

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

Diplomová práce

# **Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení vybraných biologicky aktivních látek v potravinových doplňcích**

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

**Hradec Králové 2014**

**Jakub Fibigr**

Děkuji panu Doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za jeho užitečné rady, odborné vedení a vstřícnost při vypracování této práce.

Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpal, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Dne 2. 5. 2014 v Hradci Králové

## Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Jakub Fibigr

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

Název diplomové práce: Vývoj a validace HPLC metody pro stanovení vybraných biologicky aktivních látek v potravinových doplňcích

Byla vyvinuta a validována HPLC metoda pro současné stanovení resveratrolu a polydatinu v potravních doplňcích a aplikována na stanovení těchto analytů v přípravcích A1 Resveratrol 800 RX (A1 Pharma s.r.o.), Evelor Resveratrol 50 mg (Medochemie Ltd), Walmark Lecithin s resveratolem (Walmark), Resveratrol MAX (Tachyon), Resveratrol antiaging (TheraTech), Indonal Partner for Woman (Synergia). K analýze byla využita kolona Ascentis Express ES-Cyano (100 x 3,0 mm; 2,7 μm) Supelco Analytical, izokratická eluce mobilní fází o složení acetonitril/0,5% kyselina octová v poměru 20:80 s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min a detekce pomocí DAD detektoru při vlnové délce 305 nm při konstantní teplotě 60°C a tlaku 20,0 MPa.

Klíčová slova: HPLC, resveratrol, polydatin, fytoalexin, antioxidant, potravní doplňky

## Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Jakub Fibigr

Supervisor: Doc. RNDr. Dalibor Šatinský Ph.D.

Title of Diploma Thesis: HPLC method development and validation for biological active substances determination in nutraceuticals

A new HPLC method was developed and validated for the simultaneous determination of resveratrol and polydatin in nutraceuticals and the method was used for determination of these compounds in nutraceuticals A1 Resveratrol 800 RX (A1 Pharma s.r.o.), Evelor Resveratrol 50 mg (Medochemie Ltd), Walmark Lecithin s resveratrolem (Walmark), Resveratrol MAX (Tachyon), Resveratrol antiaging (TheraTech), Indonal Partner for Woman (Synergia). The chromatographic separation was performed using Ascentis Express ES-Cyano column (100 x 3.0 mm; 2.7  $\mu\text{m}$ ) Supelco Analytical. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile/0.5% acetic acid 20:80 with flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 305 nm using DAD detector, with a temperature of 60°C and pressure of 20.0 MPa.

Keywords: HPLC, resveratrol, piceid, phytoalexin, antioxidant, nutraceuticals

## Obsah

<b>1</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE .....</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>13</b>
<b>4.1</b>	<b>Resveratrol .....</b>	<b>13</b>
4.1.1	Původ, struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti.....	13
4.1.2	Farmakologická aktivita .....	14
4.1.3	Farmakokinetika.....	14
<b>4.2</b>	<b>Instrumentace HPLC .....</b>	<b>15</b>
4.2.1	Chromatografické kolony .....	15
4.2.1.1	Ascentis Express Fused-Core HPLC kolony.....	16
4.2.1.2	Ascentis Express ES-Cyano HPLC kolona .....	17
<b>4.3</b>	<b>Možnosti stanovení resveratrolu a polydatinu .....</b>	<b>17</b>
4.3.1	Metody stanovení resveratrolu .....	17
4.3.2	Metody současného stanovení resveratrolu a polydatinu .....	18
4.3.3	Metoda extrakce resveratrolu a polydatinu .....	19
<b>4.4</b>	<b>Zacházení s roztoky vzorků a standardů .....</b>	<b>19</b>
<b>4.5</b>	<b>Validace metody .....</b>	<b>19</b>
4.5.1	Test vhodnosti chromatografického systému.....	19
4.5.1.1	Zdánlivý počet teoretických pater.....	19
4.5.1.2	Faktor asymetrie chromatografických píků - $A_s$ .....	19
4.5.1.3	Rozlišení chromatografických píků - $R_s$ .....	20
4.5.2	Linearita.....	20
4.5.3	Přesnost.....	20
4.5.4	Opakovatelnost .....	20
4.5.5	Správnost.....	20
4.5.6	Robustnost .....	21
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>22</b>
<b>5.1</b>	<b>Materiál, přístroje a pomůcky.....</b>	<b>22</b>
5.1.1	Přístroje, podmínky separace.....	22
5.1.2	Pomůcky .....	23
5.1.3	Standardy .....	23
5.1.4	Analyzované potravinové doplňky .....	24

5.1.5	Chemikálie .....	24
<b>5.2</b>	<b>Příprava roztoků .....</b>	<b>24</b>
5.2.1	Příprava zásobního roztoku standardu pro optimalizaci metody .....	24
5.2.2	Příprava zásobního roztoku pro kalibraci .....	24
5.2.3	Příprava zásobního roztoku standardu pro validaci metody a stanovení analytů v potravních doplňcích .....	24
5.2.4	Příprava pracovního roztoku standardu pro výtěžnost .....	25
5.2.5	Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu .....	25
5.2.6	Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu .....	25
5.2.7	Příprava pracovních roztoků pro kalibraci .....	25
<b>5.3</b>	<b>Přípravy vzorků .....</b>	<b>26</b>
5.3.1	Přesnost a Stanovení obsahu .....	26
5.3.1.1	A1 – Resveratrol 800 RX .....	26
5.3.1.2	Evelor Resveratrol 50 mg .....	26
5.3.1.3	Walmark Lecithin s resveratrolem .....	26
5.3.1.4	Resveratrol MAX .....	26
5.3.1.5	Resveratrol antiaging .....	27
5.3.1.6	Indonal Partner for Woman .....	27
5.3.2	Správnost .....	27
5.3.2.1	A1 – Resveratrol 800 RX .....	27
5.3.2.2	Evelor Resveratrol 50 mg .....	27
5.3.2.3	Resveratrol MAX .....	28
5.3.2.4	Indonal Partner for Woman .....	28
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>29</b>
<b>6.1</b>	<b>Optimalizace metody .....</b>	<b>29</b>
6.1.1	Volba vlnové délky .....	29
6.1.1.1	Absorpční spektrum polydatinu .....	30
6.1.1.2	Absorpční spektrum <i>p</i> -nitrofenolu .....	30
6.1.1.3	Absorpční spektrum resveratrolu .....	31
6.1.2	Volba kolony a mobilní fáze .....	31
6.1.2.1	Kolona Ascentis Express RP-amide C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 μm .....	31
6.1.2.2	Kolona Ascentis Express C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 μm .....	33
6.1.2.3	Kolona Ascentis Express F5 100 x 4,6 mm; 2,7 μm .....	34
6.1.2.4	Kolona Ascentis Express PHENYL-HEXYL 100 x 4,6 mm; 2,7 μm .....	35
6.1.2.5	Kolona Ascentis Express ES-Cyano 150 x 4,6 mm; 2,7 μm .....	36

6.1.2.6	Kolona Chromolith SpeedROD NH <sub>2</sub> 50 mm x 4,6 μm (HILIC) .....	37
6.1.2.7	Kolona Ascentis Express ES-Cyano 100 x 3,0 mm; 2,7 μm .....	37
6.1.2.8	Kolona Ascentis Express C-18 100 x 3,0 mm; 2,7 μm .....	38
6.1.2.9	Kolona Ascentis Express Phenyl Hexyl 100 x 3,0 mm; 2,7 μm .....	38
6.1.2.10	Kolona Ascentis Express F5 100 x 3,0 mm; 2,7 μm .....	39
6.1.3	Volba vnitřního standardu .....	40
6.1.4	Volba teploty .....	41
6.1.5	Optimální podmínky pro HPLC analýzu .....	42
<b>6.2</b>	<b>Validace analytické metody .....</b>	<b>43</b>
6.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému .....	43
6.2.1.1	Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater. ....	43
6.2.1.2	Faktor asymetrie chromatografických píků .....	43
6.2.1.3	Rozlišení chromatografických píků (R <sub>s</sub> ) .....	43
6.2.2	Linearita .....	43
6.2.2.1	Kalibrační závislost pro polydatin .....	44
6.2.2.2	Kalibrační závislost pro resveratrol .....	45
6.2.3	Opakovatelnost .....	46
6.2.4	Přesnost .....	47
6.2.4.1	A1 – Resveratrol 800 RX .....	47
6.2.4.2	Evelor Resveratrol 50 mg .....	48
6.2.4.3	Resveratrol MAX .....	48
6.2.4.4	Indonal Partner for Woman .....	49
6.2.5	Správnost .....	50
6.2.5.1	A1 – Resveratrol 800 RX .....	50
6.2.5.2	Evelor Resveratrol 50 mg .....	51
6.2.5.3	Resveratrol MAX .....	51
6.2.5.4	Indonal Partner for Woman .....	52
<b>6.3</b>	<b>Robustnost .....</b>	<b>53</b>
6.3.1	Vliv složení mobilní fáze .....	53
6.3.2	Vliv teploty .....	54
6.3.3	Vliv délky ultrazvukové lázně .....	56
<b>6.4</b>	<b>Stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích .....</b>	<b>57</b>
6.4.1	Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku A1 – Resveratrol 800 RX .....	58
6.4.2	Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Evelor Resveratrol 50 mg .....	59
6.4.3	Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Resveratrol MAX .....	60



6.4.4	Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Walmark Lecithin s resveratrolem.	61
6.4.5	Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Resveratrol antiaging.....	62
6.4.6	Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Indonal Partner for Woman .....	63
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK .....</b>	<b>67</b>
<b>8.1</b>	<b>Obrázky .....</b>	<b>67</b>
<b>8.2</b>	<b>Tabulky.....</b>	<b>69</b>
<b>9</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>70</b>

## 1 Seznam použitých zkratk

ACN	-	Acetonitril
$A_i$	-	Absolutní plocha chromatografického píku
$A_r$	-	Relativní plocha chromatografického píku
$A_s$	-	Faktor asymetrie chromatografického píku
DAD	-	Diode array detector
Fused-core	-	Technologie pevného jádra
HPLC	-	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IS	-	Vnitřní standard
MeOH	-	Methanol
MF	-	Mobilní fáze
N	-	Počet teoretických pater
NAD <sup>+</sup>	-	Nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
PO	-	Polydatin
RE	-	Resveratrol
ROS	-	Reaktivní formy kyslíku
$R_s$	-	Rozlišení chromatografických píků
RSD	-	Relativní směrodatná odchylka
SD	-	Směrodatná odchylka
SIRT1	-	(NAD <sup>+</sup> )-dependentní protein deacetyláza Sirtuin 1
tab.	-	Tableta
tob.	-	Tobolka
$t_r$	-	Retenční čas
v/v	-	Objemová procenta
UV	-	Ultrafialová oblast spektra světla
UZ	-	Ultrazvuková lázeň
VIS	-	Viditelná oblast spektra světla
$w_{1/2}$	-	Šířka chromatografického píku v polovině jeho výšky

## 2 Úvod

Resveratrol patří do skupiny látek označovaných jako fytoalexiny lze nalézt v rozličných rostlinných druzích a to především v hroznech vinné révy, arašíděch, v moruších, ale také i borůvkách nebo brusinkách a ve víně, zejména v červeném [1,2]. V současné době se resveratrol běžně extrahuje z červených hroznů a je komerčně dostupný v aplikační formě tablet nebo tobolek.

Resveratrol se v přírodě vyskytuje v *cis*- a *trans*- stereoizomerních formách. Běžně se vyskytuje v glykované podobě známé jako polydatin. Obě tyto podoby vykazují pozitivní farmakologickou aktivitu v celé řadě lidských onemocnění, jako jsou kardiovaskulární choroby, diabetes mellitus, neurodegenerativní a nádorová onemocnění. Antioxidační a protizánětlivé účinky resveratrolu zabraňují oxidativnímu stresu a jeho prohlubování, které je s těmito onemocněními asociováno. Přesto je potřeba dalších studií potvrzující účinky resveratrolu, které v současné době vychází především z experimentálních testů na buněčných kulturách nebo zvířatech [4].

V současné době je vysokoúčinná kapalinová chromatografie nejužívanější metodou pro stanovení resveratrolu ať už ve víně, tak i jiných aplikačních formách [1,2,5,6,7]. Možnosti jeho stanovení dle dostupné literatury jsou uvedeny v teoretické části. Trendem současné HPLC analýzy je využívání kolon založených na technologii částic s pevným jádrem (Fused-core), mezi něž patří i kolony Ascentis Express [3].

V experimentální části této práce byla vyvinuta a validována rychlá HPLC metoda pro současné stanovení resveratrolu a polydatinu. Získanou metodou bylo analyzováno množství resveratrolu v potravních doplňcích a výsledné hodnoty byly porovnány s obsahem deklarovaným výrobcem.

### **3 Cíl a zadání práce**

Cílem diplomové práce bylo vyvinout a validovat optimalizovanou HPLC metodu pro současné stanovení resveratrolu a polydatinu v potravních doplňcích a následně dle této metody ověřit deklarovaný obsah zmíněných analytů ve vybraných potravních doplňcích.

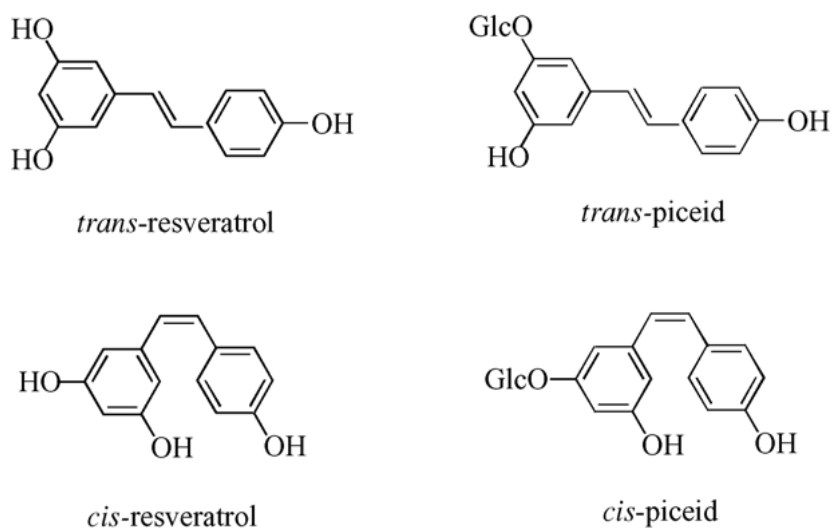
Optimalizace metody byla prováděna tak, aby při zachování vysoké přesnosti a spolehlivosti byla současně doba analýzy co nejkratší.

## 4 Teoretická část

### 4.1 Resveratrol

#### 4.1.1 Původ, struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilben) je produkován rozličnými druhy rostlin, například ho nalezneme v hroznech vinné révy, arašídech, v moruších, ale také i borůvkách nebo brusinkách. Patří do skupiny látek označovaných jako fytoalexiny, což jsou sloučeniny tvořené v rostlinách při jejich napadení patogenními organismy. Poprvé byl resveratrol izolován v roce 1963 z kořene křídlatky kopinaté (*Polygonum cuspidatum*) [4].



Obrázek 1 – Chemická struktura stereoizomerních forem resveratrolu a polydatinu [6]

Resveratrol se v přírodě vyskytuje v *cis*- a *trans*- stereoizomerních formách. Běžně se vyskytuje v glykované podobě známé jako polydatin (resveratrol-3-O-β-D-glukosid). Přirozeně se vyskytují obě stereoizomerní formy resveratrolu a zdá se, že každá jeví různé účinky, přesto je *trans*- forma v přírodě preferovanější a relativně stabilní. K izomeraci na *cis*- formu dochází, pokud dojde k ozáření ultrafialovým spektrem světla [4,6].

Resveratrol je lipofilní sloučenina rozpustná v ethanolu (50 mg/ml) a v DMSO (alespoň 16 mg/ml). Ve vodě je rozpustná pouze velmi slabě a to jen po nezbytném zahřátí (3 mg/100 ml). Polydatin je vzhledem k navázanému monosacharidu hydrofilnější sloučeninou, která je rozpustná ve vodě (1 mg/ml), dobře v DMSO (78 mg/ml), methanolu a ethanolu (1 mg/ml). Resveratrol lze z hlediska disociační konstanty zařadit mezi slabé kyseliny, čemuž odpovídají jeho hodnoty pKa pro každou fenolovou skupinu 9,07; 10,06 a 11,56. Kalkulovaná hodnota u polydatinu je 9,21 [10,19,31].

V současné době se resveratrol běžně extrahuje z červených hroznů. Bylo zjištěno, že v jednom gramu slupek čerstvých hroznů se nachází kolem 50 až 100 µg resveratrolu [4]. Koncentrace resveratrolu v červeném víně je uváděna v závislosti na odrůdě v rozmezí 0,7 - 3,75 mg/l [2,5,6,], některé studie však uvádějí i koncentrace mnohem větší, a to až do hodnoty 12,59 mg/l [4,7]. Relevantní nebo optimální denní dávka resveratrolu vykazující účinek byla stanovena v závislosti na zamýšleném užití od 10 mg do 2,0 g [21].

#### **4.1.2 Farmakologická aktivita**

Resveratrol má mnoho cílových receptorů v organismu, na kterých se projevují jeho účinky. Dle současných studií je uváděn pozitivní efekt resveratrolu (ve smyslu jeho glykované i neglykované podoby) u následujících indikací: modulace buněčné proliferace a apoptózy, modulace angiogeneze, inhibice metastáz, potlačování adipogeneze a stimulace lipolýzy, anti-diabetická aktivita, modulace mitochondriální aktivity, modulace prozánětlivých signálních drah, anti-genotoxické účinky indukované ethanolem, anti-neurodegenerativní účinky, modulace glutamátového metabolismu, protinádorová aktivita, zlepšení endoteliální funkce, modulace autofagocytózy [4,21].

