roztok byl na 15 minut umístěn do ultrazvukové lázně a poté přefiltrován přes membránový filtr (0,45μm). Do vialky pak bylo pipetou odebráno 100 μl tohoto roztoku a přidáno 900 μl acetonitrilu. Tímto způsobem bylo připraveno a analyzováno 6 vzorků, u kterých byla vyhodnocena RSD výsledků jejich stanovení.

4.3.3 Příprava vzorků pro správnost

Parametr správnosti metody byl stanoven opakovanou analýzou vzorků (n=6) potravního doplňku A1-Resveratrol 800 RX s přídavkem standardu resveratrolu a polydatinu. 5 tablet bylo rozdrceno v třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku bylo použito 2,5 mg navážených do 10 ml odměrné baňky (očekávaná koncentrace RES v přípravku c = 50 mg/l a POL c = 0 mg/l)). Ke vzorku bylo přidáno 500 μl zásobního roztoku standardu o koncentraci obou látek c = 1000 mg/l (viz. kapitola 4.2.2 Zásobní roztok pro kalibraci). Odměrná baňka pak byla doplněna ACN po rysku a umístěna na ultrazvukovou lázeň po dobu 15 minut. Posledním krokem byla filtrace roztoku přes membránový filtr 0,45 μm do vialky.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Optimalizace metody

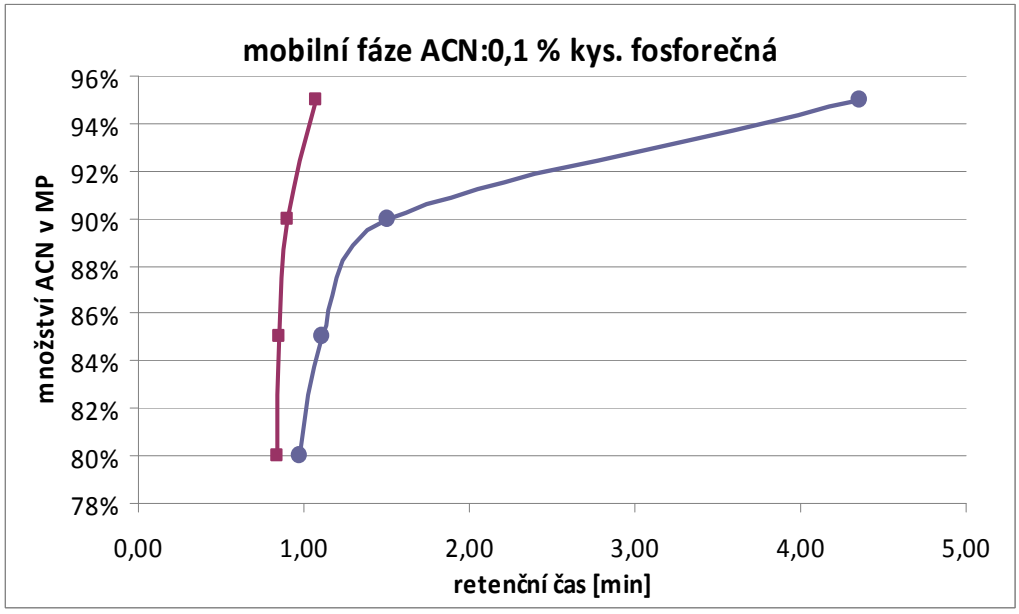
Cílem bylo najít vhodné podmínky pro současné stanovení a separaci RES a POL v potravních doplňcích. Pomocí HPLC metody byla testována vhodná mobilní fáze pro separaci těchto látek na HILIC koloně Chromolith NH_2 50 x 4,6 mm. Výsledná mobilní fáze pak byla testována při různém pH. Požadováno bylo, aby byla dosažena co nejkratší doba eluce analytů a dostatečné rozlišení jednotlivých píků RES a POL na chromatogramu.

5.1.1 Optimalizace mobilní fáze pomocí HPLC

Testován byl ACN v kombinaci se třemi kyselinami a to 0,1% kyselinou fosforečnou, 0,5 % kyselinou mravenčí, 0,5 % kyselinou octovou v různých poměrech. Výsledky měření retenčních časů jsou znázorněny v následujících tabulkách. Pozn.: kvůli větší přehlednosti závislosti retencí nejsou do grafů záměrně vneseny data vysokých retenčních časů.

Kolona	Chromolith NH_2		
Mobilní fáze		Retenční čas (min)	
ACN	0,1% fosf	Polydatin	Resveratrol
80%	20%	0,98	0,84
85%	15%	1,11	0,85
90%	10%	1,51	0,90
95%	5%	4,36	1,07
97%	3%	14,1	1,32
99%	1%	140	2,30

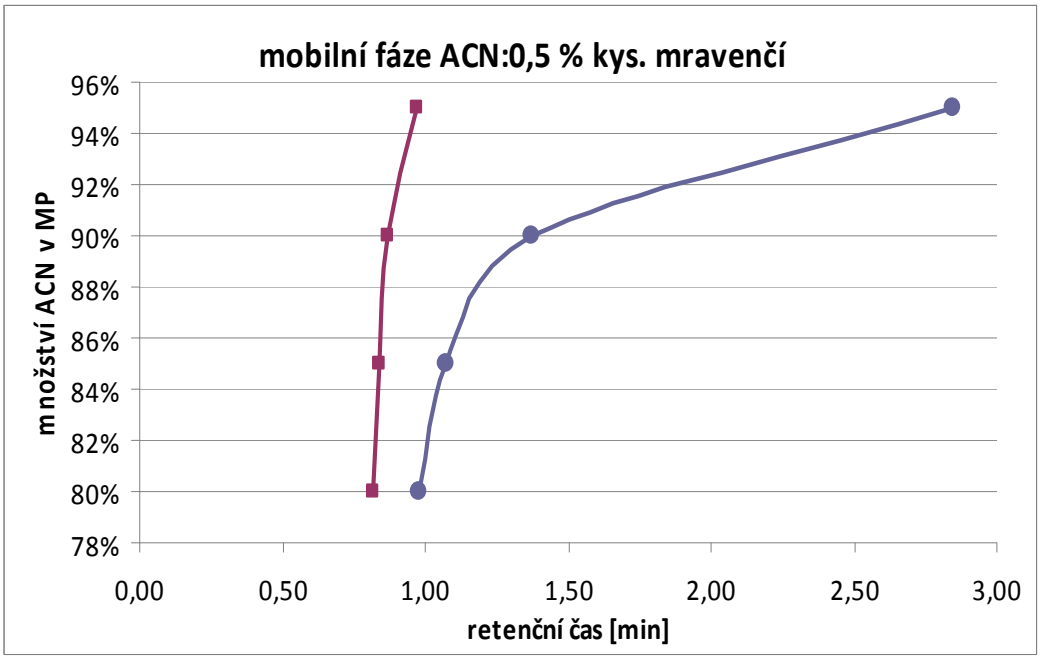
Tab. 3: Testování složení mobilní fáze ACN/0,1% kyselina fosforečná



Obr. 6: Grafické znázornění retenčních časů v mobilní fázi ACN:0,1% kyselina fosforečná při různých poměrech ACN

Kolona	Chromolith NH_2		
Mobilní fáze		Retenční čas (min)	
ACN	0,5% mrav	Polydatin	Resveratrol
80%	20%	0,98	0,82
85%	15%	1,07	0,84
90%	10%	1,37	0,87
95%	5%	2,85	0,97
97%	3%	6,12	1,09
99%	1%	21,40	1,55

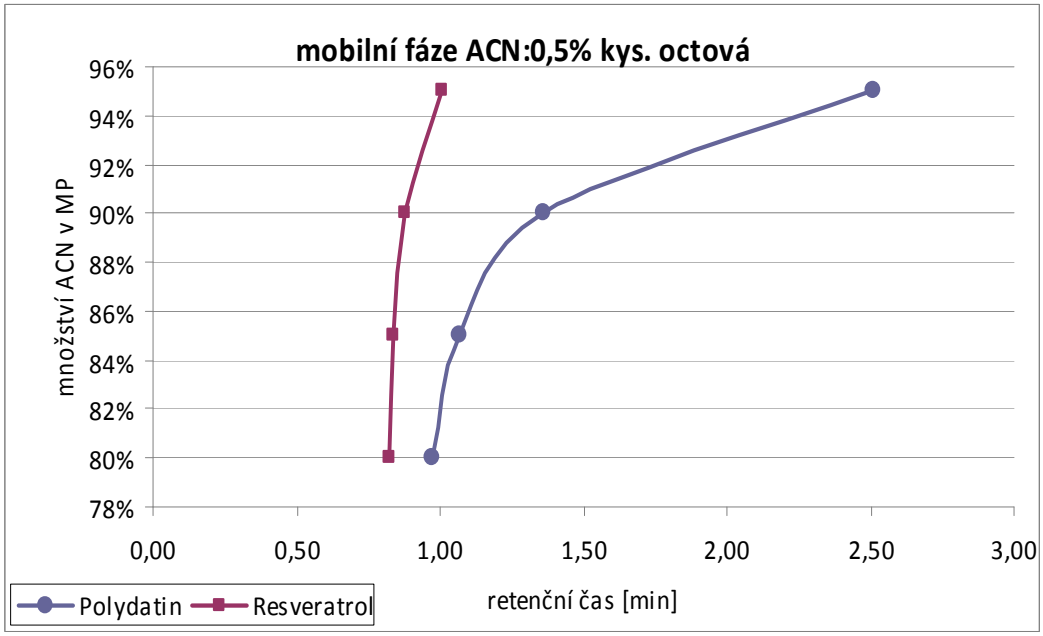
Tab. 4: Testování složení mobilní fáze ACN/0,5% kyselina mravenčí