Oxidativní stres má důležitou roli v apoptóze buněk a přispívá k patogenezi kardiovaskulárních chorob. Dosavadní výzkum ukazuje na to, že resveratrol aktivuje regulační proteiny a že jeho protektivní efekt je závislý především na SIRT1. SIRT 1 patří do rodiny (NAD<sup>+</sup>)-dependentních protein deacetyláz, která má celkem 7 členů. Jejich aktivace je prospěšná u metabolických, neurodegenerativních, zánětlivých a neoplastických onemocnění. Je zaznamenáno, že SIRT1 může zachovat mitochondriální funkci a snižovat oxidativní poškození myokardu během ischemické reperfúze. Přesný mechanismus, kterým SIRT1 kontroluje mitochondriální genovou expresi a zabraňuje oxidativnímu stresu, zatím zůstává ne zcela objasněn. Mitochondrie jsou důležité komponenty buněčné energie a jejich dysfunkce je zahrnuta v řadě chorob. Mitochondrie neprodukují pouze energii skrz buněčné dýchání, ale také regulují buněčný metabolismus a produkují reaktivní formy kyslíku (ROS), které mohou způsobovat oxidativní stres a regulovat programovanou buněčnou smrt [32].

#### **4.1.3 Farmakokinetika**

Resveratrol a polydatin vstupem do organismu podléhají metabolickým přeměnám na produkty II. fáze biotransformace. Patří mezi ně především konjugáty s kyselinou glukuronovou a sulfáty [9]. U některých těchto metabolitů byla zaznamenána podobná prospěšná aktivita, jako u původních látek před biotransformací, což vysvětluje, proč jsou zachovány účinky resveratrolu i přes jeho rychlou biotransformaci [9,33]. Naopak u polydatinu, který má v pozici

C-3 substituovanou fenolovou skupinu, díky konformačním změnám molekuly oproti resveratrolu dochází k změně biologických vlastností. Polydatin je více rezistentní k enzymatickým oxidacím než resveratrol, je rozpustný ve vodě a na rozdíl od resveratrolu, který proniká do buňky pasivně, vstupuje polydatin aktivním mechanismem využívajícím glukózoové přenašeče. Tyto vlastnosti činí polydatin molekulou s větší biodostupností [33].

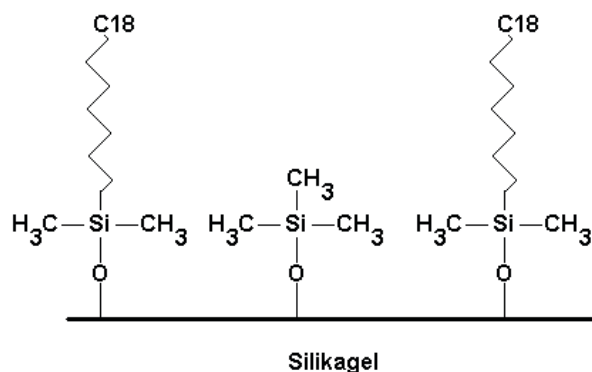
## **4.2 Instrumentace HPLC**

Chromatografický systém se obecně sestává ze zásobníků mobilních fází, odplynovacího zařízení, čerpadel, směšovací jednotky, automatického dávkovače (autosampleru), termostatovaného kolonového prostoru, chromatografické kolony (popř. předkolony), detektoru a vyhodnocovacího zařízení [24].

### **4.2.1 Chromatografické kolony**

Kolona je jedna ze základních součástí každé HPLC sestavy. Kolony, které jsou dnes nejvíce využívány, jsou tvořeny ocelovou nebo plastovou trubicí, ve které je uzavřena náplň. Ta je tvořena sorbentem, jehož povrch se využívá přímo jako stacionární fáze nebo je vhodnou stacionární fází modifikován. Dle charakteru sorbentu se pak kolony dělí na náplňové a monolitické. Mezi nejvíce využívaný materiál pro výrobu sorbentu patří silikagel. Částice s přesně daným průměrem a velikostí pórů mají povrch pokrytý silanolovými skupinami, které lze modifikovat [25].

Povrch silikagelu je nejčastěji modifikován reakcemi, při kterých dochází k substituci silanolových skupin nepolární skupinou. Připravené chemicky vázané stacionární fáze přesto obsahují zbytkové polární silanolové skupiny, a to až 50 %, což může mít za následek nežádoucí interakce s analytem a mobilní fází. Příčinou toho je pak rostoucí retence a chvostování píků, zejména u bazických látek. Jedním z možných řešení je „endcapping“. Jde o fyzikálně-chemický proces, který snižuje počet volných silanolových skupin chemickou reakcí s malými silany (např. trimethylchlorsilanem). Tyto silany mají menší molekuly, tudíž mohou pokrýt stericly bráněné volné silanolové skupiny, jako je znázorněno na Obrázku 2 [25,28].



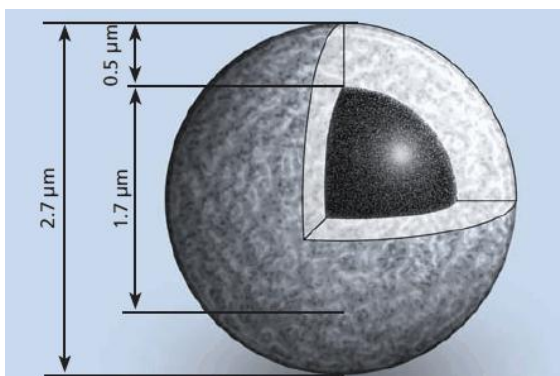
Obrázek 2 – Znázornění endcappingu[28]

Vzhledem k rozličným aplikacím kapalinové chromatografie existuje velké množství kolon různé délky, vnitřního průměru a náplně [22].

#### 4.2.1.1 Ascentis Express Fused-Core HPLC kolony

Kolony Ascentis Express založené na inovativní technologii částic s pevným jádrem zajišťují vysokou rychlost, účinnost a v porovnání s klasickými kolonami stejné délky vykazují přibližně poloviční zpětný tlak. Jak naznačuje Obrázek 3, částice jsou tvořeny pevným silikagelovým jádrem o průměr 1,7  $\mu\text{m}$  okolo kterého je 0,5  $\mu\text{m}$  široký porézní obal silikagelu vysoké čistoty. Oproti srovnatelně velké porózní částici bez jádra je difúzní vrstva užší, analyt neproniká do jádra, což má za následek ostřejší píky a možnost použití vyšších průtokových rychlostí. Mimo to zvýšená účinnost kolon Ascentis Express umožňuje používat kratší kolony a tím snižovat spotřebu rozpouštědel používaných v mobilních fázích [27,29].

Kolony Ascentis Express plněné fused-core částicemi o velikosti 2,7  $\mu\text{m}$  vykazují velkou separační účinnost s mírným pracovním tlakem. Stejného výkonu je dosaženo jak při gradientním, tak i izokratickém módu separace [23].

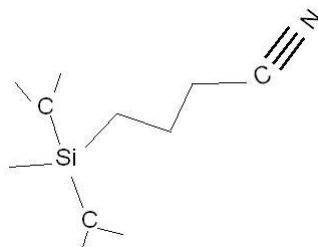


Obrázek 3 – Struktura Fused-Core částice [26]



#### 4.2.1.2 Ascentis Express ES-Cyano HPLC kolona

Kolona Ascentis Express ES-Cyano přináší modifikaci silikagelového porézního obalu v podobě diisopropyl-kyanopropylsilanové stacionární fáze. Ta je středně polární povahy a vysoce vhodná pro separaci polárních a nepolárních organických sloučenin bazického, kyselého nebo neutrálního charakteru.



Obrázek 4 – Strukturální vzorec stacionární fáze ES-Cyano [30]

Předností kolony je rozsáhlý endcapping a sterická chráněná navázaná nitrilová fáze s extrémně vysokou odolností vůči kyselinou katalyzované hydrolýze siloxanových vazeb, které vážou kyanopropylový řetězec k povrchu silikagelového obalu. Vzhledem k tomu je kolonou velmi dobře tolerována kombinace nízkého pH a vyšší pracovní teploty [3,29].

### 4.3 Možnosti stanovení resveratrolu a polydatinu

Je popsáno mnoho metod pro stanovení resveratrolu a polydatinu ve víně [2,5,6,7,9] nebo v krevní plasmě [1,14]. Mezi ně též patří separační postupy využívající instrumentaci vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Méně je v literatuře popsána analýza resveratrolu po extrakci z pevných aplikačních forem – tablet či tobolek. K detekci analytů je v mnoha metodách využíván DAD. V následujících kapitolách jsou uvedené metody stanovení analytů a metoda extrakce z pevné aplikační formy popsané v literatuře.

#### 4.3.1 Metody stanovení resveratrolu

Byla vyvinuta metoda separace využívající Hypersil C<sub>18</sub> kolonu (250 x 4,6 mm, 5 μm), jako mobilní fázi směs 0,5% kyseliny octové v methanolu a destilovanou vodu v poměru 52:48 s průtokem 1 ml/min, detekci UV-VIS detektorem při vlnové délce 303 nm, nástřik 25 μl a laboratorní teplotu. Retenční čas analytu při separaci byl 10 min [1].

V další metodě byla použita Waters Nova-Pack C<sub>18</sub> kolona (150 x 3,9 mm, 4 μm), mobilní fáze v režimu lineárního gradientu ve složení roztoku A jako methanol-kyselina octová-voda (10:2:88) a roztoku B jako methanol-kyselina octová-voda (90:2:8) s celkovým průtokem 1,0 ml/min. Bylo využito dvojí detekce, a to UV detektorem při 280 nm a fluorescenčním

detektorem při excitační vlnové délce 360 nm a emisní 374 nm. Objem nástřiku vzorku na kolonu byl 20  $\mu$ l. Retenční čas resveratrolu byl při analýze 24 min [2].

Dále literatura uvádí metodu, v níž bylo využito monolitické kolony Chromolith Performance RP-18e (100 x 4,6 mm) a mobilní fáze v podobě roztoku 0,1% kyseliny octové ve vodě a roztoku 0,1% kyseliny octové v methanolu v poměru 70:30 s průtokem 5 ml/min. Detekce UV detektorem probíhala při 310 nm a fluorescenčním detektorem při excitační vlnové délce 310 nm a emisní 403 nm. Teplota analýzy byla nastavena na 25°C, eluční čas analytu byl 2,0 min [5].

Kromasil C18 analytická kolona (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) a směs 0,5% kyseliny octové v methanolu a destilované vody v poměru 50:50 jako mobilní fáze s průtokem 1,0 ml/min byly použity v jedné z dalších metod. Detekce UV spektrofotometrem probíhala při vlnové délce 304 nm a 286 nm. Nástřik vzorku na kolonu byl v objemu 50  $\mu$ l, při teplotě 30°C. Retenční čas resveratrolu byl 11 min [8].

V poslední uvedené metodě pro stanovení resveratrolu byla použita C18 RP Nucleosil kolona (250 x 4 mm, 5  $\mu$ m), mobilní fáze jako směs 25% ACN, 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a NaCl (c = 5 mmol/l) v demineralizované vodě v režimu izokratické eluce o průtoku 1,0 ml/min. Byla využita UV detekce při vlnové délce 306 nm, nástřik 20  $\mu$ l a laboratorní teplota. Retenční čas analytu byl 18,8 min [12].

#### **4.3.2 Metody současného stanovení resveratrolu a polydatinu**

V uvedené metodě byla pro současné stanovení resveratrolu a polydatinu použita Chromolith Performance RP-18e monolitická kolona (100 x 4,6 mm), mobilní fáze v režimu gradientu s roztoky voda-kyselina octová (94:6) a voda-acetonitril-kyselina octová (65:30:5) s celkovým průtokem 7,0 ml/min. Byla využita detekce UV detektorem při 285 a 306 nm. Nástřik vzorku na kolonu byl 20  $\mu$ l. Retenční čas polydatinu dosáhl hodnoty 5,7 min a resveratrolu 10,2 min [6].

V další metodě bylo využito kolony Symmetry C<sub>18</sub> (150 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m), mobilní fáze v režimu gradientu s roztokem vody upravené kyselinou sírovou na pH 2,5 a čistým acetonitrilem s celkovým průtokem 0,2 ml/min. Byla zvolena detekce DAD při 240 nm a 305 nm a nástřik vzorku na kolonu 50  $\mu$ l. Celková doba analýzy přesahovala 60 min [7].

V třetí uvedené metodě byla použita Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> kolona (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), mobilní fáze v režimu gradientové eluce ve složení acetonitril (složka A) a voda obsahující 0,1% kyselinu mravenčí (složka B) s celkovým průtokem 1,0 ml/min. DAD byl použit pro detekci při 306 nm. Nástřik vzorku byl 10  $\mu$ l a teplota 25°C. Retenční čas polydatinu byl 14,1 min a resveratrolu 26,4 min [20].

### 4.3.3 Metoda extrakce resveratrolu a polydatinu

Resveratrol a polydatin byly z aplikační formy potravního doplňku extrahovány tak, že 10 homogenizovaných tablet bylo mixováno s 10 ml směsí methanolu a vody (80:20) po dobu 15 minut. Před analýzou byl roztok přefiltrován přes 0,45 µm PTFE filtr [9].

Další metoda uvádí, že 20 šumivých tablet bylo rozdrceno na prášek, který byl zhomogenizován. Odpovídající množství prášku bylo zředěno ve 25 ml směsí methanol/voda 60:40, potřepáno a vloženo na 10 min do ultrazvukové lázně. Poté byl 1 ml směsí zcentrifugován a k analýze bylo použito 250 µl zředěného supernatantu [13].

## 4.4 Zacházení s roztoky vzorků a standardů

Literatura uvádí, že nejčastěji byly standardy a vzorky rozpuštěny v methanolu [1,5,8]. Roztoky byly uchovávány v temnu, aby nedocházelo k přeměně *trans*-resveratrolu na izomerní *cis*- formu podmíněné působením slunečního světla nebo UV zářením o vlnové délce 254 nm [8] a při teplotách od -20°C do 4°C [1,2,5] pro udržení stability standardů až po 2 měsíce uchovávání [1]. Při analýze byla využívána mobilní fáze s nižším pH, protože *trans*- formy resveratrolu a polydatinu se při vyšším pH stávají nestabilními [33].

## 4.5 Validace metody

Validace HPLC metody je proces, který má potvrdit, že HPLC procedura vyvinutá pro specifickou analýzu je vhodná pro své zamýšlené užití. Výsledky validace mohou být použity k posouzení kvality, spolehlivosti a stálosti výsledků prováděných analýz [16].

### 4.5.1 Test vhodnosti chromatografického systému

#### 4.5.1.1 Zdánlivý počet teoretických pater

Počet teoretických pater je nepřímá hodnota pro šířku daného píku v určitém retenčním čase a určuje účinnost kolony. Kolona s vyšším počtem teoretických pater je považována za účinnější a má v daný retenční čas užší pík, než kolona s nižším počtem [15].

#### 4.5.1.2 Faktor asymetrie chromatografických píků - $A_s$

Faktor asymetrie určuje míru souměrnosti chromatografického píku. Téměř každý chromatografický pík vykazuje jistý stupeň chvostování nebo frontování. Akceptovatelné hodnoty faktoru asymetrie leží v rozmezí 0,9 (nepatrné frontování) až 1,5 (mírné chvostování) [17].

#### **4.5.1.3 Rozlišení chromatografických píků - $R_s$**

Rozlišení chromatografických píků udává schopnost vzájemné separace dvou látek. Vychází ze vzdálenosti maxim dvou píků a zároveň bere v potaz i šířky obou píků. K základnímu rozdělení píků dochází běžně při hodnotě rozlišení 1,50. Hodnota vyšší než 1,50 indikuje výraznější separaci píků, naopak hodnota nižší ukazuje jistý stupeň splývání [15].

#### **4.5.2 Linearita**

Linearita je schopnost metody získat v daném rozmezí výsledky analýzy úměrně ke koncentraci analytu. Pro hodnocení linearity je nezbytné proměřit minimálně 6 nezávislých koncentračních hladin a dle výsledků sestavit kalibrační křivku [11]. Těsnost závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient. Čím více se jeho hodnoty blíží jedné, tím je závislost těsnější [18].

#### **4.5.3 Přesnost**

Za přesnost metody je považována těsnost shody mezi nezávislými výsledky měření získaných za stanovených podmínek [11]. Míra přesnosti se vyjadřuje jako směrodatná odchylka výsledků zkoušek (RSD) [18].

#### **4.5.4 Opakovatelnost**

Opakovatelnost metody je definována jako přesnost nezávislých výsledků měření získaných na identickém materiálu ve stejné laboratoři stejným operátorem použitím stejného vybavení v časově krátkém intervalu. Vyjádřením opakovatelnosti je hodnota směrodatné odchylky (RSD) [11].

#### **4.5.5 Správnost**

Pravdivost metody je chápána jako těsnost shody mezi očekávaným výsledkem měření (předpokládaná střední hodnota) a přijatou referenční hodnotou (skutečná hodnota). Vyjádřením pravdivosti metody je výtěžnost (frakce analytu přidaná do testovaného vzorku před analýzou, která je metodou měřena) udávaná v procentech. Cíl analytické metody je dosáhnout skutečné hodnoty koncentrace stanovovaných látek. Při extrakci analytů z komplexní matrice do jednoduššího roztoku však dochází k určitým ztrátám. Následkem toho jsou pak naměřené koncentrace nižší, než skutečné hodnoty analytů v původní matrici. Akceptovatelné hodnoty výtěžnosti se u velmi nízkých koncentrací analytů v roztocích pohybují v rozmezí 80 – 110 % [11].

#### **4.5.6 Robustnost**

Robustnost metody je vyjádřena jako schopnost analytické procedury zůstat nezměněna působením malých, ale záměrných variací v parametrech provedení metody, které zajišťují indikaci její spolehlivosti v průběhu běžného použití [11].

## 5 Experimentální část

### 5.1 Materiál, přístroje a pomůcky

#### 5.1.1 Přístroje, podmínky separace

Analýzy byly provedeny pomocí chromatografického systému Shimadzu LC-10. Sestava systému je uvedena v Tabulce 1.

*Tabulka 1 – Chromatografický systém*

Chromatograf:	Shimadzu 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

Dávkováno na kolonu bylo 5 $\mu$ l roztoku. Mobilní fáze o složení acetonitril/0,5% kyselina octová měla průtokovou rychlost 1,0 ml/min. Analýzy probíhaly v rozmezí teplot 30 - 60°C. Analyty byly detekovány při vlnové délce 305 nm. Vyhodnocení bylo provedeno chromatografickým softwarem LC Solution. Testované kolony jsou uvedené v Tabulce 2.