Obr. 7: Grafické znázornění retenčních časů v mobilní fázi ACN:0,5% kyselina mravenčí při různých poměrech ACN

K Chromolith NH_2			
Mobilní fáze		Retenční čas (min)	
A	0,5% oct	Polydatin	Resveratrol
80	20%	0,97	0,82
85	15%	1,07	0,84
90	10%	1,36	0,88
95	5%	2,51	1,01
97	3%	26,18	1,31
99	1%	37,71	3,74

Tab 5: Testování složení mobilní fáze ACN/0,5% kyselina octová



Obr. 8: Grafické znázornění retenčních časů v mobilní fázi ACN:0,5% kyselina octová při různých poměrech ACN

Z výsledků je patrné, že s rostoucím podílem ACN v MP retenční časy obou látek rostly, což odpovídá systému HILIC, kde stacionární fáze má polární charakter. Ve všech případech se resveratrol eluoval dříve než polydatin. Jako nejvhodnější složení mobilní fáze jsme zvolili kombinaci acetonitrilu s 0,5% kyselinou octovou na základě optimální separace píků a dle retenčního času obou látek.

Mobilní fáze o složení ACN:0,5% kyselina octová pak byla dále měřena při 4 různých hodnotách pH a výsledky měření zaznamenány. pH kyseliny bylo upravováno pomocí koncentrovaného amoniaku. Výsledky byly zpracovány do následujících tabulek.

pH= 4			
Kolona Chromolith NH_2			
Mobilní fáze		Retenční čas	
ACN	0,5% oct	Polydatin	Resveratrol
80%	20%	0,99	0,83
85%	15%	1,13	0,85
90%	10%	1,64	0,88
95%	5%	6,52	1,06
97%	3%	24,95	1,32

Tab. 6: Vliv pH mobilní fáze na retenci RES a POL při pH=4

pH= 5			
Kolona Chromolith NH_2			
Mobilní fáze		Retenční čas	
ACN	0,5% oct	Polydatin	Resveratrol
80%	20%	1,00	0,84
85%	15%	1,14	0,85
90%	10%	1,68	0,89
95%	5%	6,86	1,07
97%	3%	27,09	1,33

Tab. 7: Vliv pH mobilní fáze na retenci RES a POL při pH=5

pH= 6			
Kolona Chromolith NH_2			
Mobilní fáze		Retenční čas	
ACN	0,5% oct	Polydatin	Resveratrol
80%	20%	1,00	0,82
85%	15%	1,14	0,85
90%	10%	1,66	0,89
95%	5%	6,41	1,07
97%	3%	24,38	1,31

Tab. 8: Vliv pH mobilní fáze na retenci RES a POL při pH=6

pH= 7			
Kolona Chromolith NH_2			
Mobilní fáze		Retenční čas	
ACN	0,5% oct	Polydatin	Resveratrol
80%	20%	1,01	0,82
85%	15%	1,14	0,85
90%	10%	1,64	0,89
95%	5%	6,03	1,08
97%	3%	22,66	1,31

Tab. 9: Vliv pH mobilní fáze na retenci RES a POL při pH=7

Z provedených experimentů bylo zjištěno, že pH kyseliny nemá významný vliv na retenci polydatinu a prakticky nulový vliv na retenci resveratrolu. Proto byla pro další optimalizaci separace na SIC systému zvolena 0,5% kyselina octová o hodnotě pH 4.

5.1.2 Optimalizace programu SIC

Přístroje pro sekvenční injekční analýzu jsou řízeny pomocí počítačového softwaru. Bylo tedy potřeba vytvořit program pro analýzu a separaci obou látek. Separace v SIA systému byla zvolena tak aby při eluci bylo možné použít skokovou změnu mobilní fáze z čistého ACN do směsi ACN s kyselinou octovou. Důvodem tohoto kroku, který je odlišný od separací testovaných na HPLC, je nízká retence RES v prostředí již minimální koncentrace vodné fáze v ACN (viz. tab. 6, kde je zřejmé že při 3% obsahu vodné fáze je RES eluován těsně za mrtvým objemem kolony). Z důvodů zvýšení retence RES na koloně byl tedy SIA program optimalizován tak, aby kolonou při začátku separace protékala pouze zóna čistého ACN a poté směs ACN s kyselinou octovou, v níž docházelo k eluci obou látek. Oba tyto parametry (jak koncentrace vodné fáze ve směsi s ACN, tak objem zóny čistého ACN) byly v SIA systému dále optimalizovány. Jako první byla optimalizována separace při různých poměrech ACN:kys.octové s aspirací pevně definovaného objemu 1000 µl ACN na začátek eluce. Poté co byl vybrán optimální poměr ACN:kys.octové pro separaci, tak byl testován optimální objem zóny čistého ACN na začátku eluce. Separace probíhala při průtokové rychlosti 15 µl/sec, s objemem vzorku 5 µl. Optimalizace metody a měření probíhala podle následujícího programu:

Loop Start (#) 3

SyringePump Command (?) KOR

SyringePump Valve Out
Multiposition Valve port 2
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) **2000**
acn + 0,5% octová
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Valve Out
Multiposition Valve port 3
SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100
SyringePump Aspirate (microliter) **1000 - ACN**
SyringePump Delay Until Done