*Tabulka 2 – Testované kolony*

Kolony:	1. Ascentis <sup>®</sup> Express RP-Amide C18 100 x 4,6 mm, 2,7 $\mu$ m Supelco Analytical (Sigma – Aldrich)
	2. Ascentis <sup>®</sup> Express C18 100 x 4,6 mm, 2,7 $\mu$ m Supelco Analytical (Sigma – Aldrich)
	3. Ascentis <sup>®</sup> Express F5 100 x 4,6 mm, 2,7 $\mu$ m Supelco Analytical (Sigma – Aldrich)
	4. Ascentis <sup>®</sup> Express PHENYL-HEXYL 100 x 4,6 mm, 2,7 $\mu$ m Supelco Analytical (Sigma – Aldrich)

5. Ascentis<sup>®</sup> Express ES-Cyano  
150 x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m  
Supelco Analytical (Sigma – Aldrich)
6. Chromolith SpeedROD NH<sub>2</sub>  
50 mm x 4,6  $\mu$ m  
(Merck)
7. Ascentis<sup>®</sup> Express ES-Cyano  
100 x 3,0 mm, 2,7  $\mu$ m  
Supelco Analytical (Sigma – Aldrich)
8. Ascentis<sup>®</sup> Express C18  
100 x 3,0 mm, 2,7  $\mu$ m  
Supelco Analytical (Sigma – Aldrich)
9. Ascentis<sup>®</sup> Express PHENYL-HEXYL  
100 x 3,0 mm, 2,7  $\mu$ m  
Supelco Analytical (Sigma – Aldrich)
10. Ascentis<sup>®</sup> Express F5  
100 x 3,0 mm, 2,7  $\mu$ m  
Supelco Analytical (Sigma – Aldrich)

### 5.1.2 Pomůcky

Ultrazvuková lázeň (Bandelin SONOREX RK52, SRN)

Analytické váhy (Sartorius 2004 MP, SRN)

PTFE filtry o velikosti pórů 0,45  $\mu$ m

Pipety (BRAND)

Třecí miska s tloučkem

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

### 5.1.3 Standardy

Resveratrol 99% (Sigma – Aldrich)

Polydatin 95% (Sigma – Aldrich)

*p*-Nitrofenol (LACHEMA – Brno)

#### **5.1.4 Analyzované potravinové doplňky**

A1 Resveratrol 800 RX, výrobce: A1 Pharma s.r.o., složení: 80 mg v jedné tabletě.

Evelor Resveratrol 50 mg, výrobce: Medochemie, složení: 50 mg v jedné tobolce.

Walmark Lecithin s resveratrolem, výrobce: Walmark, složení: 10 mg 2% resveratrolu v jedné tabletě.

Resveratrol MAX, výrobce: Tachyon, složení: 80 mg v jedné tabletě.

Resveratrol antiaging, výrobce: TheraTech, složení: 50 mg v jedné kapsli.

Indonal Partner for Woman, výrobce: Synergia, složení: resveratrol 20% 100 mg v jedné kapsli.

#### **5.1.5 Chemikálie**

Acetonitril – gradient grade (Sigma – Aldrich)

Methanol – gradient grade (Sigma – Aldrich)

Kyselina octová ledová (Sigma – Aldrich)

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

## **5.2 Příprava roztoků**

### **5.2.1 Příprava zásobního roztoku standardu pro optimalizaci metody**

Zásobní roztok standardu resveratrolu o koncentraci 4920 mg/l byl připraven rozpuštěním 49,20 mg resveratrolu v methanolu a doplněním methanolem po rysku v odměrné baňce o objemu 10,0 ml. Zásobní roztok polydatinu o koncentraci 5000 mg/l byl připraven rozpuštěním 50,00 mg polydatinu v methanolu a doplněním methanolem po rysku v odměrné baňce o objemu 10,0 ml. Roztoky byly uchovávány při teplotě 4°C.

### **5.2.2 Příprava zásobního roztoku pro kalibraci**

Zásobní roztok pro kalibraci byl připraven jako směsný roztok o koncentraci 500 mg/l smísením 2,54 ml zásobního roztoku standardu resveratrolu a 2,50 ml zásobního roztoku standardu polydatinu a doplněním methanolem po rysku v odměrné baňce o objemu 25,0 ml. Zásobní roztok byl uchováván při teplotě 4°C.

### **5.2.3 Příprava zásobního roztoku standardu pro validaci metody a stanovení analytů v potravních doplňcích**

Zásobní roztok standardu pro validaci byl připraven rozpuštěním 25,38 mg resveratrolu a 25,25 mg polydatinu v methanolu a doplněním methanolem po rysku v odměrné baňce o objemu 25,0 ml. Zásobní roztok bych uchováván při teplotě -18°C.



#### 5.2.4 Příprava pracovního roztoku standardu pro výtěžnost

Pracovní roztok standardu pro výtěžnost byl připraven smísením 25  $\mu$ l zásobního roztoku standardu pro validaci metody, 25  $\mu$ l pracovního roztoku vnitřního standardu o koncentraci 800 mg/l a 950  $\mu$ l methanolu.

#### 5.2.5 Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu

Zásobní roztok vnitřního standardu o koncentraci  $c = 10\,000$  mg/l byl připraven rozpuštěním 1,0005 g *p*-nitrofenolu v methanolu a doplněním methanolem po rysku v odměrné baňce o objemu 100,0 ml. Zásobní roztok byl uchováván při teplotě 4°C.

#### 5.2.6 Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu

Pracovní roztok vnitřního standardu o koncentraci  $c = 800$  mg/l byl připraven smísením 2 ml zásobního roztoku vnitřního standardu s methanolem po rysku v odměrné baňce o objemu 25,0 ml.

#### 5.2.7 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Pracovní roztoky pro kalibraci byly připraveny smísením zásobního roztoku pro kalibraci s rozpouštědlem a zásobním roztokem vnitřního standardu v poměrech uvedených v Tabulce 3. Vzniklé pracovní roztoky byly v rozmezí koncentrací od 5 mg/l do 500 mg/l.

Tabulka 3 – Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Koncentrace [mg/l]	Objem zás. roztoku [ $\mu$ l]	Objem MeOH [ $\mu$ l]	Objem IS [ $\mu$ l]
5	10	980	10
10	20	970	10
25	50	940	10
50	100	890	10
75	150	840	10
100	200	790	10
200	400	590	10
300	600	390	10
400	800	190	10
500	1000	0	0

## **5.3 Přípravy vzorků**

### **5.3.1 Přesnost a Stanovení obsahu**

#### **5.3.1.1 A1 – Resveratrol 800 RX**

Bylo zváženo pět tablet přípravku a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,3891 g. Tablety byly rozdrčeny a zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ tablety, tj. 0,1000 g. Naváženo bylo celkem 6 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Ke vzorku bylo přidáno 2,00 ml roztoku vnitřního standardu. Odměrná baňka byla doplněna po rysku MeOH. Tento roztok byl vložen na 15 minut do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok přefiltrován membránovým filtrem 0,45 µm a pro přípravu vzorku do vialky bylo napipetováno 25 µl tohoto roztoku a 975 µl MeOH.

#### **5.3.1.2 Evelor Resveratrol 50 mg**

Byl zvážen obsah pěti tobolek přípravku a byla stanovena průměrná hmotnost obsahu jedné tobolky, tj. 0,3023 g. Obsah tobolek byl zhomogenizován ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ½ obsahu tobolky, tj. 0,1500 g. Naváženo bylo celkem 6 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Ke vzorku bylo přidáno 2,00 ml roztoku vnitřního standardu. Odměrná baňka byla doplněna po rysku MeOH. Tento roztok byl vložen na 15 minut do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok přefiltrován membránovým filtrem 0,45 µm a pro přípravu vzorku do vialky bylo napipetováno 25 µl tohoto roztoku a 975 µl MeOH.

#### **5.3.1.3 Walmark Lecithin s resveratrolem**

Bylo zváženo deset tablet přípravku a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,7879 g. Tablety byly rozdrčeny a zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ½ tablety, tj. 0,4000 g. Naváženo bylo celkem 6 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Ke vzorku bylo přidáno 250 µl roztoku vnitřního standardu. Odměrná baňka byla doplněna po rysku MeOH. Tento roztok byl vložen na 15 minut do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok přefiltrován membránovým filtrem 0,45 µm a pro přípravu vzorku do vialky bylo napipetováno 200 µl tohoto roztoku a 800 µl MeOH.

#### **5.3.1.4 Resveratrol MAX**

Bylo zváženo pět tablet přípravku a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,4021 g. Tablety byly rozdrčeny a zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ tablety, tj. 0,1000 g. Naváženo bylo celkem 6 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Ke vzorku bylo přidáno 2,00 ml roztoku vnitřního standardu. Odměrná

baňka byla doplněna po rysku MeOH. Tento roztok byl vložen na 15 minut do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok přefiltrován membránovým filtrem 0,45 µm a pro přípravu vzorku do vialky bylo napipetováno 25 µl tohoto roztoku a 975 µl MeOH.

#### **5.3.1.5 Resveratrol antiaging**

Byl zvážěn obsah pěti tobolek přípravku a byla stanovena průměrná hmotnost obsahu jedné tobolky, tj. 0,2648 g. Obsah tobolek byl zhomogenizován ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ½ obsahu tobolky, tj. 0,1300 g. Naváženo bylo celkem 6 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Ke vzorku bylo přidáno 2,00 ml roztoku vnitřního standardu. Odměrná baňka byla doplněna po rysku MeOH. Tento roztok byl vložen na 15 minut do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok přefiltrován membránovým filtrem 0,45 µm a pro přípravu vzorku do vialky bylo napipetováno 25 µl tohoto roztoku a 975 µl MeOH.

#### **5.3.1.6 Indonal Partner for Woman**

Byl zvážěn obsah pěti tobolek přípravku a byla stanovena průměrná hmotnost obsahu jedné tobolky, tj. 0,3897 g. Obsah tobolek byl zhomogenizován ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ obsahu tobolky, tj. 0,1000 g. Naváženo bylo celkem 6 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Do vzorku bylo přidáno 2,00 ml roztoku vnitřního standardu. Odměrná baňka byla doplněna po rysku MeOH. Tento roztok byl vložen na 15 minut do ultrazvukové lázně. Poté byl roztok přefiltrován membránovým filtrem 0,45 µm a pro přípravu vzorku do vialky bylo napipetováno 25 µl tohoto roztoku a 975 µl MeOH.

### **5.3.2 Správnost**

#### **5.3.2.1 A1 – Resveratrol 800 RX**

Bylo zváženo pět tablet přípravku a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,3891 g. Tablety byly rozdrčeny a zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku bylo použito asi 2,5 mg směsi. Naváženo bylo celkem 5 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Ke vzorku bylo přidáno 50 µl roztoku vnitřního standardu a 625 µl roztoku standardu pro validaci. Odměrná baňka byla doplněna po rysku MeOH. Tento roztok byl vložen na 15 minut na ultrazvukovou lázeň. Poté byl roztok přefiltrován membránovým filtrem 0,45 µm do vialky.

#### **5.3.2.2 Evelor Resveratrol 50 mg**

Byl zvážěn obsah pěti tobolek přípravku a byla stanovena průměrná hmotnost obsahu jedné tobolky, tj. 0,3023 g. Obsah tobolek byl zhomogenizován ve třecí misce a pro přípravu

jednoho vzorku bylo použito asi 3,75 mg směsi. Naváženo bylo celkem 5 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Ke vzorku bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku vnitřního standardu a 625  $\mu$ l roztoku standardu pro validaci. Odměrná banka byla doplněna po rysku MeOH. Tento roztok byl vložen na 15 minut na ultrazvukovou lázeň. Poté byl roztok přefiltrován membránovým filtrem 0,45  $\mu$ m do vialky.

#### **5.3.2.3 Resveratrol MAX**

Bylo zváženo pět tablet přípravku a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,4021 g. Tablety byly rozdrčeny a zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku bylo použito asi 2,5 mg směsi. Naváženo bylo celkem 5 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Do vzorku bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku vnitřního standardu a 625  $\mu$ l roztoku standardu pro validaci. Odměrná banka byla doplněna po rysku MeOH. Tento roztok byl vložen na 15 minut na ultrazvukovou lázeň. Poté byl roztok přefiltrován membránovým filtrem 0,45  $\mu$ m do vialky.

#### **5.3.2.4 Indonal Partner for Woman**

Byl zvážen obsah pěti tobolek přípravku a byla stanovena průměrná hmotnost obsahu jedné tobolky, tj. 0,3897 g. Obsah tobolek byl zhomogenizován ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku bylo použito asi 2,5 mg směsi. Naváženy byly celkem 4 vzorky do 25 ml odměrných baněk. Do vzorku bylo přidáno 50  $\mu$ l roztoku vnitřního standardu a 625  $\mu$ l roztoku standardu pro validaci. Odměrná banka byla doplněna po rysku MeOH. Tento roztok byl vložen na 15 minut na ultrazvukovou lázeň. Poté byl roztok přefiltrován membránovým filtrem 0,45  $\mu$ m do vialky.

## 6 Výsledky a diskuze

### 6.1 Optimalizace metody

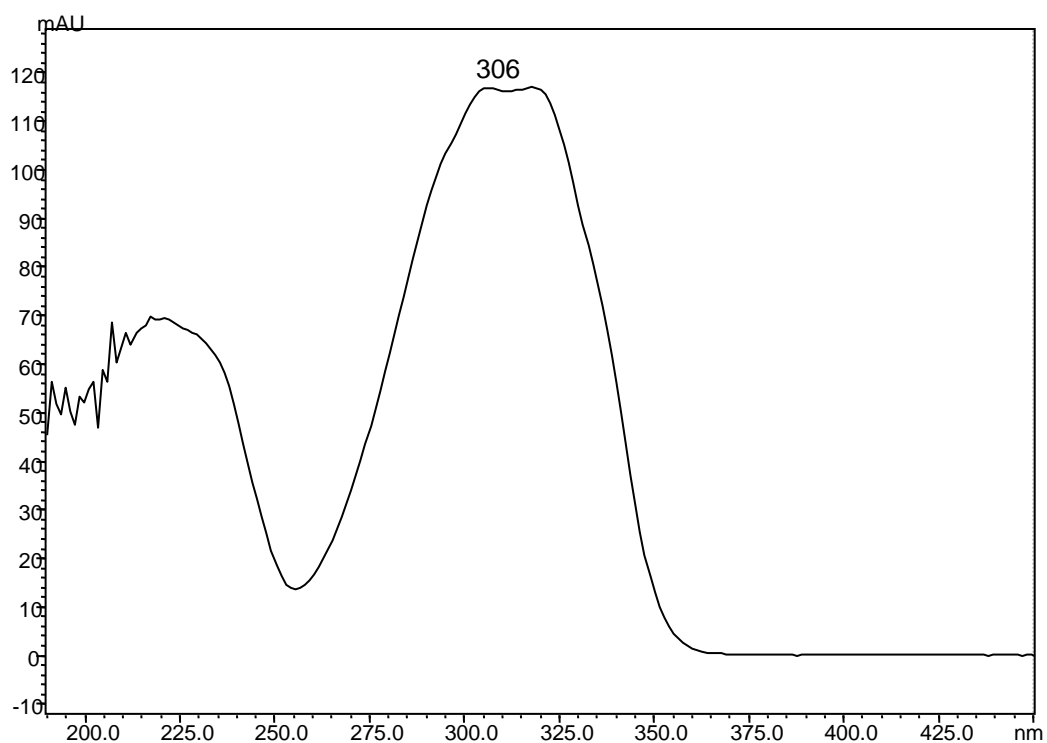
Cílem optimalizace metody bylo nalézt vhodnou kolonu, mobilní fázi, optimální vlnovou délku pro detekci, vnitřní standard a teplotu, za níž by analýza mohla probíhat, pro současné stanovení resveratrolu a polydatinu ve vzorcích potravních doplňků. Bylo žádoucí dosáhnout co nejkratší doby eluce analytů za současného zachování dobrého rozlišení píků jednotlivých látek na chromatogramu a přijatelného tlaku na koloně během analýzy. Pro optimalizaci metody byly použity zásobní roztoky standardu pro optimalizaci a zásobní roztok vnitřního standardu.

#### 6.1.1 Volba vlnové délky

Pomocí DAD detektoru byla změřena absorpční spektra analytů. Absorpční maximum polydatinu, zobrazené na Obrázku 5, bylo zjištěno při 306 nm. Absorpční maximum vnitřního standardu *p*-nitrofenolu, zobrazené na Obrázku 6, bylo zjištěno při 317 nm. Absorpční maximum resveratrolu, zobrazené na Obrázku 7, bylo zjištěno při 305 nm.

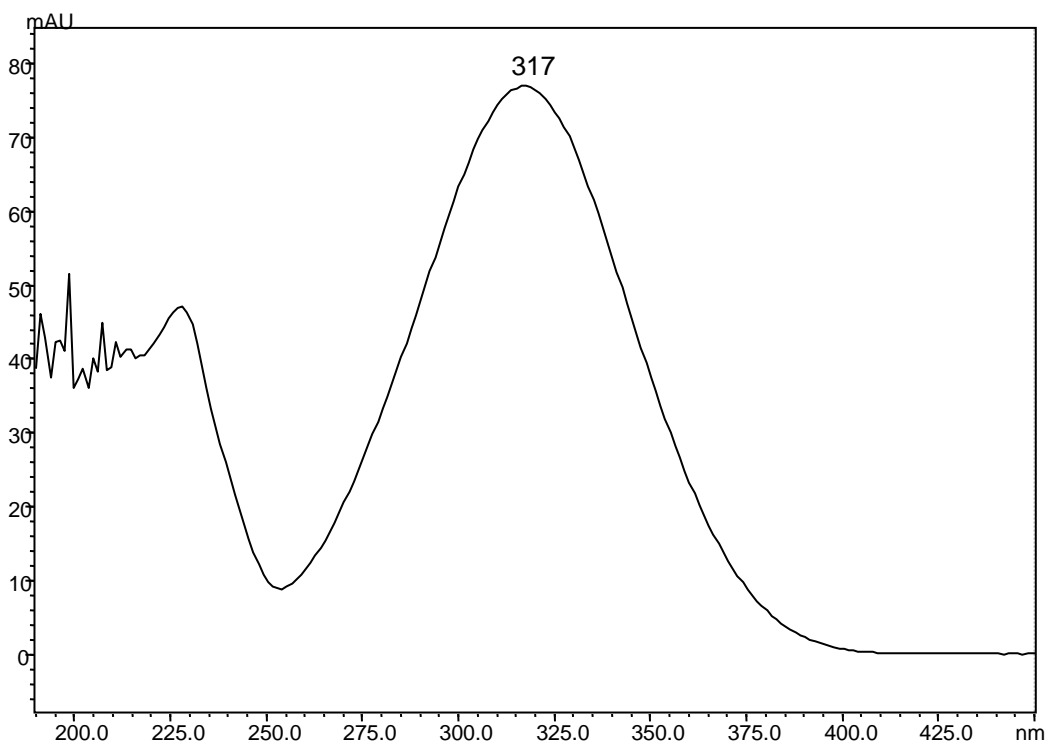
Byla zvolena vlnová délka 305 nm vyhovující současné detekci všech analyzovaných látek, při které zároveň nedocházelo k interferenci ze strany rozpouštědla a balastních látek.

### 6.1.1.1 Absorpční spektrum polydatinu



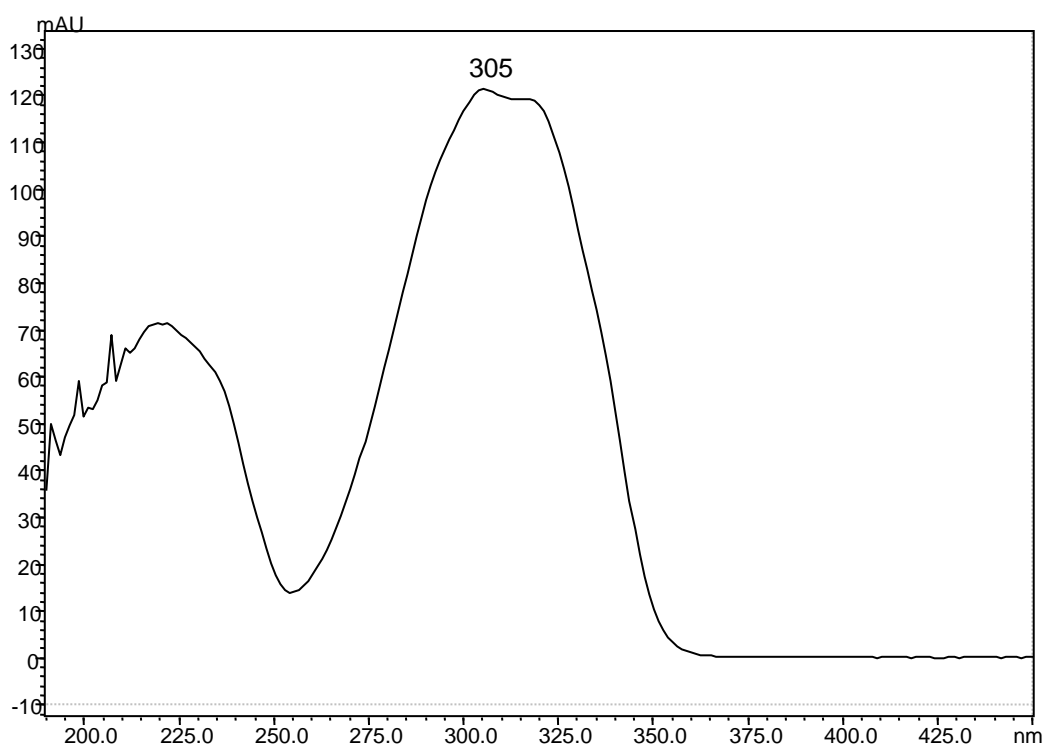
Obrázek 5 - Absorpční spektrum polydatinu

### 6.1.1.2 Absorpční spektrum *p*-nitrofenolu



Obrázek 6 - Absorpční spektrum *p*-nitrofenolu (vnitřní standard)

### 6.1.1.3 Absorpční spektrum resveratrolu



Obrázek 7 - Absorpční spektrum resveratrolu

### 6.1.2 Volba kolony a mobilní fáze

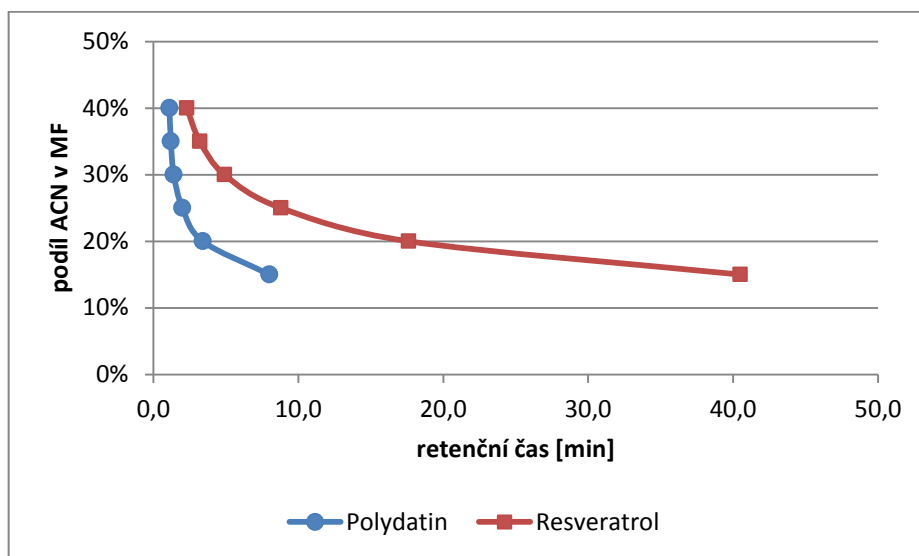
Na základě metod stanovení resveratrolu uvedených v teoretické části a vzhledem k charakteru stanovovaných látek bylo vybráno složení mobilní fáze acetonitril/0,5% kyselina octová. pH mobilní fáze odpovídalo přibližně hodnotě 3. Bylo testováno 6 možností složení mobilní fáze na 6 kolonách. Testována byla v poměrech 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65 a 40:60. Všechny testovací analýzy probíhaly při průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min a teplotě 50°C.

Celkem bylo testováno 10 kolon. Poslední 4 testované kolony měly shodné složení stacionární fáze jako již testované kolony, od nich se lišili pouze tím, že měly menší svůj vnitřní průměr a byly zvoleny k testování na základě výsledků měření prvních 6 kolon. Zároveň u těchto kolon byla testována pouze dvě složení mobilní fáze, která se jevila jako potenciálně vhodná v předcházejících měřeních. Cílem volby kolony bylo dosažení separace obou stanovovaných látek, vhodné šířky a symetrie píků a separace látek v přijatelném čase.

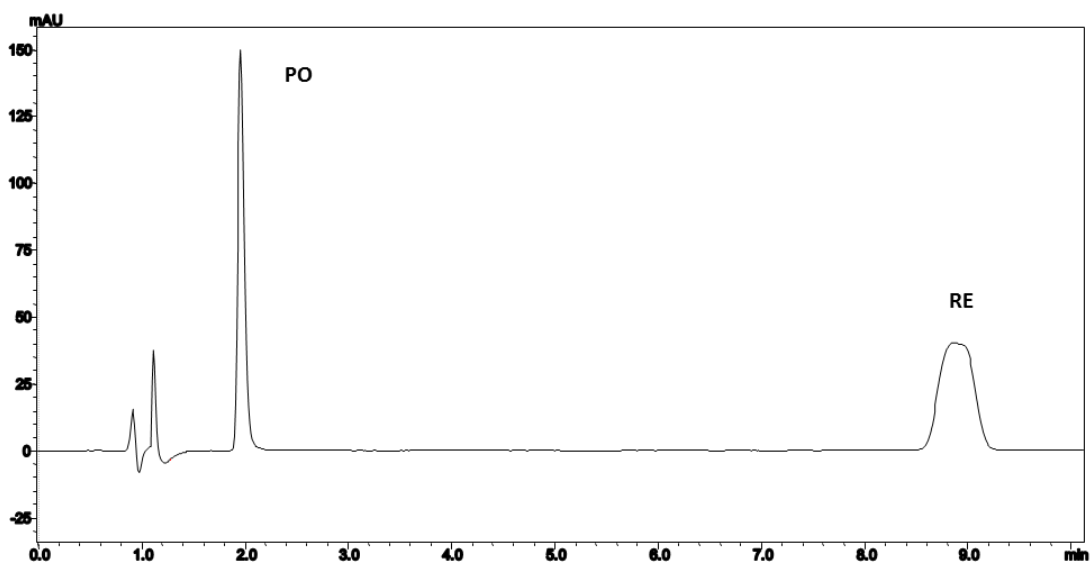
#### 6.1.2.1 Kolona Ascentis Express RP-amide C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 μm

Vliv změn v poměru složek v mobilní fázi na retenční čas analytů je znázorněn na Obrázku 8. S klesajícím podílem acetonitrilu docházelo k výraznému prodlužování retenčního

času analytů, především resveratrolu. Jako potenciálně vhodné složení mobilní fáze u této kolony se jevil poměr ACN/0,5% kyselina octová 25:75, nicméně retenční čas resveratrolu dosáhl hodnoty 8,8 min, šířka a symetrie píku resveratrolu byly nevyhovující, což dokazuje chromatografický záznam analýzy při tomto složení mobilní fáze uvedený na Obrázku 9.



Obrázek 8 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Ascentis Express RP-amide C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 μm

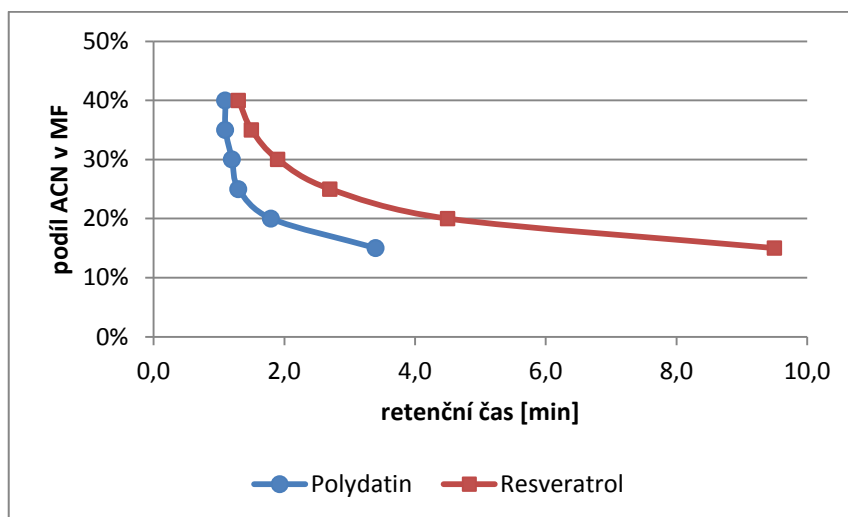


Obrázek 9 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express RP-amide C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 μm, teplota 50°C, průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 25:75

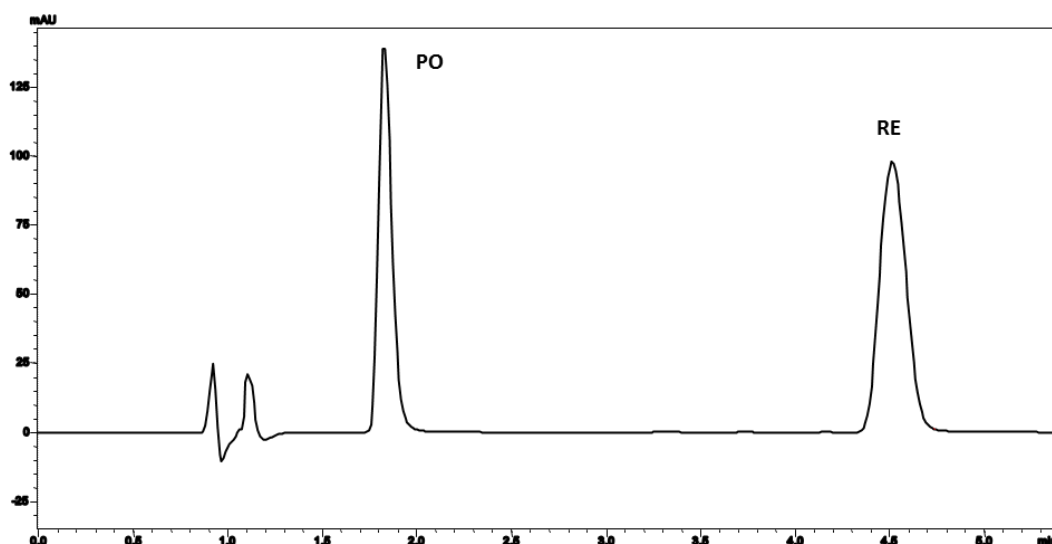


### 6.1.2.2 Kolona Ascentis Express C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 µm

Vliv změn v poměru složek v mobilní fázi na retenční čas analytů je znázorněn na Obrázku 10. S klesajícím podílem acetonitrilu docházelo k prodlužování retenčního času analytů. Jako potenciálně vhodné složení mobilní fáze u této kolony se jevil poměr ACN/0,5% kyselina octová 20:80. Píky obou analytů byly dostatečně separované, symetrie i šířka byly vyhovující a čas analýzy nepřesáhl 5,5 min. Chromatografický záznam analýzy při tomto složení mobilní fáze je uveden na Obrázku 11.



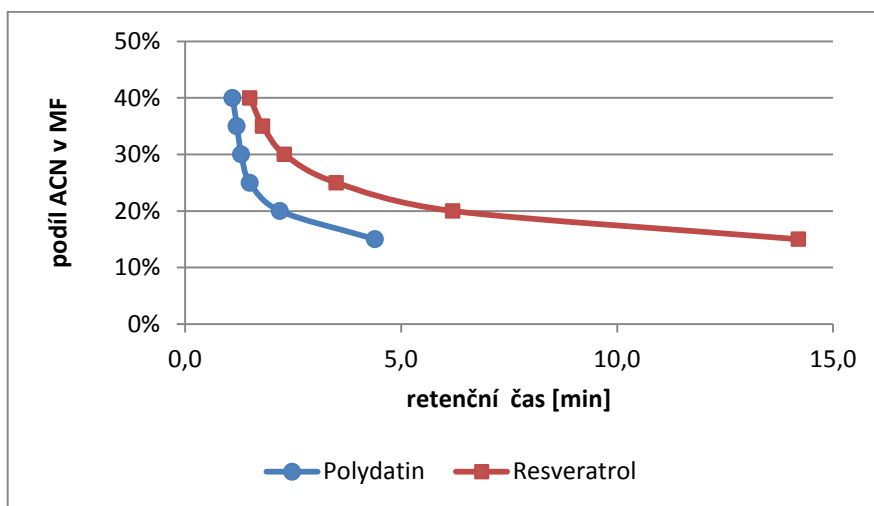
Obrázek 10 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Ascentis Express C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 µm



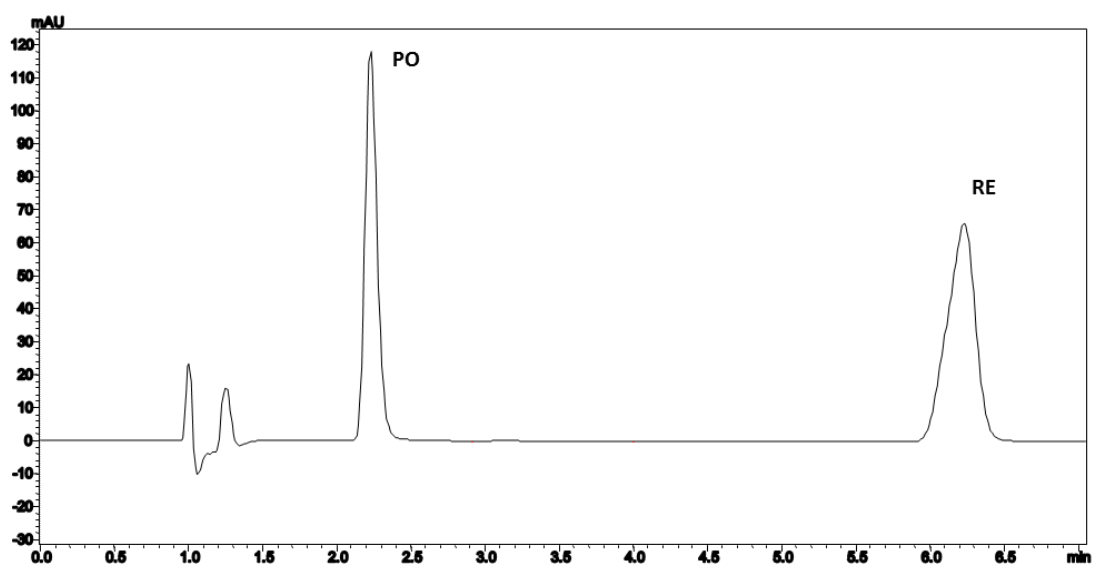
Obrázek 11 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 µm, teplota 50°C, průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80

### 6.1.2.3 Kolona Ascentis Express F5 100 x 4,6 mm; 2,7 µm

Vliv změn v poměru složek v mobilní fázi na retenční čas analytů je znázorněn na Obrázku 12. S klesajícím podílem acetonitrilu docházelo k prodlužování retenčního času analytů. Jako potenciálně vhodné složení mobilní fáze u této kolony se jevil poměr ACN/0,5% kyselina octová 20:80. Píky obou analytů byly dostatečně separované, symetrie a šířka píku resveratrolu však byla vyhovující méně a čas analýzy dosáhl 7,0 min. Chromatografický záznam analýzy při tomto složení mobilní fáze je uveden na Obrázku 13.