SyringePump Valve Out

Multiposition Valve port 6

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 10

SyringePump Aspirate (microliter) 5 - **sample**

SyringePump Delay Until Done

SyringePump Valve Out

Multiposition Valve port 8

Analyte New Sample

Analyte Name RE

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 15

SyringePump Empty

Delay (sec) 100

Spectrometer Reference Scan

Spectrometer Absorbance Scanning

SyringePump Delay Until Done

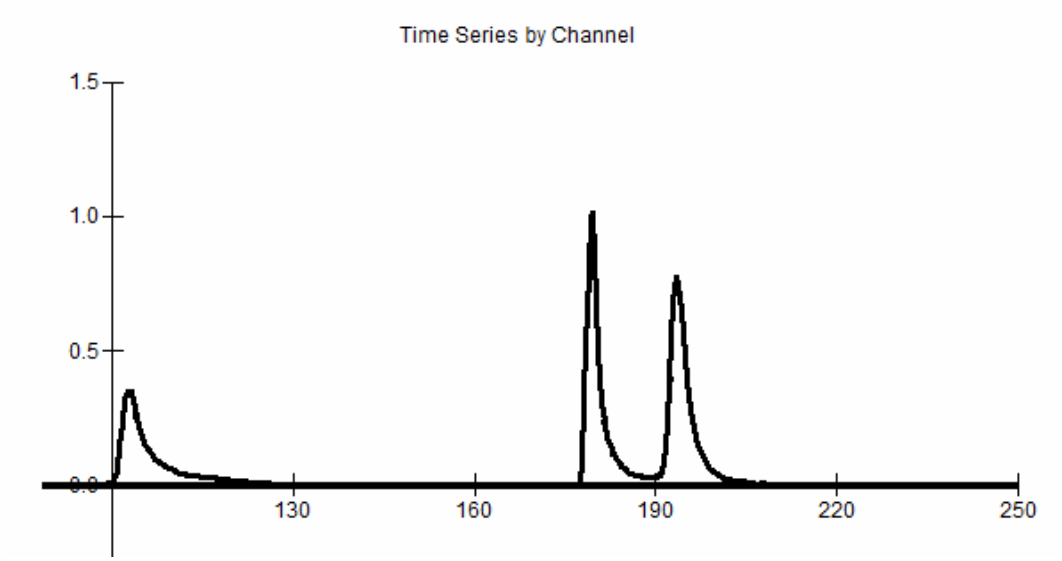
Spectrometer Stop Scanning

Loop End

5.1.3 Optimalizace mobilní fáze pomocí metody SIC

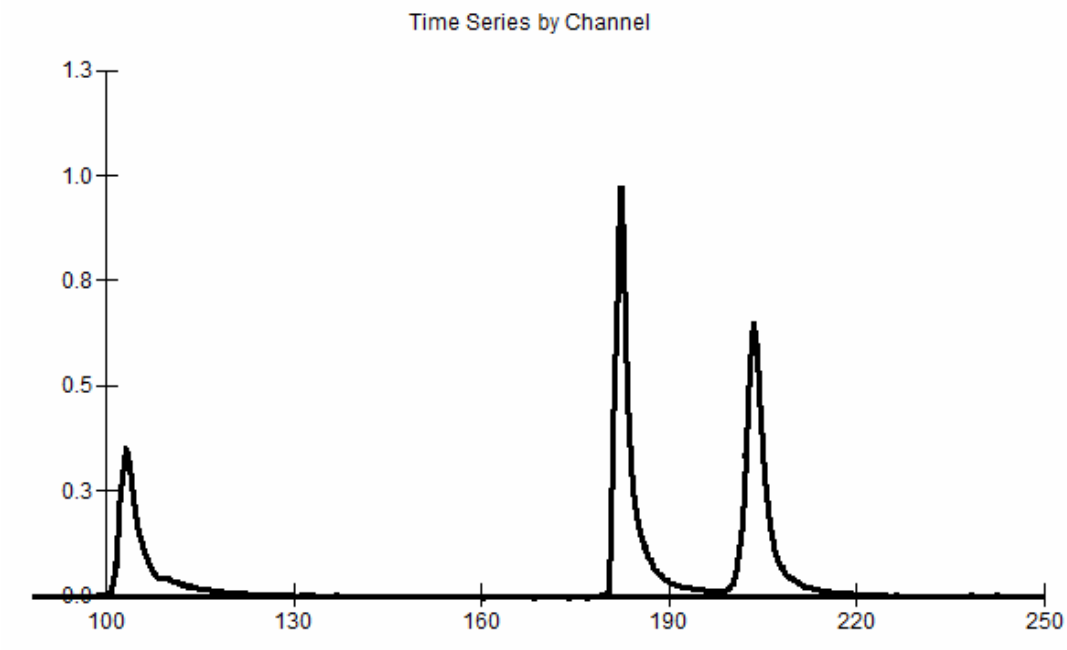
Pomocí metody HPLC byla ze zkoušených kyselin vybrána 0,5% kyselina octová s pH upravenou na hodnotu 4,0 pomocí amoniaku jako nejvhodnější v kombinaci s ACN. Prostřednictvím SIC byly tyto látky testovány v různých poměrech s cílem dosáhnout optimální separace látek. Použity byly směsi ACN: kyselina octová (80/20), ACN: kyselina octová (85/15), ACN: kyselina octová (88/12), ACN: kyselina octová (90/10). Na kolonu bylo aspirováno 2000 µl směsi ACN + 0,5% kyselina octová a 1000 µl ACN.

Výsledky měření znázorňují následující chromatogramy:



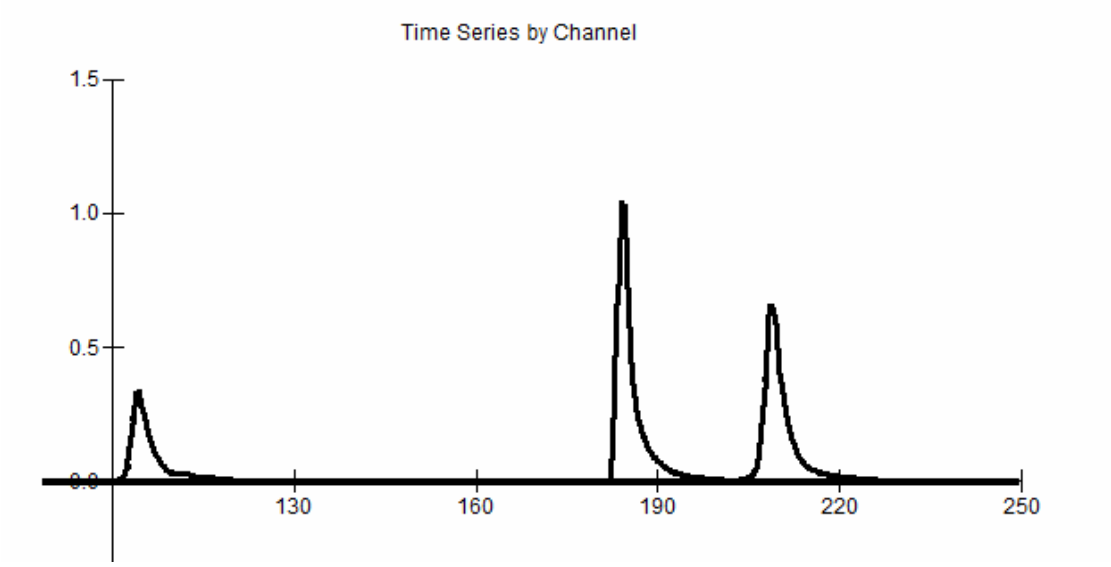
Obr. 9: Optimalizace 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (80/20) + 1000 µl ACN

Za použití této mobilní fáze byl retenční čas polydatinu nižší, než při použití MP s vyšší koncentrací ACN. Látky však nebyli optimálně separovány. Tvar a symetrie píku byla dostačující.



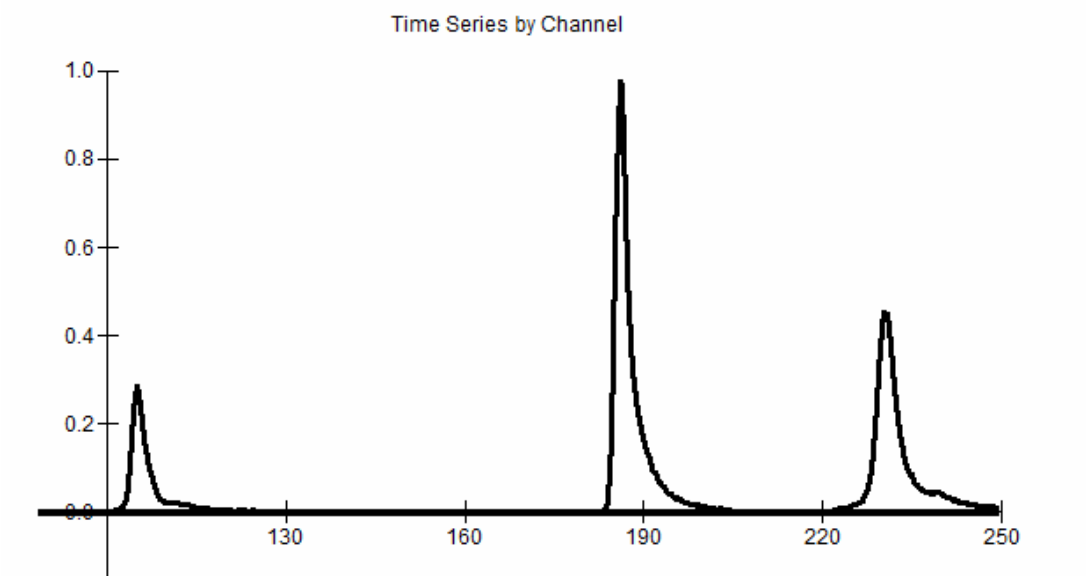
Obr 10: Optimalizace 2000 µl *směsi ACN: kyselina octová (85/15) + 1000* µl *ACN*

Při použití MP s vyšší koncentrací ACN už byla dosažena separace látek s vyšším rozlišením, proto byly zkoušeny další varianty MP s vyšším podílem ACN.



Obr 11: Optimalizace 2000 µl *směsi ACN: kyselina octová (88/12) + 1000* µl *ACN*

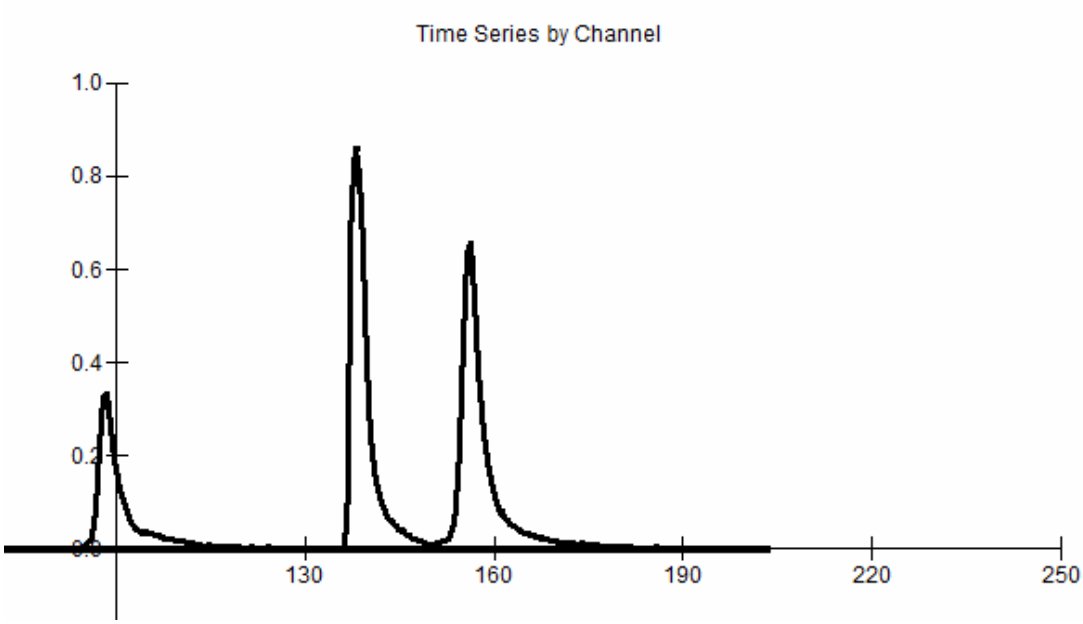
Složení této mobilní fáze se jevilo jako nejvhodnější. Tvar a symetrie píků byla uspokojivá. Separace látek dostačující a retenční čas polydatinu kratší, než při použití směsi (90% ACN/10% OCT).



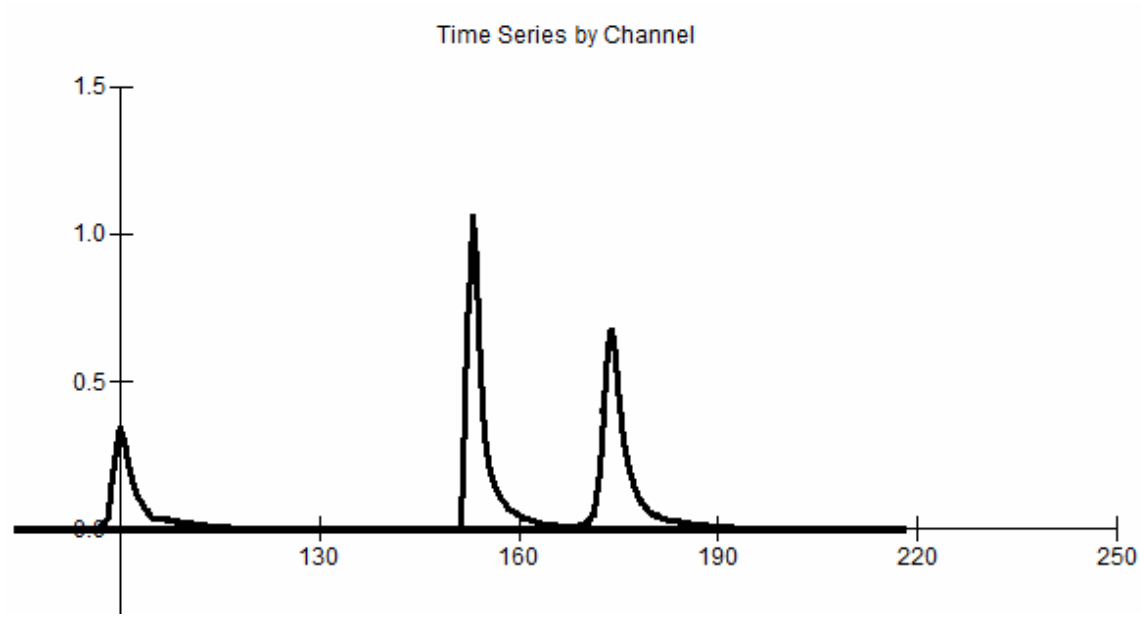
Obr 12: Optimalizace 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (90/10) + 1000 µl *ACN*

Při použití této mobilní fáze byly píky uspokojivě separované i symetrie píků byla vyhovující, ale retenční čas polydatinu byl příliš dlouhý.

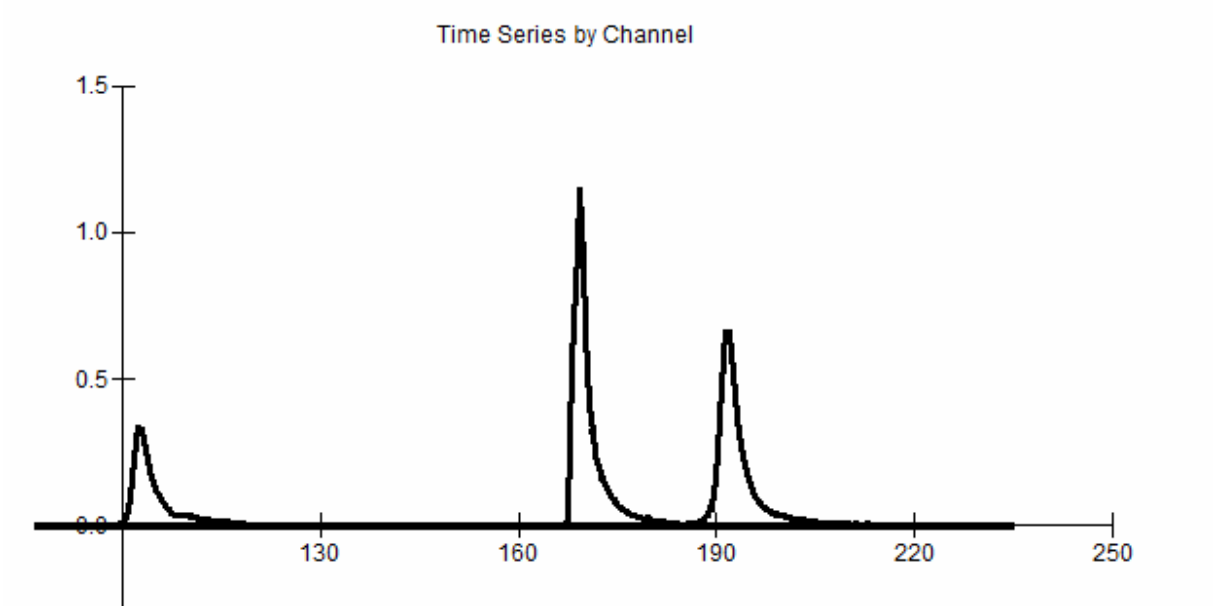
Jako nejoptimálnější MP byla tedy stanovena MP, obsahující 88% ACN a 12% 0,5% kyseliny octové, u které byla dále prováděna optimalizace objemu zóny čistého ACN. Tato MP byla testována při aspiraci 400, 600, 800, 1200 µl ACN.



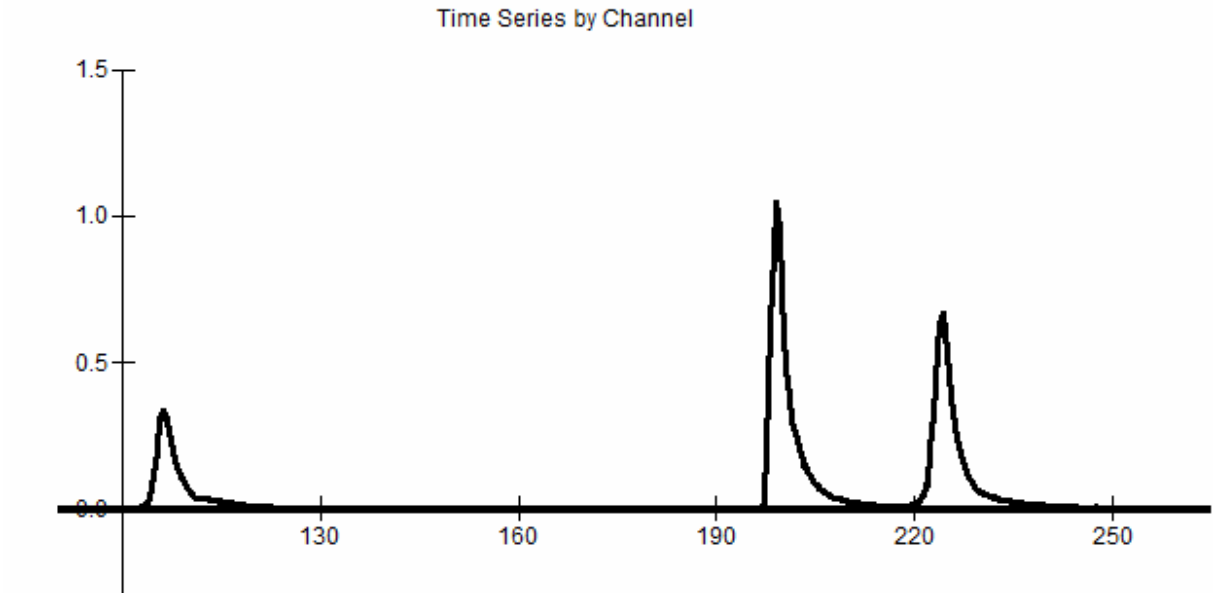
*Obr. 13: Optimalizace objemu 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + **400** µl ACN*



*Obr. 14: Optimalizace objemu 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + **600** µl ACN*