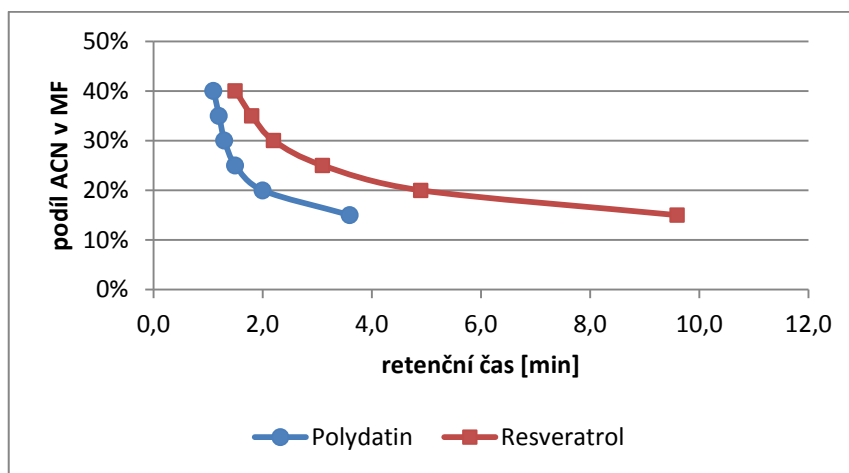
Obrázek 12 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Ascentis Express F5 100 x 4,6 mm; 2,7 µm



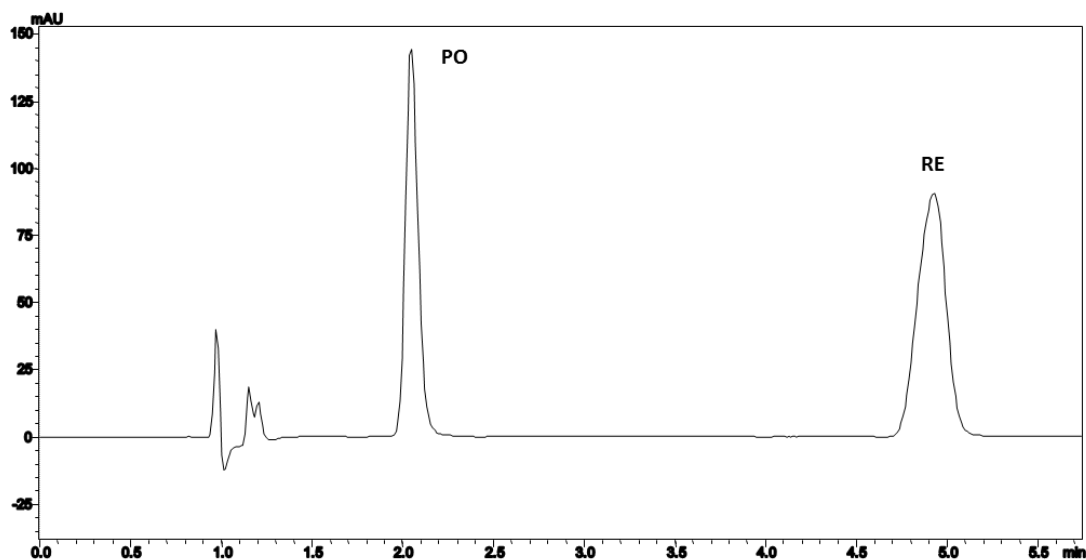
Obrázek 13 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express F5 100 x 4,6 mm; 2,7 µm, teplota 50°C, průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80

#### 6.1.2.4 Kolona Ascentis Express PHENYL-HEXYL 100 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m

Vliv změn v poměru složek v mobilní fázi na retenční čas analytů je znázorněn na Obrázku 14. S klesajícím podílem acetonitrilu docházelo k prodlužování retenčního času analytů. Jako potenciálně vhodné složení mobilní fáze u této kolony se jevil poměr ACN/0,5% kyselina octová 20:80. Píky obou analytů byly dostatečně separované, symetrie i šířka byly vyhovující a čas analýzy nepřesáhl 6,0 min. Chromatografický záznam analýzy při tomto složení mobilní fáze je uveden na Obrázku 15.



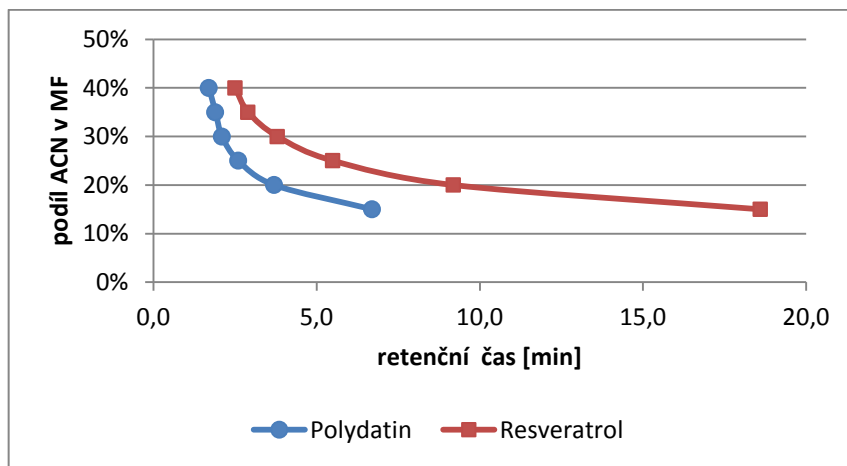
Obrázek 14 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Ascentis Express PHENYL-HEXYL 100 x 4,6 mm; 2,7  $\mu$ m



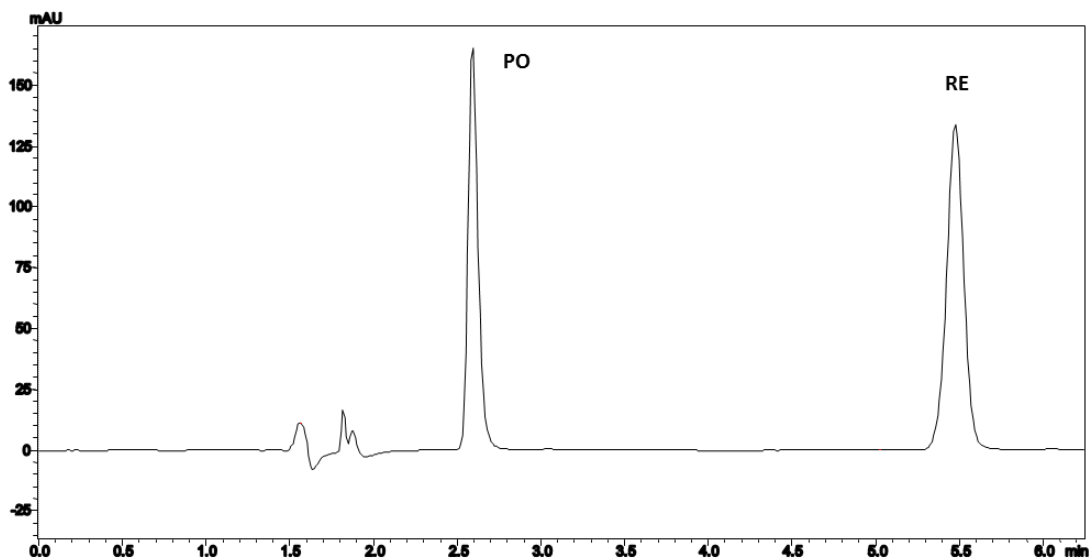
Obrázek 15 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express PHENYL-HEXYL 100 x 4,6 mm; 2,7  $\mu$ m, teplota 50°C, průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80

### 6.1.2.5 Kolona Ascentis Express ES-Cyano 150 x 4,6 mm; 2,7 µm

Vliv změn v poměru složek v mobilní fázi na retenční čas analytů je znázorněn na Obrázku 16. S klesajícím podílem acetonitrilu docházelo k prodlužování retenčního času analytů. Jako potenciálně vhodné složení mobilní fáze u této kolony se jevil poměr ACN/0,5% kyselina octová 25:75. Píky obou analytů byly dostatečně separované, symetrie i šířka byly vyhovující a čas analýzy nepřesáhl 6,5 min. Chromatografický záznam analýzy při tomto složení mobilní fáze je uveden na Obrázku 17.



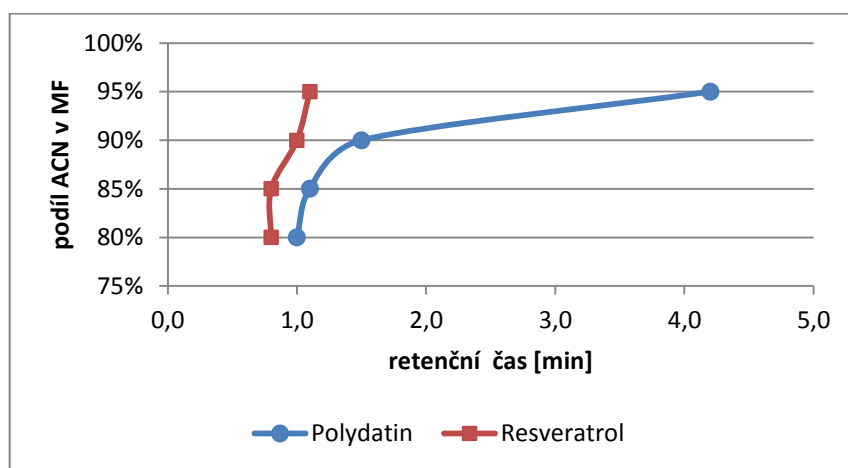
Obrázek 16 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Ascentis Express ES-Cyano 150 x 4,6 mm; 2,7 µm



Obrázek 17 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express ES-Cyano 150 x 4,6 mm; 2,7 µm, teplota 50°C, průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 25:75

### 6.1.2.6 Kolona Chromolith SpeedROD NH<sub>2</sub> 50 mm x 4,6 μm (HILIC)

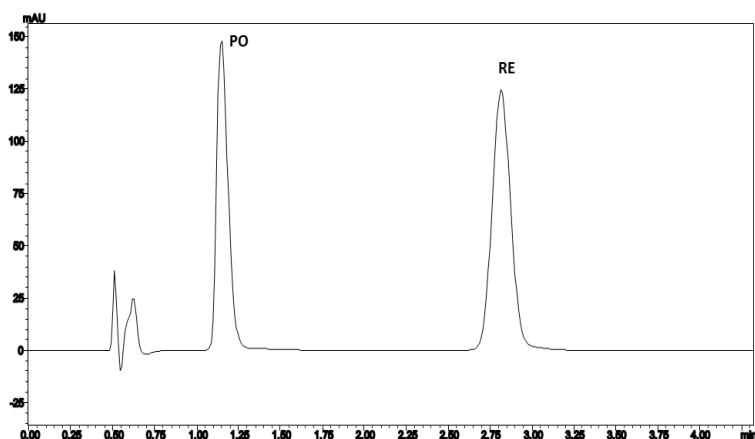
Vliv změn v poměru složek v mobilní fázi na retenční čas analytů je znázorněn na Obrázku 18. S rostoucím podílem acetonitrilu docházelo k prodlužování retenčního času analytů, jelikož se jednalo o separaci látek v systému HILIC. Chemicky vázaná stacionární fáze měla v této koloně polární charakter, což mělo významný vliv na eluci analytů a spotřebu acetonitrilu. Resveratrol se na této koloně na rozdíl od předešlých eluoval dříve než polydatin. Pro dostatečnou separaci píků analytů byl nutný podíl acetonitrilu vyšší než 90 %, což by bylo z ekonomického a ekologického hlediska zcela nevyhovující.



Obrázek 18 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Chromolith SpeedROD NH<sub>2</sub> 50 mm x 4,6 μm

### 6.1.2.7 Kolona Ascentis Express ES-Cyano 100 x 3,0 mm; 2,7 μm

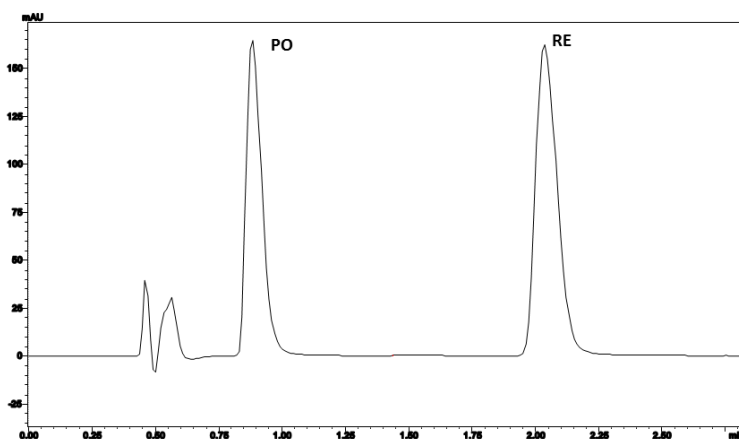
Jako potenciálně vhodné složení mobilní fáze u této kolony se jevil poměr ACN/0,5% kyselina octová 20:80. Píky obou analytů byly dostatečně separované, symetrie i šířka byly vyhovující a čas analýzy nepřesáhl 3,5 min. Chromatografický záznam analýzy při tomto složení mobilní fáze je uveden na Obrázku 19.



Obrázek 19 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express ES-Cyano  
 100 x 3,0 mm; 2,7  $\mu$ m, teplota 50°C, průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80

### 6.1.2.8 Kolona Ascentis Express C-18 100 x 3,0 mm; 2,7 $\mu$ m

Jako potenciálně vhodné složení mobilní fáze u této kolony se jevil poměr ACN/0,5% kyselina octová 20:80. Píky obou analytů byly dostatečně separované, avšak pík polydatinu nebyl uspokojivě separovaný od mrtvého retenčního času kolony. Čas analýzy nepřesáhl 2,5 min. Chromatografický záznam analýzy při tomto složení mobilní fáze je uveden na Obrázku 20.

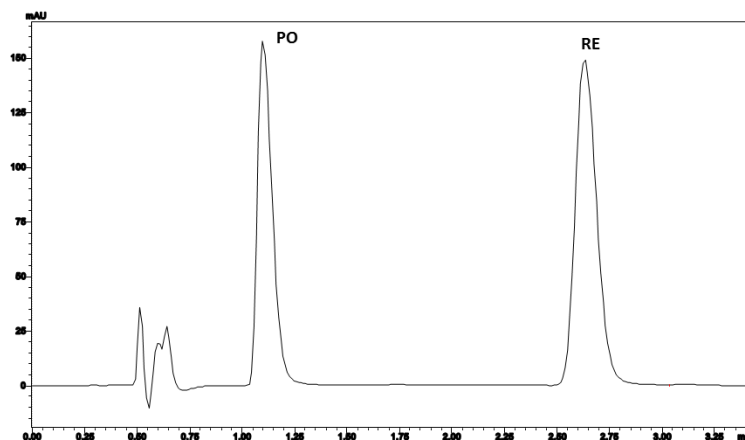


Obrázek 20 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express C-18  
 100 x 3,0 mm; 2,7  $\mu$ m, teplota 50°C, průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80

### 6.1.2.9 Kolona Ascentis Express Phenyl Hexyl 100 x 3,0 mm; 2,7 $\mu$ m

Jako potenciálně vhodné složení mobilní fáze u této kolony se jevil poměr ACN/0,5% kyselina octová 20:80. Analýza kvůli zvýšenému tlaku na koloně probíhala při průtoku mobilní fáze 0,9 ml/min. Píky obou analytů byly dostatečně separované, avšak symetrie píků a tlak na

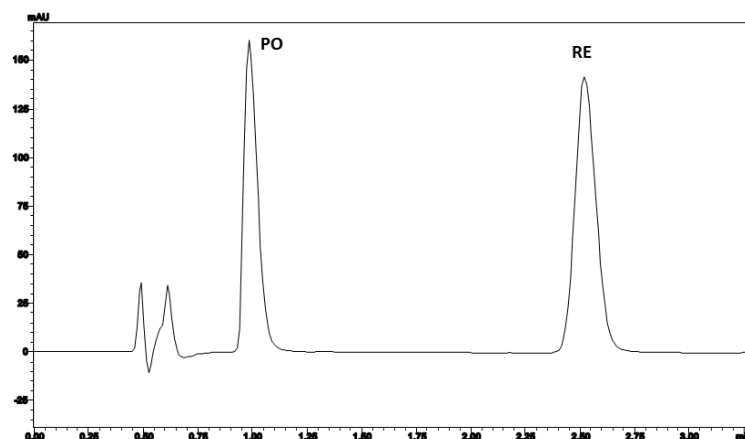
koloně nebyly zcela vyhovující. Čas analýzy nepřesáhl 3,0 min. Chromatografický záznam analýzy při tomto složení mobilní fáze je uveden na Obrázku 21.



Obrázek 21 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express PHENYL-HEXYL  
100 x 3,0 mm; 2,7  $\mu$ m, teplota 50°C, průtok 0,9 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80

#### 6.1.2.10 Kolona Ascentis Express F5 100 x 3,0 mm; 2,7 $\mu$ m

Jako potenciálně vhodné složení mobilní fáze u této kolony se jevil poměr ACN/0,5% kyselina octová 20:80. Pík polydatinu nebyl uspokojivě separovaný od mrtvého retenčního času kolony, symetrie píků byla dostačující. Čas analýzy nepřesáhl 3,0 min. Chromatografický záznam analýzy při tomto složení mobilní fáze je uveden na Obrázku 22.



Obrázek 22 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express F5  
100 x 3,0 mm; 2,7  $\mu$ m, teplota 50°C, průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80

### 6.1.3 Volba vnitřního standardu

Bylo testováno pět látek strukturně podobných resveratrolu na vybrané optimální koloně Ascentis Express ES-Cyano, 100 x 3,0 mm; 2,7  $\mu\text{m}$ , při optimálním složení mobilní fáze a při teplotě 50°C. Požadavkem bylo, aby se hledaný vnitřní standard eluoval dostatečně odděleně od obou analytů a zároveň příliš neprodlužoval celkovou dobu analýzy. Dalším požadavkem bylo, aby se absorpční maximum hledané látky co nejvíce blížilo absorpčním maximům resveratrolu a polydatinu.

Tabulka 4 – Volba vnitřního standardu

Testovaná látka	$t_r$ [min]	Vlnová délka detekce [nm]
Methylparaben	1,54	225
Kyselina nitrobenzoová	1,64	305
Kyselina salicylová	1,44	305
Kyselina acetylsalicylová	1,24	225
<i>p</i> -Nitrofenol	1,79	305

Nejvíce vyhovoval požadavkům *p*-nitrofenol. Pík *p*-nitrofenolu byl dostatečně separovaný od pík stanovovaných látek, eluoval se mezi nimi, tudíž jeho použitím nedošlo k prodloužení celkového času analýzy a vykazoval absorpční maximum blížící se hodnotám absorpčních maxim stanovovaných analytů.