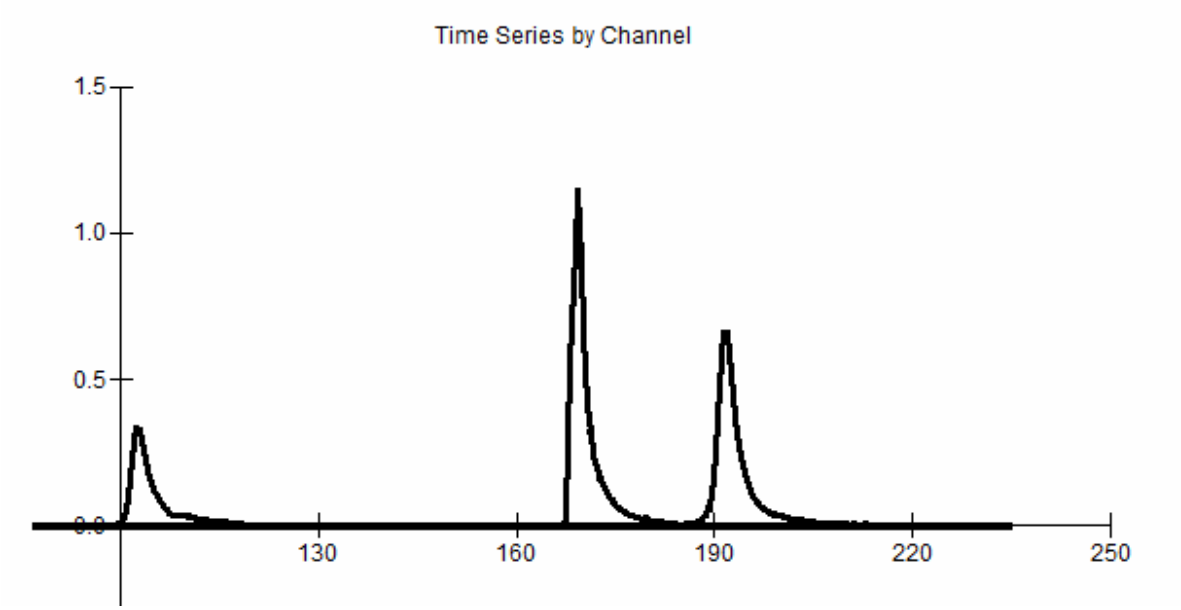
*Obr. 15: Optimalizace objemu 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + **800** µl ACN*



*Obr. 16: Optimalizace objemu 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + **1200** µl ACN*

Z výsledků měření je patrné, že retenční časy obou látek se s rostoucím objemem zóny ACN prodlužovaly. U aspirace 400 µl a 600 µl ACN nebyla separace obou látek zcela optimální. Za použití aspirace 1200 µl ACN byl zaznamenán zbytečně dlouhý retenční čas POL, jako optimální se tedy jevila aspirace 800 µl ACN.

5.1.4 Optimální podmínky pro analýzu a validaci metody



*Obr. 17: Separace RES a POL za optimálních podmínek – 2000 µl směsi ACN: kyselina octová (88/12) + **800** µl ACN*

Program podle kterého byla měřena validace metody:

Loop Start (#) 3

SyringePump Command (?) KOR

SyringePump Valve Out

Multiposition Valve port 2

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100

SyringePump Aspirate (microliter) **2000**

acn + 0,5% octová (88/12; v/v)

SyringePump Delay Until Done

SyringePump Valve Out

Multiposition Valve port 3

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100

SyringePump Aspirate (microliter) **800 - ACN**

SyringePump Delay Until Done

SyringePump Valve Out

Multiposition Valve port 6

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 10

SyringePump Aspirate (microliter) 5 **- sample**

SyringePump Delay Until Done

SyringePump Valve Out

Multiposition Valve port 8

Analyte New Sample

Analyte Name RE

SyringePump Flowrate (microliter/sec) 15

SyringePump Empty

Delay (sec) 100

Spectrometer Reference Scan

Spectrometer Absorbance Scanning

SyringePump Delay Until Done

Spectrometer Stop Scanning

Loop End

5.2 Validace metody

5.2.1 Linearita (kalibrace)

Linearita (linearity) je schopnost poskytovat hodnoty přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Obvykle je analyzováno alespoň 5 různých koncentrací deklarovaného obsahu [39].

Linearita byla stanovena pomocí 9 pracovních kalibračních roztoků o koncentracích v rozmezí od 5-200 mg/l. Příprava těchto roztoků je popsána v kapitole 4.2.3. Pro každý pracovní roztok byly provedeny 2 nástřiky na kolonu, dle kterých byla změřena hodnota absorbance, z níž byla stanovena průměrná hodnota. Metodou lineární regrese pak byla vyjádřena závislost absorbance na koncentraci analytu. Vyjádřeny byly dále i grafické parametry jako korelační koeficient nebo směrnice přímky. Korelační koeficient by měl mít podle lékopisu hodnotu nejméně 0.99. Pro analýzu potravních doplňků však tato hodnota není definovaná.

Korelační koeficient – míra „vyjádření těsnosti lineární vazby“

Reziduální odchylka – rozdíl mezi naměřenou a očekávanou hodnotou

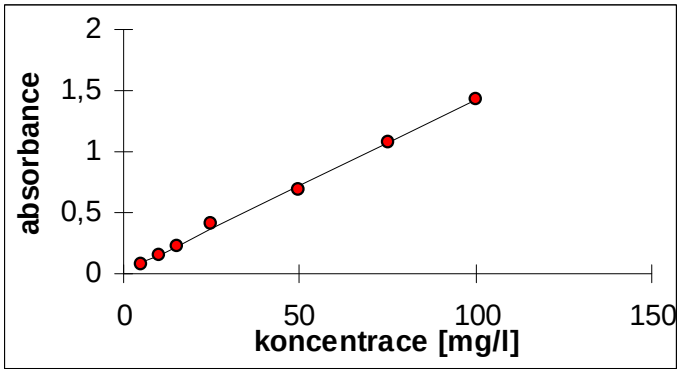
Výsledky naměřených hodnot jsou uvedené v tabulce č. 10.

koncentrace (mg/ml)	RES				PO			
	A_1	A_2	A_3	$A_{průměr}$	A_1	A_2	A_3	$A_{průměr}$
5	0,075	0,077	0,075	**0,076**	0,038	0,038	0,036	**0,037**
10	0,163	0,149	0,152	**0,155**	0,070	0,071	0,069	**0,070**
15	0,223	0,222	0,225	**0,223**	0,097	0,101	0,098	**0,099**
25	0,415	0,415	0,410	**0,413**	0,204	0,183	0,188	**0,192**
50	0,697	0,679	0,676	**0,678**	0,319	0,315	0,313	**0,316**
75	1,123	1,059	1,054	**1,079**	0,539	0,498	0,500	**0,512**
100	1,529	1,389	1,387	**1,435**	0,681	0,684	0,675	**0,680**
150	1,822	1,738	1,794	**1,785**	0,969	0,978	0,978	**0,975**
200	2,234	2,450	2,210	**2,298**	1,372	1,353	1,306	**1,343**

Tab. 10: testování kalibračních roztoků

5.2.1.1 Kalibrační závislost pro resveratrol

Závislost absorbance na koncentraci RES je graficky vyjádřena na Obr. 18



Obr. 18: Kalibrační křivka pro resveratrol

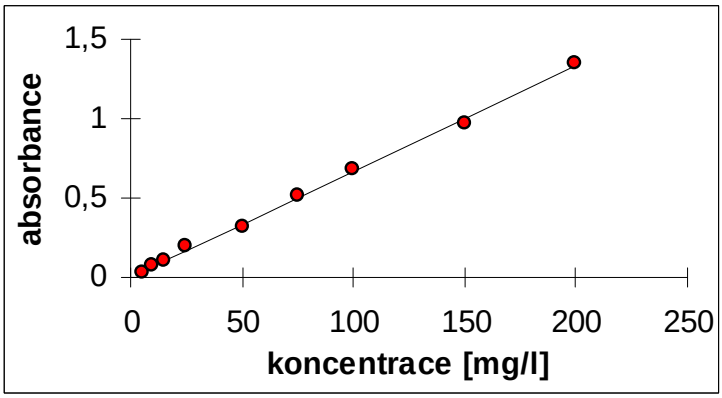
Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	7	Odhad chyby	
Směrnice	k =	0,014122	±	0,000321
Abs. člen	q =	0,014971	±	0,016769
Korelační koef.	r =	0,998711		
Reziduální odch.	s =	0,028534		

Tab. 11: Parametry lineární regrese pro resveratrol

Ve sledovaném koncentračním rozmezí pro RES bylo dosaženo hodnot 0,9987 korelačního koeficientu a 0,0285 reziduální odchylky.

5.2.1.2 Kalibrační závislost pro polydatin

Závislost absorbance na koncentraci POL je graficky vyjádřena na Obr. 19.

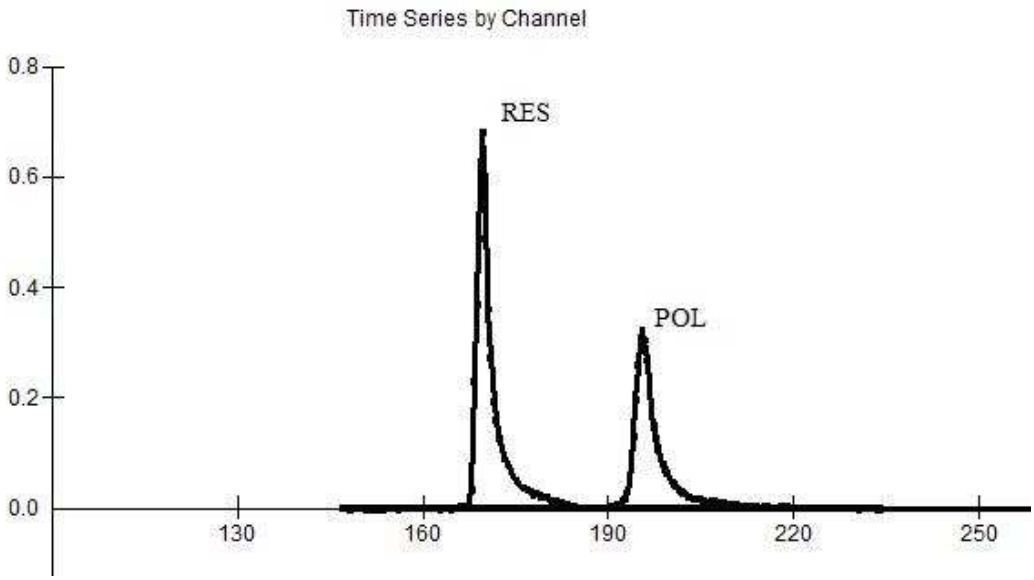


Obr 19: Kalibrační křivka pro polydatin

Statistické parametry pro regresi : y = k x + q				
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby	
Směrnice	k =	0,006628	±	8,48E-05
Abs. člen	q =	0,005392	±	0,008074
Korelační koef.	r =	0,999428		
Reziduální odch.	s =	0,016419		

Tab. 12: Parametry lineární regrese pro polydatin

Ve sledovaném koncentračním rozmezí pro POL bylo dosaženo hodnot 0,9994 korelačního koeficientu a 0,0164 reziduální odchylky.



Obr. 20: Kalibrace pro roztok o koncentraci 50 mg/l

5.2.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost (Repeatability) je vyjádřena jako přesnost jednotlivých hodnot měření, které byli získané opakovaně s jedním homogenním materiálem. Metoda je opakována stejným způsobem na tomtéž přístroji stejným pracovníkem za použití stejných činidel [43].

Opakovatelnost byla stanovena pomocí kalibračních roztoků o koncentraci 100 mg/l a 25 mg/l jejichž postup přípravy je popsán v kapitole 4.2.3. Pro tyto koncentrace bylo provedeno 6 nástřiků na kolonu a z hodnot absorbance analyzovaných látek byly vypočítány parametry průměr a směrodatná odchylka (SD). Z těchto dvou hodnot byla dále odvozena relativní směrodatná odchylka (RSD). Získané výsledky jsou uvedené v tabulkách č. 13 a č. 14.

číslo analýzy	**RES**	**POL**
1	1,231	0,669
2	1,191	0,654
3	1,215	0,662
4	1,182	0,638
5	1,149	0,646
6	1,182	0,654
SD	**0,03**	**0,01**
Průměr	**1,19**	**0,65**
RSD (%)	**2,40**	**1,69**

Tab. 13: Opakovatelnost pracovního roztoku pro kalibraci (100 mg/l)

číslo analýzy	RES	POL
1	0,327	0,135
2	0,330	0,137
3	0,329	0,135
4	0,323	0,132
5	0,327	0,132
6	0,325	0,135
SD	**0,003**	**0,002**
Průměr	**0,33**	**0,13**
RSD (%)	**0,78**	**1,46**

Tab. 14: Opakovatelnost pracovního roztoku pro kalibraci (25 mg/l)

5.2.3 Přesnost

Přesnost (precision) vyjadřuje, do jaké míry se shodují výsledy měření získané opakovaně s jedním vzorkem za stanovených podmínek [43].

Stanovení přesnosti probíhalo měřením vzorků, které byly připraveny pomocí postupu uvedeného v kapitole 4.3.2 z přípravků A1-Resveratrol 800 RX.

5.2.3.1 A1-Resveratrol 800 RX

Pro stanovení přesnosti bylo připraveno 6 vzorků přípravku A1-Resveratrol 800 RX. Jejich příprava je popsána v kapitole 4.3.2. U každého vzorku byly provedeny tři nástřiky na kolonu a odečteny hodnoty absorbance, z nichž byla spočítána průměrná hodnota, která byla dále přepočítána na jednotnou navážku ¼ tablety.

Z těchto hodnot byl stanoven procentuální obsah deklarovaného množství resveratrolu v přípravku podle vzorce:

Naměřené hodnoty byly zpracovány do tabulky č. 15.

A1-Resveratrol 800 RX			¼ tbl = 0,10073 g
číslo vzorku	navážka [g]	průměrná absorbance	obsah látky [%]
1	0,101	0,796	**100,43**
2	0,104	0,855	**91,29**
3	0,100	0,931	**99,43**
4	0,101	0,923	**98,64**
5	0,104	0,936	**100,00**
6	0,102	0,977	**104,42**

Tab. 15: Měření přesnosti vzorku A1-Resveratrol 800 RX

Z procentuálního obsahu látky pak byly spočítány parametry vyjadřující přesnost stanovení SD, RSD a průměr a zpracovány do tabulky č. 16.

vz	1	2	3	4	5	6	**SD**	**Prům. (%)**	**RSD (%)**
[%]	100,43	91,29	99,43	98,64	100,00	104,42	4,29	99,035	4,34

Tab. 16: Parametry přesnosti vzorku A1-Resveratrol 800 RX

5.2.4 Výtěžnost (správnost)

Je definována jako shoda mezi získanou hodnotou měření a správnou hodnotou. Správná hodnota je hodnota získaná metodou, která má správnost ověřenou, nebo ji lze získat přípravou vzorku, který je tvořený všemi složkami přípravku a přesně přidaným standardem. Tam, kde nelze zajistit všechny složky přípravku je přípravek analyzován se známým přídavkem standardu [43].

Pro stanovení výtěžnosti bylo připraveno 6 vzorků přípravku A1-Resveratrol 800 RX jejichž příprava je popsána v kapitole 4.3.3. U každého roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu a zaznamenána absorbance, ze které byla vypočítána průměrná absorbance. Z těchto hodnot byla spočítána výtěžnost podle následujícího vzorce, kde A_{vz} je absorbance reálného vzorku s přídavkem standardu a A_{st} je absorbance standardů pro koncentraci 100 mg/l:

$$\% = A_{vz}/A_{st} * 100$$

Výsledky změřených absorbancí vzorků byly korigovány na jednotnou navážku a měření byly zpracovány do následujících tabulek. Pro výpočet výtěžnosti polydatinu byla absorbance standardu korigována na koncentraci 50 mg/l kvůli sjednocení porovnávaných koncentrací.

		Průměrná absorbance	
číslo vzorku	navážka [mg]	RES	POL
1	2,54	1,114	0,236
2	2,66	1,017	0,226
3	2,59	1,094	0,249
4	2,88	1,206	0,260
5	2,63	1,037	0,234
6	2,45	1,065	0,249

Tab. 17: Výsledky měření absorbance pro výtěžnost

vzorek	RES (%)	POL (%)
1	104,38	88,44
2	95,24	84,70
3	102,50	93,32
4	113,00	97,32
5	97,16	87,70
6	99,81	93,32
SD	**6,34**	**4,64**
průměr	**102,02**	**90,80**
RSD (%)	**6,21**	**5,11**

Tab. 18: Výtěžnost stanovení ve vzorku A1-Resveratrol 800 RX

5.2.5 Stanovení obsahu resveratrolu v potravních doplňcích

5.2.5.1 Evelor resveratrol 50 mg

Pro stanovení byly připraveny tři vzorky přípravku Evelor resveratrol 50 mg, jejichž příprava je popsána v kapitole 4.3.1. Z každého vzorku byly provedeny tři nástřiky na kolonu,

naměřena hodnota absorbance a z ní spočítána její průměrná hodnota. Ta byla přepočítána na přesnou navážku a stanoven procentuální obsah deklarovaného množství látky v přípravku. Hodnoty byly zpracovány do tabulky č. 19.