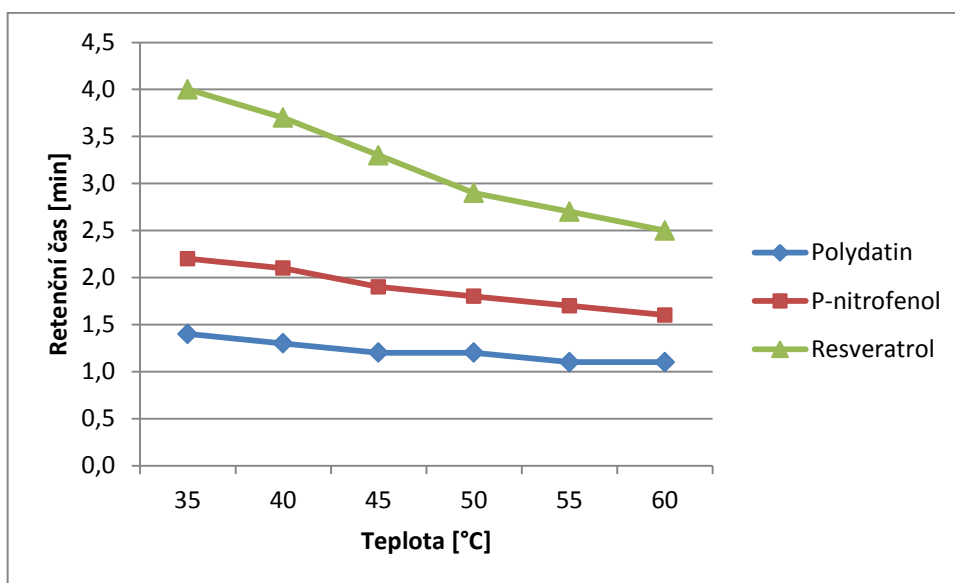


#### 6.1.4 Volba teploty

Vhodná teplota byla testována na vybrané optimální koloně Ascentis Express ES-Cyano, 100 x 3,0 mm; 2,7 µm při optimálním složení mobilní fáze acetonitril/0,5% kyselina octová 20:80 (pH 3). Testované teploty byly v rozmezí 35°C až 60°C. Pro každou teplotu byly zaznamenány hodnoty retenčního času stanovovaných látek a vnitřního standardu uvedené v Tabulce 5. Cílem bylo dosažení co nejkratší doby analýzy za dostatečné separace všech píků analyzovaných látek.

Tabulka 5 – Vliv teploty kolony na retenční časy analyzovaných látek

Teplota [°C]	Retenční čas [min]		
	polydatin	<i>p</i> -nitrofenol	resveratrol
35	1,4	2,2	4,0
40	1,3	2,1	3,7
45	1,2	1,9	3,3
50	1,2	1,8	2,9
55	1,1	1,7	2,7
60	1,1	1,6	2,5

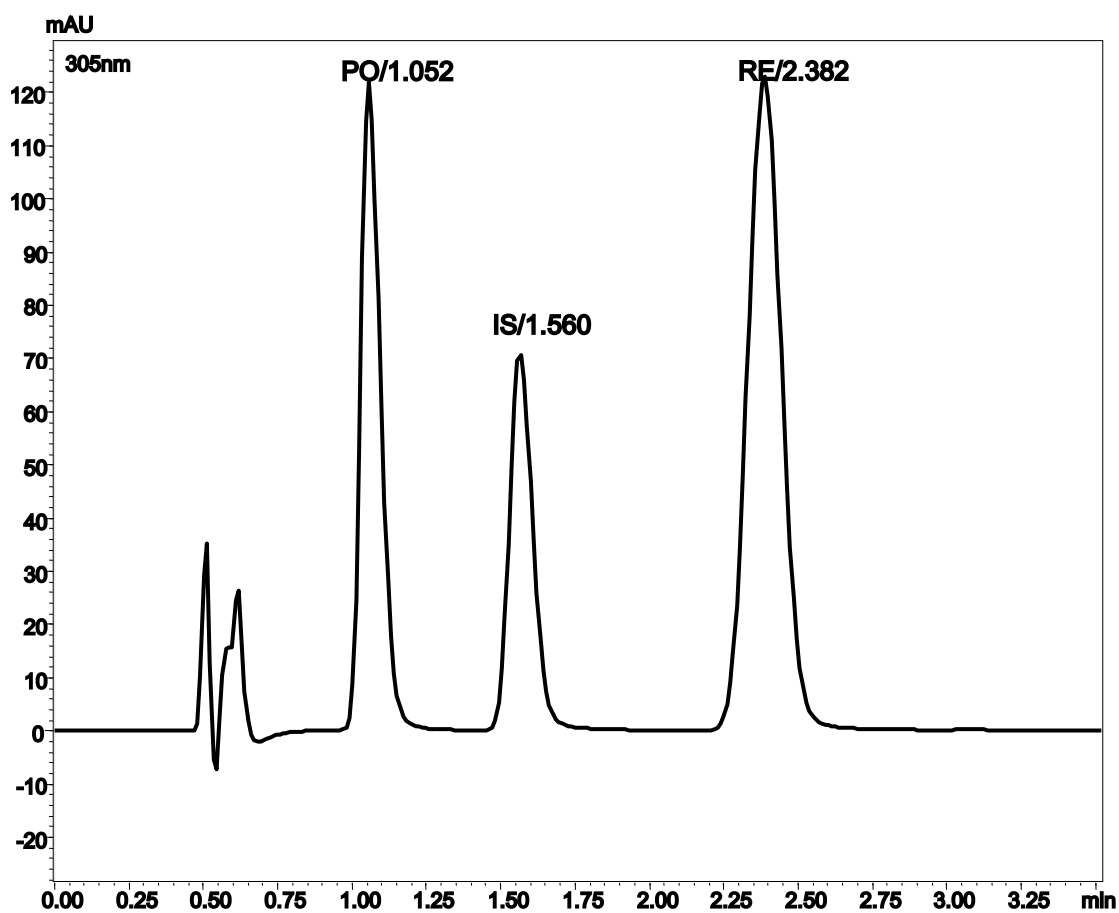


Obrázek 23 - Závislost retenčního času analyzovaných látek na teplotě kolony

### 6.1.5 Optimální podmínky pro HPLC analýzu

Tabulka 6 – Optimální podmínky pro HPLC analýzu

Chromatografická sestava:	Shimadzu LC – 10
Detektor:	DAD detektor SPD - M10A VP
Kolona:	Ascentis Express ES-Cyano, 100 x 3,0 mm; 2,7 µm (Supelco Analytical)
Dávkování:	5 µl
Detekce:	UV 305 nm
Mobilní fáze:	Acetonitril/0,5% kyselina octová 20:80 (pH 3)
Průtok mobilní fáze:	1,0 ml/min
Teplota:	60°C
Čas analýzy:	3 min
Tlak:	20,0 MPa



Obrázek 24 - Chromatogram za optimálních separačních podmínek

## 6.2 Validace analytické metody

### 6.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Převzato z analýzy roztoku standardu pro validaci při optimálních podmínkách. Hodnoty získány vyhodnocením chromatografického záznamu softwarem LC Solution.

#### 6.2.1.1 Účinnost chromatografického systému – zdánlivý počet teoretických pater

Tabulka 7 – Účinnost chromatografického systému

Sloučenina	$t_R$ [min]	$W_{1/2}$	N
PO	1,052	0,079	872
IS	1,560	0,089	1482
RE	2,382	0,127	1722

#### 6.2.1.2 Faktor asymetrie chromatografických píků

Tabulka 8 – Symetrie chromatografických píků

Sloučenina	Faktor symetrie
PO	1,441
IS	1,272
RE	1,104

#### 6.2.1.3 Rozlišení chromatografických píků ( $R_s$ )

Tabulka 9 – Rozlišení chromatografických píků

Analyzované látky	$R_s$
PO – IS	3,332
IS – RE	4,195

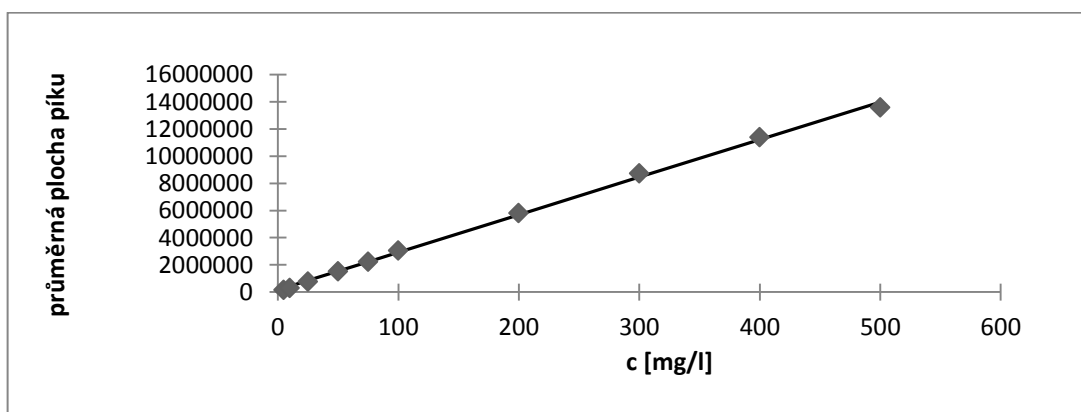
### 6.2.2 Linearita

Pro stanovení linearity bylo připraveno 10 kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí od 5 mg/l do 500 mg/l, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.2.2. U každého kalibračního roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu, z nichž byla stanovena průměrná hodnota plochy píku pro každou koncentraci. Výsledky jsou uvedené v Tabulce 10. Pro vyhodnocení závislosti průměrů ploch píků kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla použita metoda lineární regrese.

Tabulka 10 – Testování linearity

koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha píku	
	Polydatin	Resveratrol
5	147778	201891
10	288781	391348
25	778769	1063107
50	1534267	2093414
75	2229550	3063988
100	3051302	4187144
200	5805360	8018781
300	8741852	12118301
400	11400555	15981360
500	13597027	19474859

### 6.2.2.1 Kalibrační závislost pro polydatin



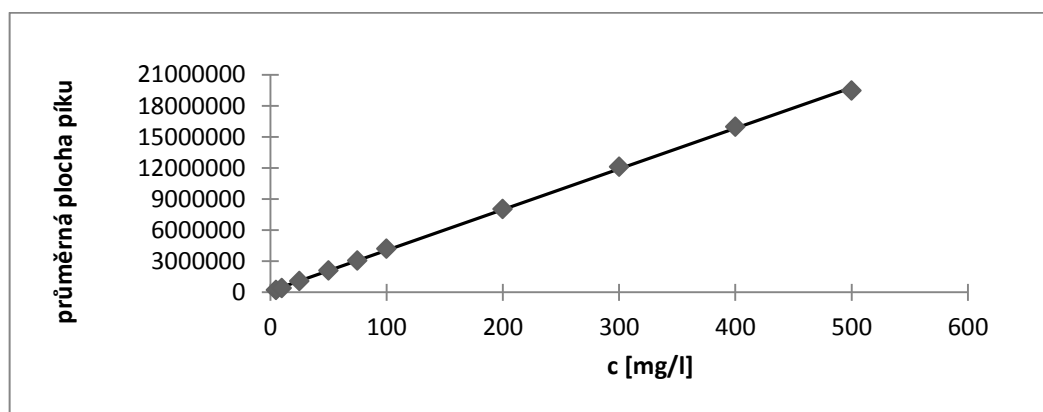
Obrázek 25 – Kalibrační závislost pro polydatin

Tabulka 11 – Parametry lineární regrese pro polydatin

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby
Směrnice	k =	27669,7	± 390,7163
Abs. člen	q =	150518,4	± 92367,44
Korelační koef.	r =	0,999203	
Reziduální odch.	s =	207356,8	

V daném koncentračním rozmezí bylo dosaženo korelačního koeficientu 0,999203.

### 6.2.2.2 Kalibrační závislost pro resveratrol



Obrázek 26 – Kalibrační závislost pro resveratrol

Tabulka 12 – Parametry lineární regrese pro resveratrol

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby
Směrnice	k =	39289,45	± 298,0545
Abs. člen	q =	117726	± 70461,69
Korelační koef.	r =	0,99977	
Reziduální odch.	s =	158180,4	

V daném koncentračním rozmezí bylo dosaženo korelačního koeficientu 0,99977.

### 6.2.3 Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti byly použity kalibrační roztoky o koncentracích 5 mg/l, 100 mg/l a 500 mg/l, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.2.2. U každého kalibračního roztoku bylo provedeno 8 nástřiků na kolonu a z ploch píků analytů byly vypočítány směrodatné odchylky. Výsledky získané z jednotlivých koncentračních hladin jsou uvedené v Tabulkách 13, 14 a 15.

*Tabulka 13 – Opakovatelnost analýzy pracovního roztoku pro kalibraci (c = 5 mg/l)*

Hladina 5 mg/l	Průměr	SD	RSD
PO	147835	397,8	0,27 %
RE	201291	813,8	0,40 %

*Tabulka 14 – Opakovatelnost analýzy pracovního roztoku pro kalibraci (c = 100 mg/l)*

Hladina 100 mg/l	Průměr	SD	RSD
PO	3061613	13117,3	0,43 %
RE	4189818	2961,4	0,07 %

*Tabulka 15 – Opakovatelnost analýzy pracovního roztoku pro kalibraci (c = 500 mg/l)*

Hladina 500 mg/l	Průměr	SD	RSD
PO	13550211	92518,3	0,68 %
RE	19533505	149414,1	0,76 %

Relativní směrodatná odchylka obou analytů na všech hladinách byla menší než 1 %.

## 6.2.4 Přesnost

Pro vyhodnocení přesnosti byly analyzovány roztoky vzorků přípravků A1 – Resveratrol 800 RX, Evelor Resveratrol 50 mg, Resveratrol MAX a Indonal Partner for Woman, jejichž příprava je uvedena v kapitole 5.3.1.

### 6.2.4.1 A1 – Resveratrol 800 RX

Bylo připraveno celkem 6 roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.1.1. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky na kolonu a z ploch píků těchto tří nástřiků byla pro každý roztok spočítána průměrná hodnota, která byla přepočtena na navážku 0,1000 g a korigována poměrem průměru ploch píku vnitřního standardu ve standardu analytů k průměru ploch píku vnitřního standardu ve vzorcích. Výsledky jsou uvedené v Tabulce 16.

Tabulka 16 – Přesnost metody – A1 – Resveratrol 800 RX

Přesnost	RE	PO
Průměry ploch	768143	14081
	756147	14187
	752640	13977
	765001	13423
	756555	14493
	762505	13598
Průměr	760165	13960
SD	5972	393
RSD	0,79 %	2,81 %

#### 6.2.4.2 Evelor Resveratrol 50 mg

Bylo připraveno celkem 6 roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.1.2. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky na kolonu a z ploch píků těchto tří nástřiků byla pro každý roztok spočítána průměrná hodnota, která byla přepočtena na navážku 0,1500 g a korigována poměrem průměru ploch píku vnitřního standardu ve standardu analytů k průměru ploch píku vnitřního standardu ve vzorcích. Výsledky jsou uvedené v Tabulce 17.

Tabulka 17 – Přesnost metody – Evelor Resveratrol 50 mg

Přesnost	RE
Průměry ploch	864873
	905029
	856235
	868436
	865492
	831062
Průměr	865188
SD	23844
RSD	2,76 %

#### 6.2.4.3 Resveratrol MAX

Bylo připraveno celkem 6 roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.1.4. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky na kolonu a z ploch píků těchto tří nástřiků byla pro každý roztok spočítána průměrná hodnota, která byla přepočtena na navážku 0,1000 g a korigována poměrem průměru ploch píku vnitřního standardu ve standardu analytů k průměru ploch píku vnitřního standardu ve vzorcích. Výsledky jsou uvedené v Tabulce 18.

Tabulka 18 – Přesnost metody – Resveratrol MAX

Přesnost	RE	PO
Průměry ploch	574381	2111
	578126	2003
	562653	2093
	571142	2103
	538053	2194
	566523	2294
Průměr	565146	2133
SD	14366	99,7
RSD	2,54 %	4,68 %



#### 6.2.4.4 Indonal Partner for Woman

Bylo připraveno celkem 6 roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.1.6. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky na kolonu a z ploch píků těchto tří nástřiků byla pro každý roztok spočítána průměrná hodnota, která byla přepočtena na navážku 0,1000 g a korigována poměrem průměru ploch píku vnitřního standardu ve standardu analytů k průměru ploch píku vnitřního standardu ve vzorcích. Výsledky jsou uvedené v Tabulce 19.

Tabulka 19 – Přesnost metody – Indonal Partner for Woman

Přesnost	RE	PO
Průměry ploch	182263	7846
	183668	8421
	186574	8334
	186525	8182
	184731	8119
	178658	8756
Průměr	183736	8276
SD	2993	307,5
RSD	1,63 %	3,72 %

### 6.2.5 Správnost

Pro vyhodnocení správnosti byla použita metoda standardního přídávku. Pro vyhodnocení správnosti byly analyzovány roztoky vzorků přípravků A1 – Resveratrol 800 RX, Evelor Resveratrol 50 mg, Resveratrol MAX a Indonal Partner for Woman.

Pro výpočet výtěžností byly použity průměrné hodnoty ploch píků každého pracovního roztoku vzorku pro správnost a průměrné hodnoty ploch píků získané z měření 6 pracovních roztoků vzorku pro přesnost, které jsou uvedeny v kapitole 6.2.4. Rozdílem těchto dvou hodnot je plocha píku přidaného polydatinu, resp. resveratrolu. Výtěžnost ( $R_i$ ) uvedená v % byla vypočtena podle vzorce:

$$R_i = \frac{c_{vz+st} - c_{vz}}{c_{st}} \times 100, \text{ kde}$$

$c_{vz+st}$  je koncentrace roztoku vzorku s přídávkem standardu vypočtená z průměru ploch píků roztoků vzorku pro správnost,  $c_{vz}$  je koncentrace roztoku vzorku vypočtená z průměru ploch píků roztoků vzorku pro přesnost,  $c_{st}$  je koncentrace roztoku standardu vypočtená z průměru ploch píků 4 roztoků standardu pro výtěžnost, jehož příprava je uvedena v kapitole 5.2.4.