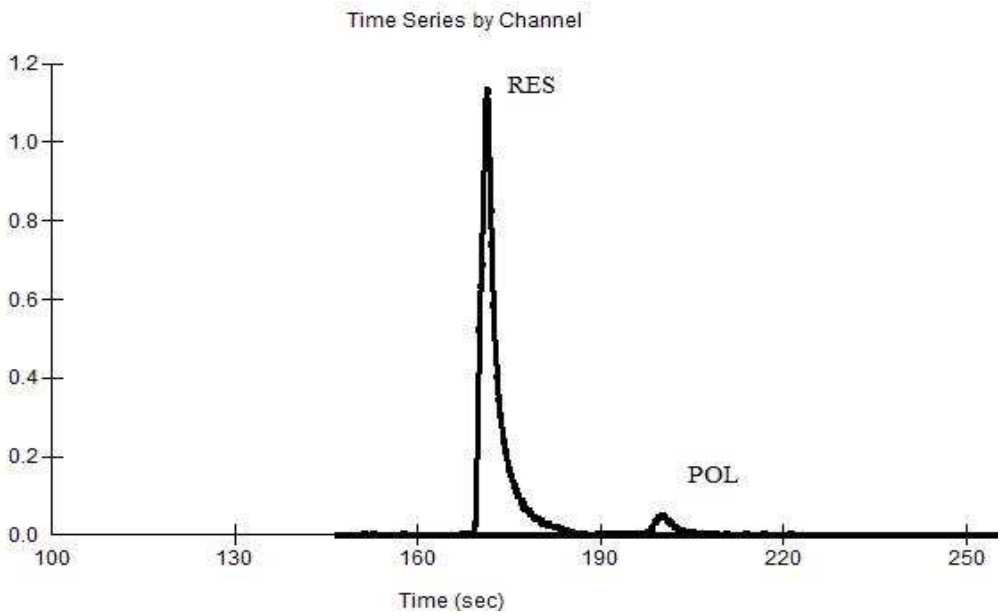
Evelor resveratrol 50 mg			½ tbl = 0,15137 g
číslo vzorku	navážka [g]	průměrná absorbance	obsah látky [%]
1	0,1509	1,117	**95,47**
2	0,1523	1,110	**94,84**
3	0,1518	1,191	**101,82**

Tab. 19: Měření obsahu vzorku Evelor resveratrol 50 mg

Z procentuálního obsahu látky pak byly spočítány parametry SD, RSD a průměr a zpracovány do tabulky č. 20.

vz	1	2	3	**SD**	**Prům. (%)**	**RSD (%)**
[%]	95,47	94,84	101,82	3,8609	97,37	3,97

Tab. 20: Parametry stanovení vzorku Evelor resveratrol 50 mg



Obr. 21: SIC-HLIC záznam stanovení obsahu Evelor resveratrol 50 mg

5.2.5.2 Resveratrol anti-aging

Stanovení bylo provedeno pomocí tří vzorků přípravku Resveratrol anti-aging, které byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 4.3.1. U každého vzorku byly provedeny tři nástřiky na kolonu a změřena hodnota absorbance. Dále byla spočítána průměrná hodnota absorbance a přepočítána na přesnou navážku. Z těchto hodnot byl stanoven procentuální obsah deklarovaného množství látky v přípravku. Výsledky měření byly zpracovány do tabulky č. 21.

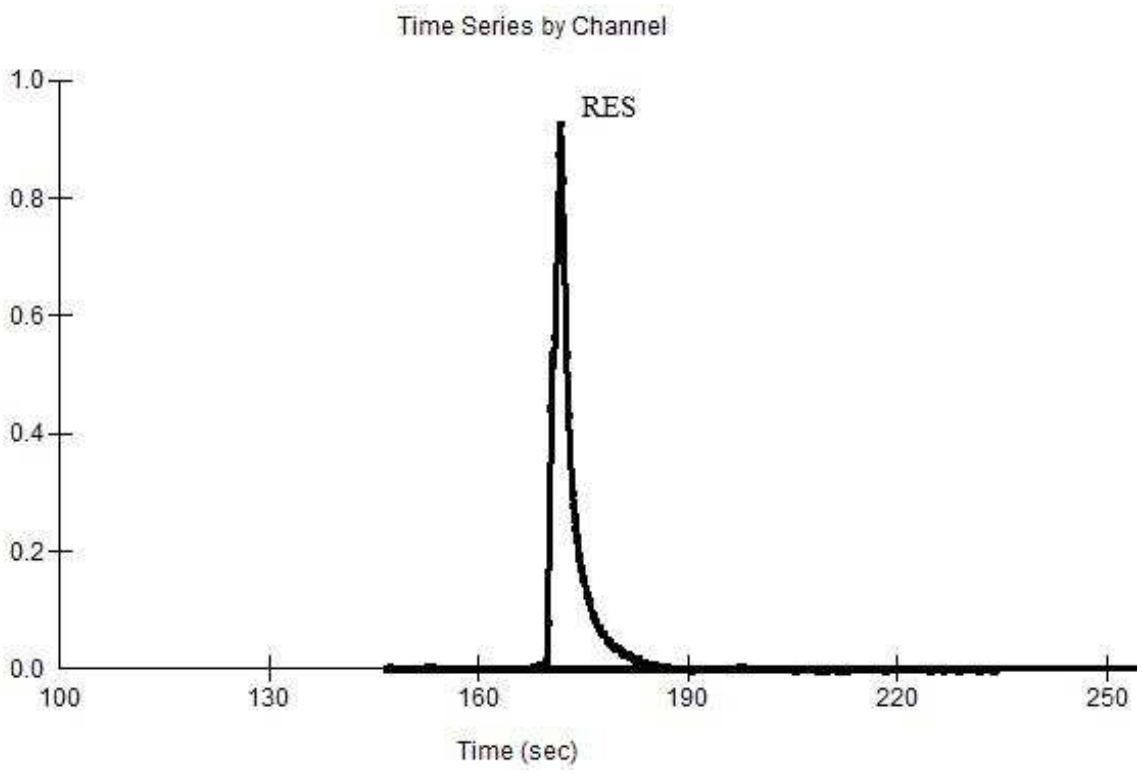
Resveratrol anti-aging			½ tbl = 0,13073 g
číslo vzorku	navážka [g]	průměrná absorbance	obsah látky [%]
1	0,1319	1,0137	**86,64**
2	0,1316	0,904	**77,29**
3	0,1302	0,961	**82,11**

Tab. 21: Měření obsahu vzorku Resveratrol anti-aging

Z procentuálního obsahu látky pak byly spočítány parametry SD, RSD a průměr a zpracovány do tabulky č. 22.

vz	1	2	3	**SD**	**Prům. (%)**	**RSD (%)**
[%]	86,64	77,29	82,11	4,6757	82,01	5,70

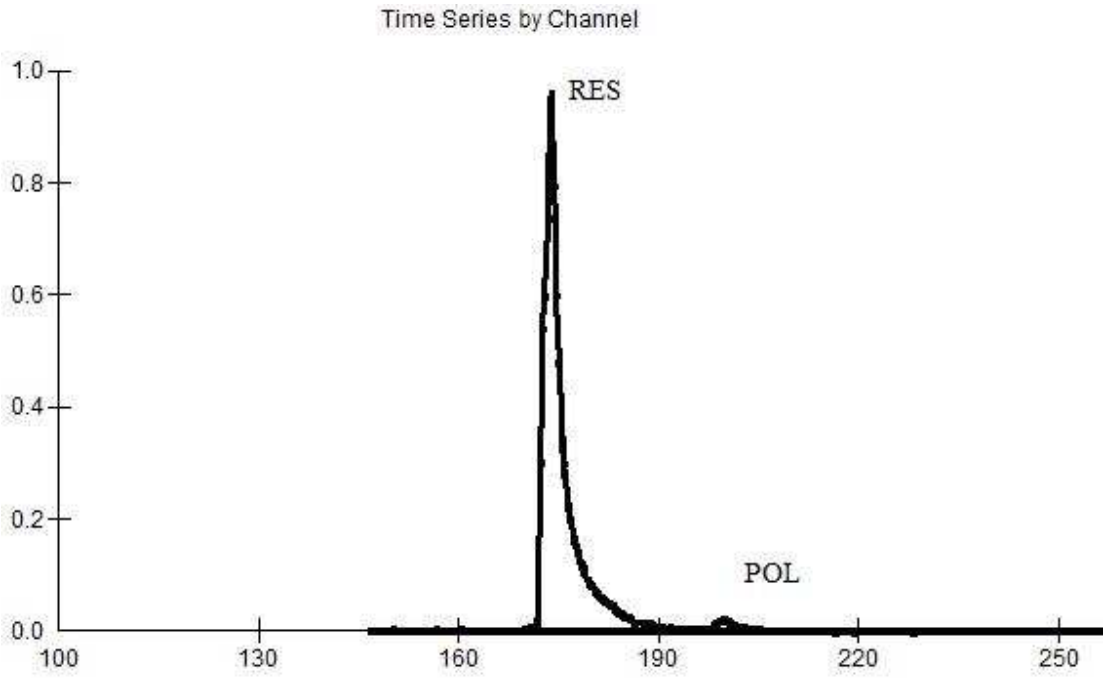
Tab. 22: Parametry stanovení vzorku Resveratrol anti-aging



Obr. 22: SIC-HLIC záznam stanovení obsahu Resveratrol anti-aging

5.2.5.3 A1-Resveratrol 800 RX

Stanovení bylo provedeno v rámci hodnocení přesnosti metody, viz. kapitola 5.2.3.1. Z těchto hodnot byl stanoven i procentuální obsah deklarovaného množství látky v přípravku, který byl zjištěn jako 99,03% deklarovaného množství.



Obr. 23: SIC-HLIC záznam stanovení obsahu A1-Resveratrol 800 RX

6. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla optimalizována a validována analytická metoda sekvenční injekční chromatografie (SIC) a optimalizována metoda hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) za účelem separace resveratrolu a polydatinu v doplňcích stravy. K analýze byly vybrány potravní přípravky A1-Resveratrol 800 RX (A1 Pharma s.r.o.), Evelor Resveratrol (Medochemie Ltd) a Resveratrol antiaging (TheraTech) a zároveň byla provedena kontrola deklarovaného obsahu látek v těchto přípravcích.