#### 6.2.5.1 A1 – Resveratrol 800 RX

Bylo připraveno celkem 5 roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.2.1. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky na kolonu a z ploch píků těchto tří nástřiků byla pro každý roztok spočítána průměrná hodnota, která byla přepočtena na navážku 0,00250 g a korigována poměrem průměru ploch píku vnitřního standardu ve standardu analytů k průměru ploch píku vnitřního standardu ve vzorcích. Z této hodnoty byla vypočtena koncentrace analytů ve vzorku a použita pro výpočet výtěžnosti. Získané hodnoty výtěžností jsou uvedené v Tabulce 20.

Tabulka 20 – Správnost metody – A1 – Resveratrol 800 RX

Správnost	RE	PO
Hodnoty výtěžnosti	93,01 %	93,21 %
	101,60 %	92,57 %
	93,31 %	96,70 %
	107,07 %	96,39 %
	98,09 %	96,45 %
Průměr	98,62 %	95,06 %
SD	5,92 %	2,00 %
RSD	6,00 %	2,11 %

### 6.2.5.2 Evelor Resveratrol 50 mg

Bylo připraveno celkem 5 roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.2.2. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky na kolonu a z ploch píků těchto tří nástřiků byla pro každý roztok spočítána průměrná hodnota, která byla přepočtena na navážku 0,00375 g a korigována poměrem průměru ploch píku vnitřního standardu ve standardu analytů k průměru ploch píku vnitřního standardu ve vzorcích. Z této hodnoty byla vypočtena koncentrace analytů ve vzorku a použita pro výpočet výtěžnosti. Získané hodnoty výtěžností jsou uvedené v Tabulce 21.

Tabulka 21 – Správnost metody – Evelor Resveratrol 50 mg

Správnost	RE
Hodnoty výtěžností	94,82 %
	107,24 %
	93,49 %
	105,49 %
	98,69 %
Průměr	99,95 %
SD	6,19 %
RSD	6,20 %

### 6.2.5.3 Resveratrol MAX

Bylo připraveno celkem 5 roztoků, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.2.3. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky na kolonu a z ploch píků těchto tří nástřiků byla pro každý roztok spočítána průměrná hodnota, která byla přepočtena na navážku 0,00250 g a korigována poměrem průměru ploch píku vnitřního standardu ve standardu analytů k průměru ploch píku vnitřního standardu ve vzorcích. Z této hodnoty byla vypočtena koncentrace analytů ve vzorku a použita pro výpočet výtěžnosti. Získané hodnoty výtěžností jsou uvedené v Tabulce 22.

Tabulka 22 – Správnost metody – Resveratrol MAX

Správnost	RE	PO
Hodnoty výťažnosti	107,33 %	91,92 %
	103,91 %	93,21 %
	106,06 %	90,98 %
	102,45 %	92,21 %
	104,13 %	89,35 %
Průměr	104,78 %	91,53 %
SD	1,92 %	1,46 %
RSD	1,83 %	1,59 %

#### 6.2.5.4 Indonal Partner for Woman

Byly připraveny celkem 4 roztoky, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.2.4. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky na kolonu a z ploch píků těchto tří nástřiků byla pro každý roztok spočítána průměrná hodnota, která byla přepočtena na navážku 0,00250 g a korigována poměrem průměru ploch píku vnitřního standardu ve standardu analytů k průměru ploch píku vnitřního standardu ve vzorcích. Z této hodnoty byla vypočtena koncentrace analytů ve vzorku a použita pro výpočet výťažnosti. Získané hodnoty výťažností jsou uvedené v Tabulce 23.

Tabulka 23 – Správnost metody – Indonal Partner for Woman

Správnost	RE	PO
Hodnoty výťažností	88,87 %	84,07 %
	90,75 %	83,17 %
	96,35 %	88,05 %
	87,81 %	84,97 %
Průměr	90,95 %	85,07 %
SD	3,80 %	2,12 %
RSD	4,18 %	2,50 %

## 6.3 Robustnost

Testování míry vlivu proměnných experimentálních podmínek na stanovení analytů bylo provedeno u pracovního roztoku pro výtěžnost, jehož příprava je uvedena v kapitole 5.2.4.

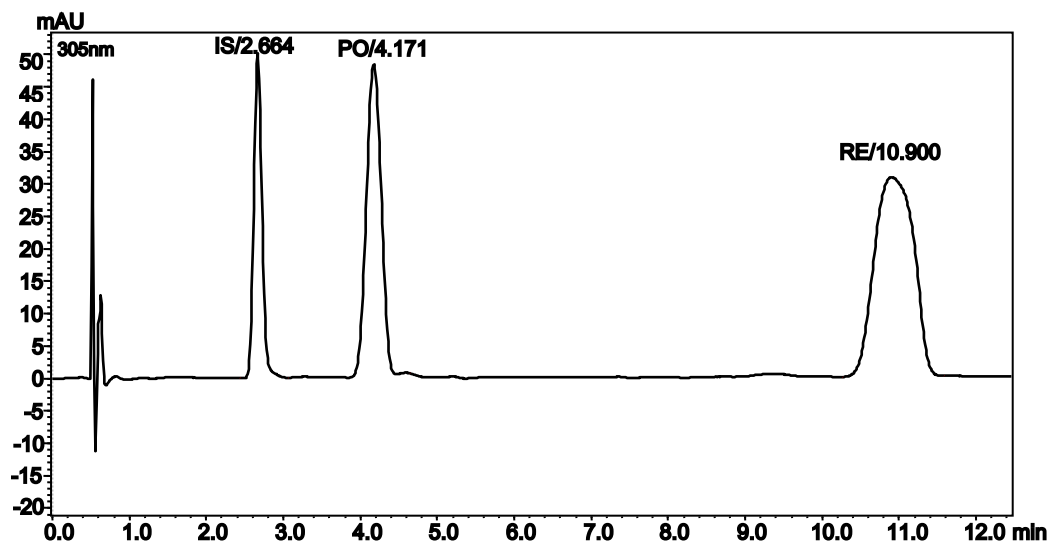
### 6.3.1 Vliv složení mobilní fáze

Byl testován vliv složení mobilní fáze na plochy píků analytů. Pracovní roztok byl testován při změnách poměru složek mobilní fáze – acetonitrilu a 0,5% kyseliny octové, a to v poměrech 10:90, 15:85, 20:80, 22:78 a 25:75. Byla provedena dvě měření a spočítán jejich průměr.

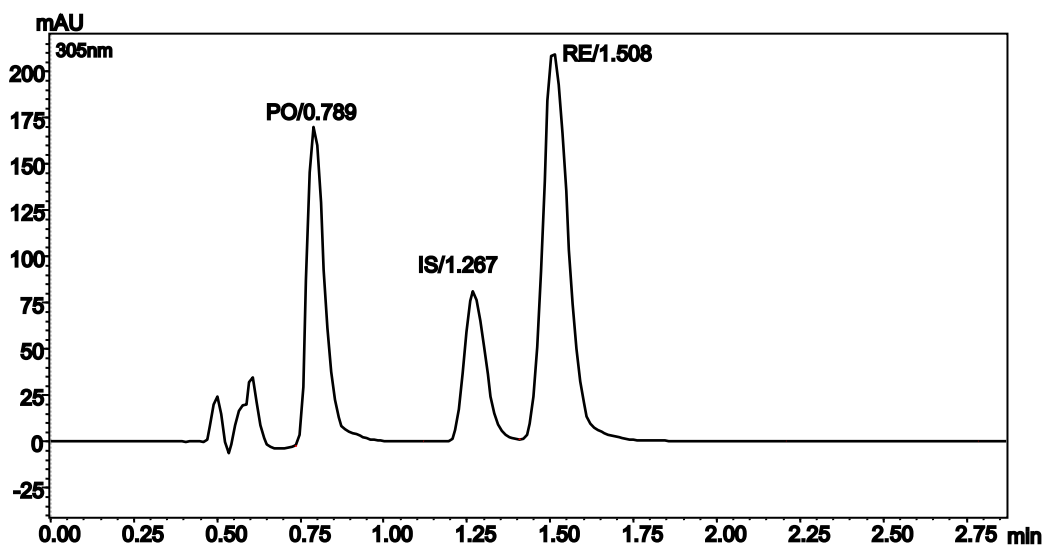
Byly získány výsledky uvedené v Tabulce 24. Relativní hodnoty ploch vztažené k plochám píků při optimálnímu složení mobilní fáze 20:80 se pohybovaly u polydatinu v rozmezí 96,83 % až 103,10 %, u vnitřního standardu *p*-nitrofenolu od 94,62 % do 106,68 % a u resveratrolu od 94,07 % do 99,86 %. Bylo také zjištěno, že s poklesem obsahu acetonitrilu v mobilní fázi dochází k záměně pořadí retence u *p*-nitrofenolu a polydatinu (obr. 27).

Tabulka 24 – Vliv složení mobilní fáze na plochy píků

Acetonitril – 0,5% kys. octová	Polydatin		<i>p</i> -Nitrofenol		Resveratrol	
	A <sub>i</sub>	A <sub>R</sub> [%]	A <sub>i</sub>	A <sub>R</sub> [%]	A <sub>i</sub>	A <sub>R</sub> [%]
10:90	634064	96,83	371311	98,01	1084949	94,07
15:85	636999	97,28	404167	106,68	1125469	97,58
20:80	654837	100,00	378857	100,00	1153396	100,00
22:78	634380	96,88	371354	98,02	1151808	99,86
25:75	675138	103,10	358476	94,62	1118405	96,97



Obrázek 27 – Chromatografický záznam separace analytů při složení MF acetonitril – 0,5% kys. octová 10:90



Obrázek 28 – Chromatografický záznam separace analytů při složení MF acetonitril – 0,5% kys. octová 25:75

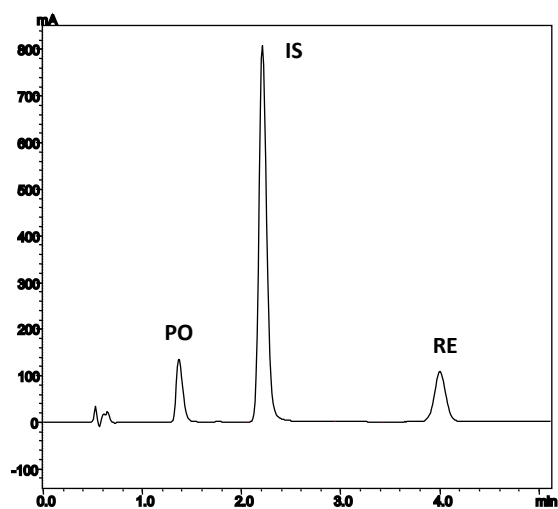
### 6.3.2 Vliv teploty

Byl testován vliv teploty na plochy píků analytů. Vliv teploty byl testován při 35°C až 60°C a při optimálním složení mobilní fáze acetonitril – 0,5% kyselina octová 20:80.

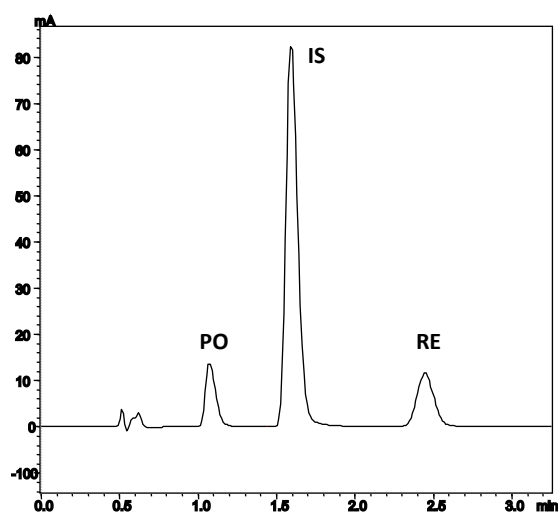
Byly získány výsledky uvedené v Tabulce 25. Relativní hodnoty ploch vztažené k plochám píků při optimální teplotě 60°C se pohybovaly u polydatinu v rozmezí 97,42 % až 100,42 %, u vnitřního standardu *p*-nitrofenolu od 99,59 % do 101,19 % a u resveratrolu od 96,07 % do 100,04 %.

Tabulka 25 – Vliv teploty na plochy píků

Teplota (°C)	Polydatin		p-Nitrofenol		Resveratrol	
	A <sub>i</sub>	A <sub>R</sub> [%]	A <sub>i</sub>	A <sub>R</sub> [%]	A <sub>i</sub>	A <sub>R</sub> [%]
35	604313	97,42	4360392	100,11	823577	96,07
40	622917	100,42	4337923	99,59	850973	99,27
45	617535	99,55	4407563	101,19	857623	100,04
50	613658	98,93	4405429	101,14	844998	98,57
55	613120	98,84	4351397	99,90	856201	99,88
60	620313	100,00	4355818	100,00	857272	100,00



Obrázek 29 – Chromatografický záznam separace analytů při teplotě 35°C

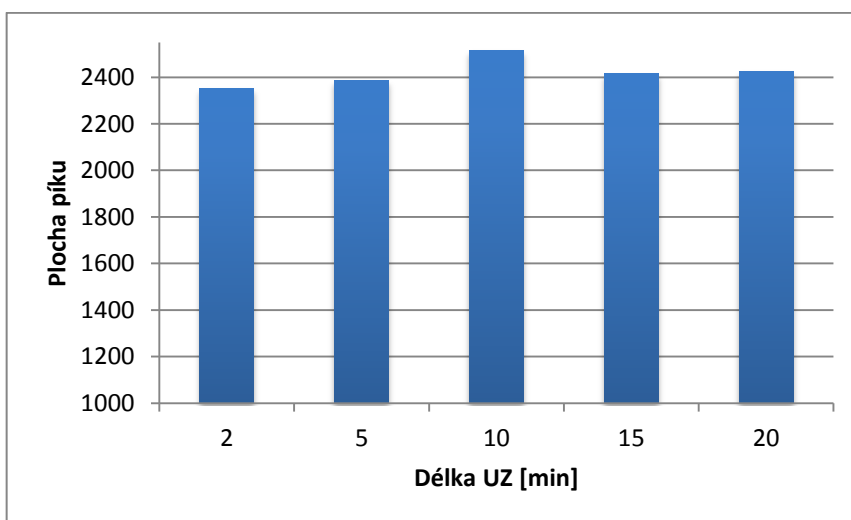


Obrázek 30 – Chromatografický záznam separace analytů při teplotě 60°C

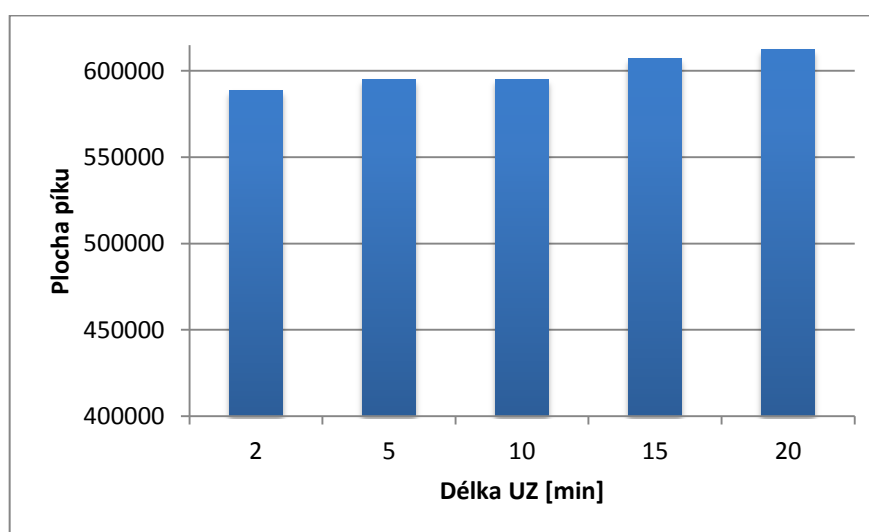
### 6.3.3 Vliv délky ultrazvukové lázně

Byl testován vliv délky ultrazvukové lázně při extrakci vzorků přípravků na plochy píků stanovovaných látek, a to v rozsahu 2 až 20 minut. K testování byl použit roztok vzorku pro stanovení obsahu přípravku Resveratrol MAX.

Byly získány výsledky uvedené pro polydatin na Obrázku 31 a pro resveratrol na Obrázku 32. Z výsledků je patrné, že doba extrakce v ultrazvukové lázni při přípravě vzorků neměla zásadní vliv na velikost ploch píků analyzovaných látek.