Jako optimální mobilní fáze pomocí HPLC metody byla stanovena kombinace acetonitrilu s 0,5% kyselinou octovou s pH 4,0 upraveným pomocí amoniaku. Měření probíhalo za použití monolitické kolony Chromolith NH_2 MERCK (50 x 4,6 mm) o průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min. Detekce se uskutečnila pomocí DAD detektoru při vlnové délce 305 nm.

Metodou SIC bylo dále optimalizováno složení mobilní fáze. Jako nejvhodnější se ukázal poměr acetonitrilu a 0,5% kyseliny octové 88:12 (v/v) při aspiraci 800 µl acetonitrilu pro začátek eluce.

Jako vnitřní standardy byly testovány látky p-nitrofenol, 3-nitrofenol, nitrobenzen, p-aminobenzoová kyselina, p-nitroanilin, 1-nitroso-2-naftol, nitron, meta-nitrobenzoová kyselina, žádná z látek však neměla vhodné retenční parametry, proto nebyly využity pro další analýzu.

Následně byla prováděna validace SIC-HILIC metody. Měřením linearity z kalibrační řady v rozmezí 5-200 mg/l pro polydatin a 5-100 mg/l pro resveratrol jsme získali korelační koeficient, který byl u resveratrolu stanoven na 0,998711 a u polydatinu na 0.999428.

Opakovatelnost byla určena za použití pracovních roztoků o koncentraci 100 mg/l a 25 mg/l a vyjádřena prostřednictvím relativní směrodatné odchylky (RSD). U resveratrolu 2,40% a polydatinu 1,68% pro koncentraci 100 mg/l, u resveratrolu 0,78% a polydatinu 1,46% pro koncentraci 25 mg/l.

Přesnost metody byla opět vyjádřena parametrem relativní směrodatné odchylky (RSD) a pro přípravek A1-Resveratrol 800 RX byla její hodnota 4,34%.

Výtěžnost pro přípravek A1-Resveratrol 800 RX byla stanovena v procentech. Její hodnota pro resveratrol dosáhla 102,02% a hodnota pro polydatin byla stanovena na 90,80%.

Závěrem byla metoda použita pro stanovení resveratrolu v potravních doplňcích A1-Resveratrol 800 RX (A1 Pharma s.r.o.), Evelor Resveratrol (Medochemie Ltd) a Resveratrol

antiaging (TheraTech) s následujícími výsledky deklarovaného obsahu: 99,04%, 97,37% a 82,013%.

Obsah polydatinu nebyl v přípravcích nakonec hodnocen, kvůli jeho velice nízkému množství. Všichni výrobci deklarují pouze obsah resveratrolu a stanovení polydatinu v tak nízkých koncentracích by nemělo pro hodnocení kvality přípravku dostatečnou vypovídací hodnotu.

Použitá literatura:

[1] Vacek, J., Onofrejová, L., Klejdus, B., Kubáň, V., Chem. listy. 2009, vol. 103, s. 381

[2] Jandera, P., Chemagazín. 2011, vol. 2, s. 8

[3] Majors, R.E., J. Chromatogr. Sci. 1980, vol. 18, s. 488

[4] Boumahra, M., Davidov, V.Y., Kiselev, A.V., Chromatographia. 1982, vol. 15, s. 751

[5] Albert, A. J., J. Chromatogr. 1990, vol. 499, s. 177

[6] Brown S. D., White C. A., Bartlett M. G.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 2002, vol. 16, s. 1871

[7] Heaton J., Smith N. W.: Chromatography Today. 2012, 44

[8] Buszewski, B., Noga, S., Anal Bioanal Chem. 2012, vol. 402, s. 233

[9] Nováková, L., Douša, M., Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 2013, s. 156

[10] Gama, R. M., Gomes da Costa Silva, R., Collins, C. H., Bortili, C. B. G., Trends Anal. Chem. 2012, vol. 37, s. 48

[11] Guo, Y., Gaiki, S, J. Chromatogr. A. 2011, vol. 1218, s. 5920

[12] Klimeš J. a kolektiv, Kontrola léčiv I., nakladatelství Karolinum, 2008, ISBN 978-80-246-1613-1

[13] Karlíček R. a kolektiv, Analytická chemie pro farmaceuty, nakladatelství Karolinum, 2005, ISBN 80-246-0348-9

[14] Pacáková V., Stulík K., Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1986

[15] Peters E. C. et kol.: Anal. Chem. 1997, vol 69, s 3646

[16] Roper D. K., Lightfoot E. T.:J. Chromatogr. 1995, vol. 702, s. 3

[17] Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M., Chem. listy. 2007, vol. 101, s. 190

[18] Palm A., Novotny A.: Anal. Chem. 1997, vol. 69, s. 4499

[19] Petro M. et kol.: Anal. Chem. 1996, vol. 68, s. 315

[20] Hjertén S. et kol.: J. Chromatogr. 1989, vol. 473, s. 273

[21] Economou A., Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line Hample-handling and pre-treatment, Laboratory of Analytical Chemistry. 2005, vol. 24, s. 416 (citováno. 25. 1. 2013)

[22] Růžička J., Marshall G.D., Sequential injection: a new koncept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays, Analytica Chimica Acta. 1990, vol. 237, s. 329 (citováno 24.1. 2013)

[23] Sekvenční injekční analýza [online]. (citováno: 15.4. 2013). Dostupné z: http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/sia_dus.pdf

[24] Šatinský D., Habilitační práce: Využití chromatografických sorbetů v sekvenční injekční analýze, FaF UK, katedra analytické chemie 2008

[25] Paseková H., Polášek M., Solich P., , Chem. listy. 1999, vol. 93, s. 354 (citováno: 25. 1. 2013)

[26] Zacharis C. K., Verdoukas A., Tzanavaras P. D., Themelis D. G., Automated Hample preparation coupled to sequential injection chromatography: On-line filtration and dilution protocols prior to separation, J. Pharm. Biomed. Anal. 2009, vol. 49, s. 726 (citováno. 25. 1. 2013)

[27] Chocholouš P., Šatinský D., Solich P., Sekvenční injekční chromatografie-nový směr v průtokových metodách, Chemické listy. 2008, Vol 102, s. 179 (citováno: 25.1 2013)

[28] Chocholouš P., Solich P., Šatinský D., , Anal. Chim. Acta. 2007, vol. 600, s. 129 (citováno: 25.1 2013)

[29] Wu Ch., Yang J., Wang F., Wang X. Chinese J. Nat. Med. 2013, vol. 11, s. 1

[30] Vianm. A., Tomaov., Gallets., Coulombp. O., Lacombej.M.. J. of Chromatogr. A. 2005, vol. 1085, s. 224

[31] Puchem, Resveratrol-Compound Summary, dostupné z: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=445154# (citováno: 6.12. 2013)

[32] Šmidrkal, J., Filip, V., Melzoch, K., Hanzlíková, I., Buckiová, D., Křísa, B.,Chem. listy. 2001. vol. 95, s. 602

[33] Resveratrol 2012, Conclusion of the working group Resveratrol 2012 ver 07 27-12-2012, dostupné z: http://www.biopeople.dk/fileadmin/filer/David/INGRIDMisc/Resveratrol2012/Conclusions_of_the_working_group_Resveratrol2012.pdf (citováno 30.1 2014)

[34] PiÑeiroz., Palmam., Barrosoc.G.. J. Chromatogr. A.2006, vol. 1110, s. 61

[35] He H., Chen X., Wang G., Wang J., Davey A. K.. J. Chromatogr. B 2006, vol. 832, s. 177

[36] Camont L., Cottartch., Rhayem Y., Nivet-Antonie V., Djelidi R., Collin F., Beaudeux J., Bonnefont-Rousselot D. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. Anal. Chim. Acta. 2009,vol. 634,s. 121

[37] Kolouchová-Hanzlíková I., Melzoch K., Filip V., Šmidrkal J. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. Food Chem.2004, vol. 87, s. 151

[38] RodrIíguez-Delgado M. A., González G., Pérez-Trujillo J. P., García-Montelongo F. J. Trans-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. Food Chem. 2002, vol. 76, s. 371

[39] Zhang W., Jia Y., Huang Q., LI Q., Bi K. Simultaneous Determination of Five Major Compounds in Polygonum cuspidatum by HPLC. Chromatographia. 2007, vol. 66, s. 685

[40] Vianm. A., Tomaov., Gallets., Coulombp.O., Lacombej.M. Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. J. . Chromatogr. A. 2005, vol. 1085, s. 224

[41] Orlandini S., Giannini I., Pinzauti S., Furlanetto S. Multivariate optimisation and validation of a capillary electrophoresis method for the analysis of resveratrol in a nutraceutical. Talanta. 2008, vol. 74, s. 570

[42] Rotches-Ribalta M., Andres-Lacueva C., Estruch R., Escribano E., Urpi-Sarda M. Pharmacokinetics of resveratrol metabolic profile in healthy humans after moderate consumption of red wine and grape extract tablets. Pharm. Research. 2012, vol. 66, s. 375

[43] Klimeš J. a kolektiv, Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, nakladatelství Nucleus HK, 2011, ISBN 978-80-87009-29-1