Obrázek 31 – Vliv délky ultrazvukové lázně při přípravě roztoku vzorku na plochu píku polydatinu



Obrázek 32 – Vliv délky ultrazvukové lázně při přípravě roztoku vzorku na plochu píku resveratrolu



## 6.4 Stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích

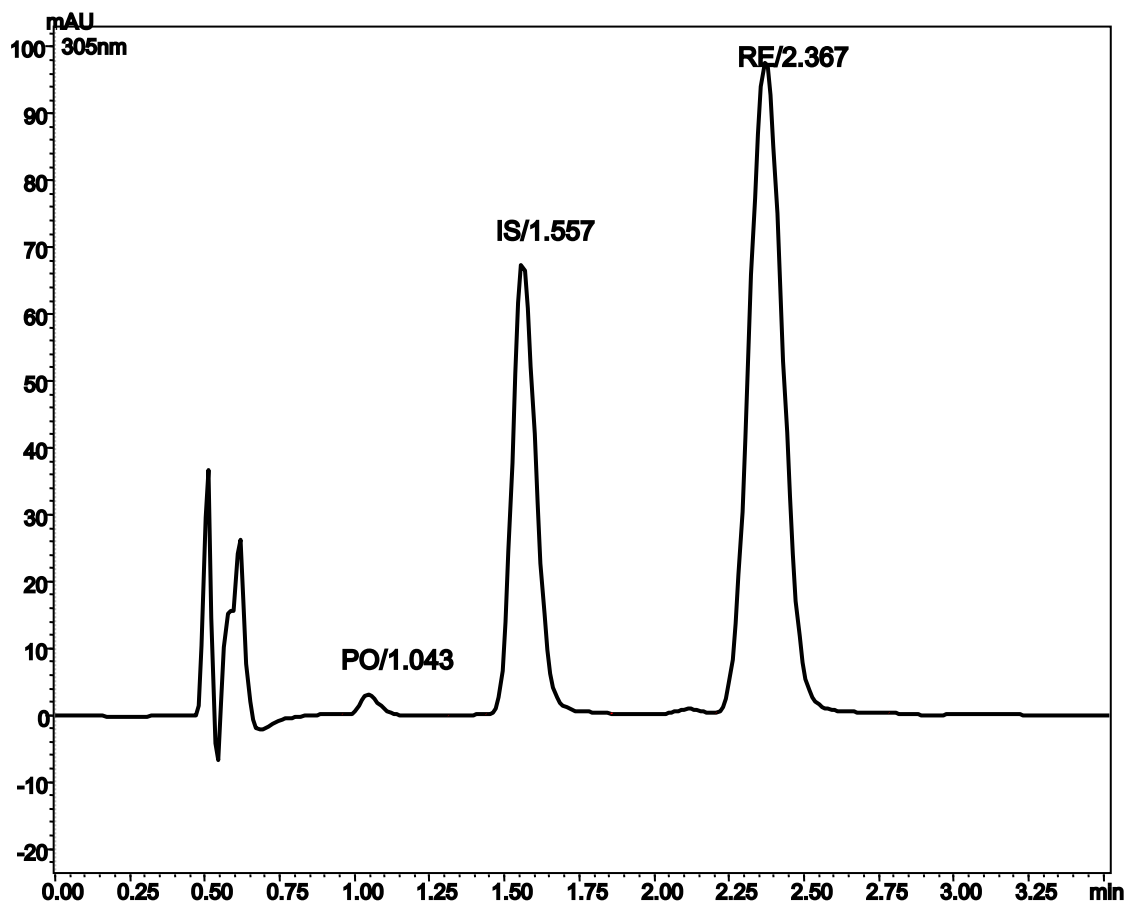
Optimalizovaná a validovaná metoda byla použita pro stanovení resveratrolu a polydatinu v potravních doplňcích. Bylo připraveno 6 roztoků vzorků pro každý stanovovaný přípravek dle postupu popsáným v kapitole 5.3.1. U každého roztoku byly provedeny tři nástřiky na kolonu. Z průměru naměřených hodnot byl vypočítán obsah stanovovaných látek v daném roztoku vzorku. Byla provedena korekce poměrem ploch vnitřního standardu v roztoku vzorku ku roztoku standardu pro stanovení a korekce na čistotu surovin v roztoku standardu. Výsledný obsah analytů v přípravku byl vypočítán jako průměrná hodnota obsahu všech šesti roztoků vzorku. Deklarovaný obsah resveratrolu v testovaných potravních doplňcích je uveden v Tabulce 26.

*Tabulka 26 – Deklarovaný obsah resveratrolu v potravních doplňcích*

<b>Přípravek</b>	<b>Deklarovaný obsah resveratrolu</b>
A1 – Resveratrol 800 RX	80 mg/tbl.
Evelor Resveratrol 50 mg	50 mg/tob.
Resveratrol MAX	80 mg/tbl.
Walmark Lecithin s resveratrolem	0,2 mg/tbl.
Resveratrol antiaging	50 mg/tob.
Indonal Partner for Woman	20 mg/tob.

#### 6.4.1 Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku A1 – Resveratrol 800 RX

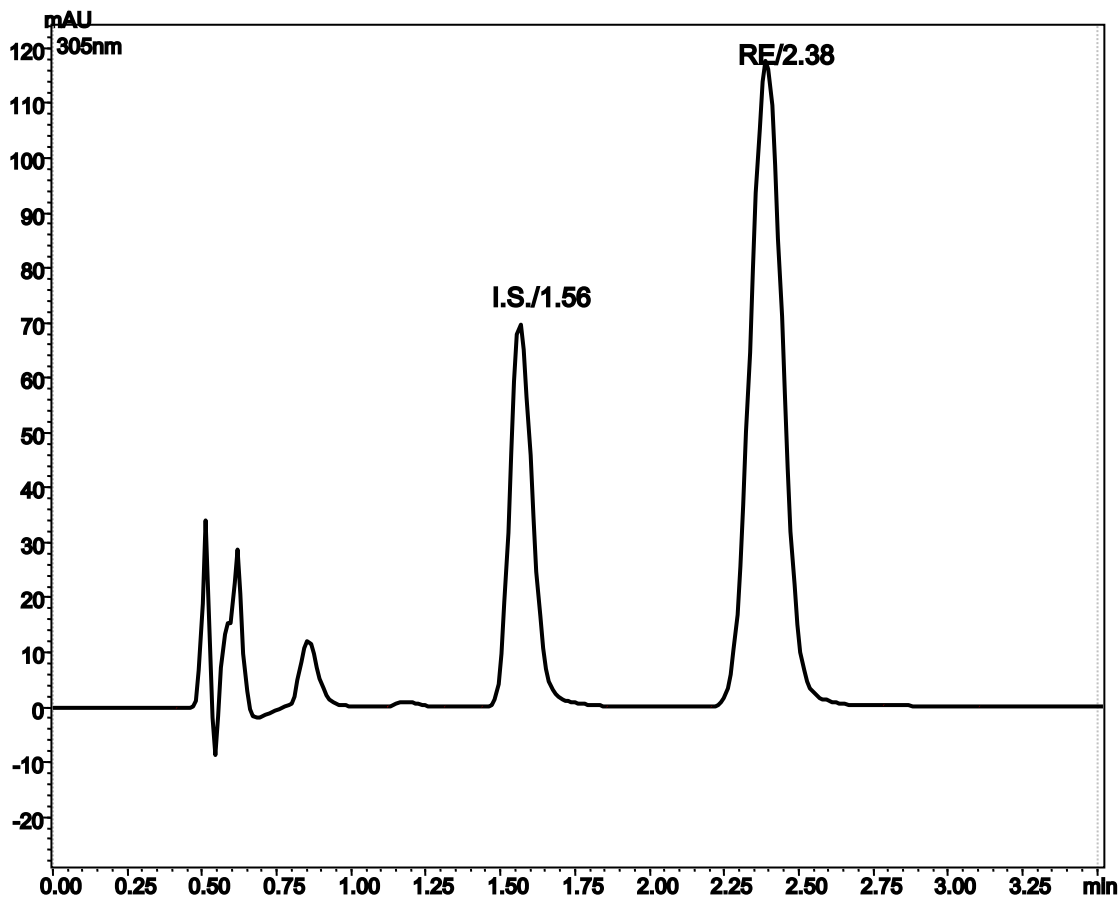
Deklarovaný obsah resveratrolu v přípravku je 80 mg v jedné tabletě. Průměrný obsah resveratrolu stanovený danou metodou byl 77,27 mg. V přípravku bylo nalezeno též 2,54 mg polydatinu. Celkový obsah obou účinných látek v přípravku byl 79,81 mg, což odpovídá 99,76 % deklarovaného množství.



Obrázek 33 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu polydatinu a resveratrolu v přípravku A1 – Resveratrol 800 RX

#### 6.4.2 Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Evelor Resveratrol 50 mg

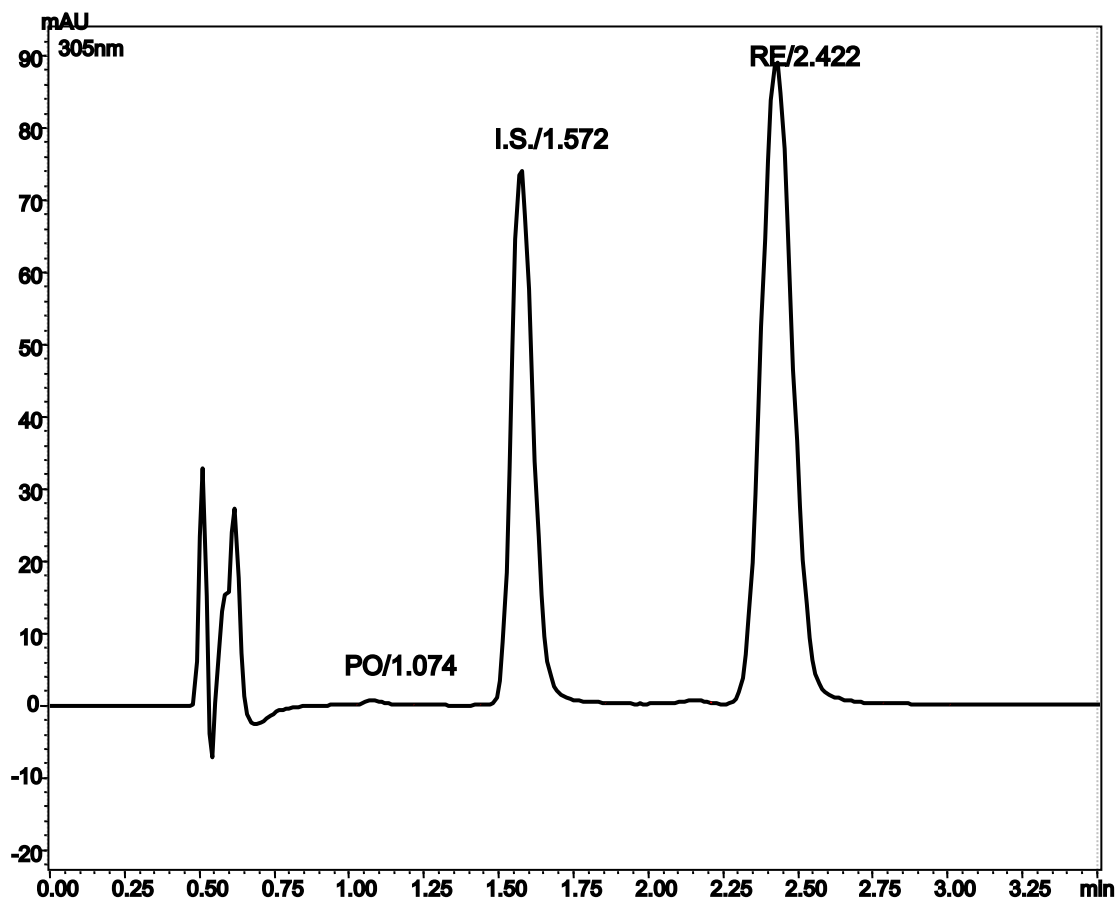
Deklarovaný obsah resveratrolu v přípravku je 50 mg v jedné tobolce. Průměrný obsah resveratrolu stanovený danou metodou byl 45,15 mg. Toto množství odpovídá 90,30 % deklarovaného obsahu.



Obrázek 34 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Evelor Resveratrol 50 mg

### 6.4.3 Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Resveratrol MAX

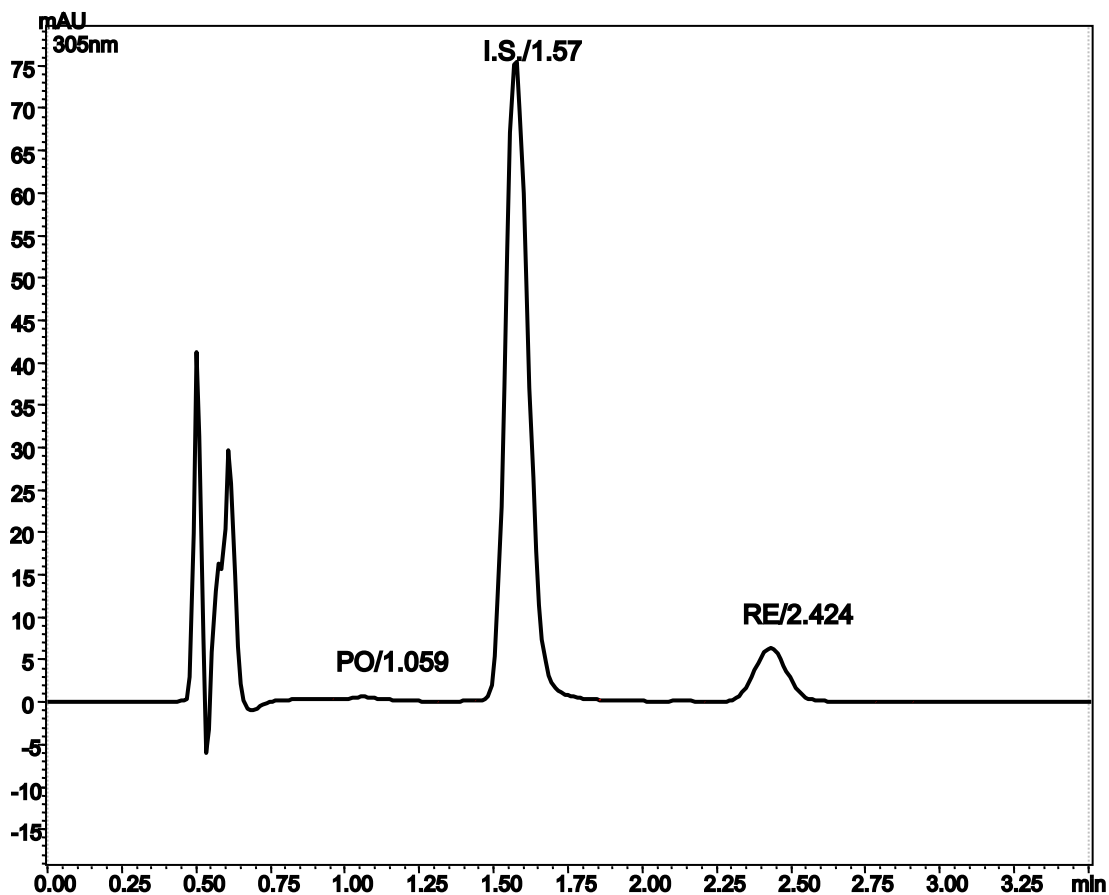
Deklarovaný obsah resveratrolu v přípravku je 80 mg v jedné tabletě. Průměrný obsah resveratrolu stanovený danou metodou byl 56,83 mg. V přípravku bylo nalezeno též 0,37 mg polydatinu. Celkový obsah obou účinných látek v přípravku byl 57,20 mg, což odpovídá 71,50 % deklarovaného množství.



Obrázek 35 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu polydatinu a resveratrolu v přípravku Resveratrol MAX

#### 6.4.4 Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Walmark Lecithin s resveratrole

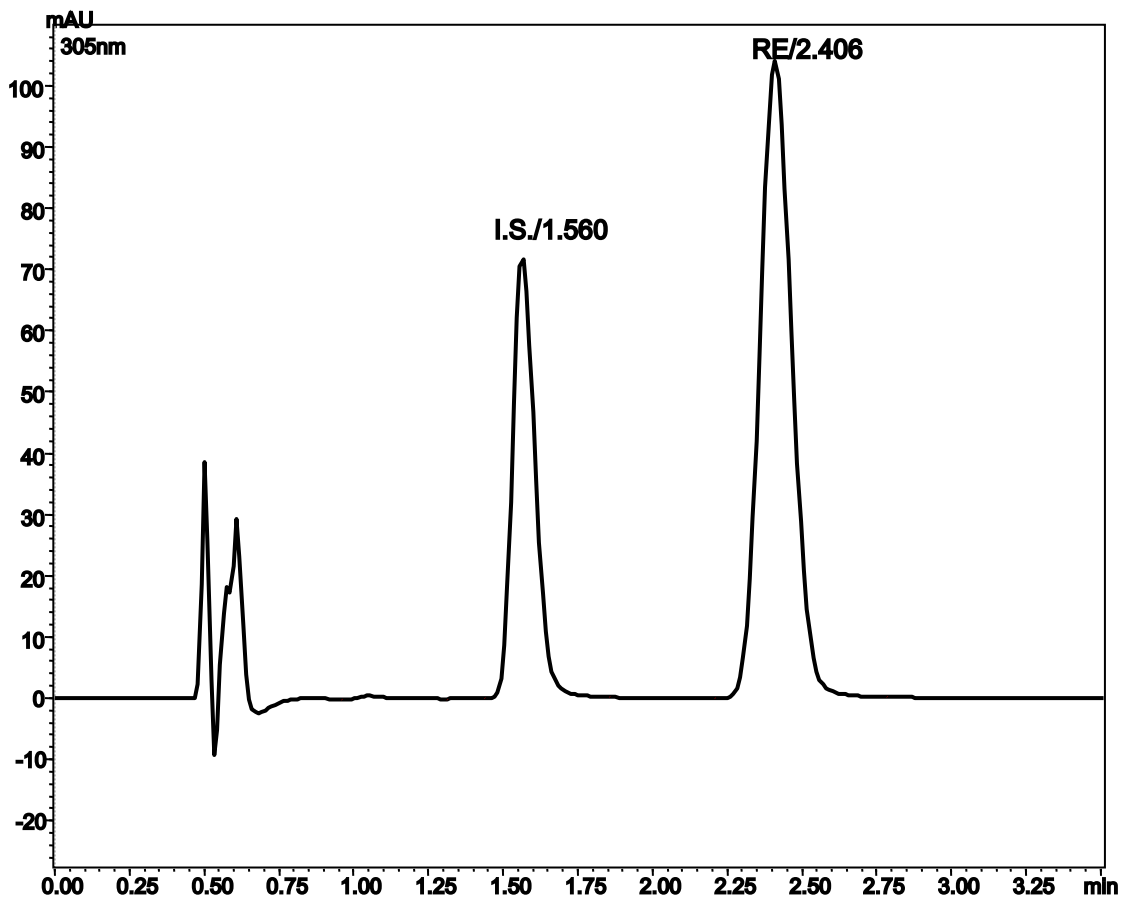
Deklarovaný obsah resveratrolu v přípravku je 0,2 mg v jedné tabletě. Průměrný obsah resveratrolu stanovený danou metodou byl 0,20 mg. V přípravku bylo nalezeno též 0,03 mg polydatinu. Celkový obsah obou účinných látek v přípravku byl 0,23 mg, což odpovídá 115,00 % deklarovaného množství.



Obrázek 36 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu polydatinu a resveratrolu v přípravku Walmark Lecithin s resveratrole

#### 6.4.5 Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Resveratrol antiaging

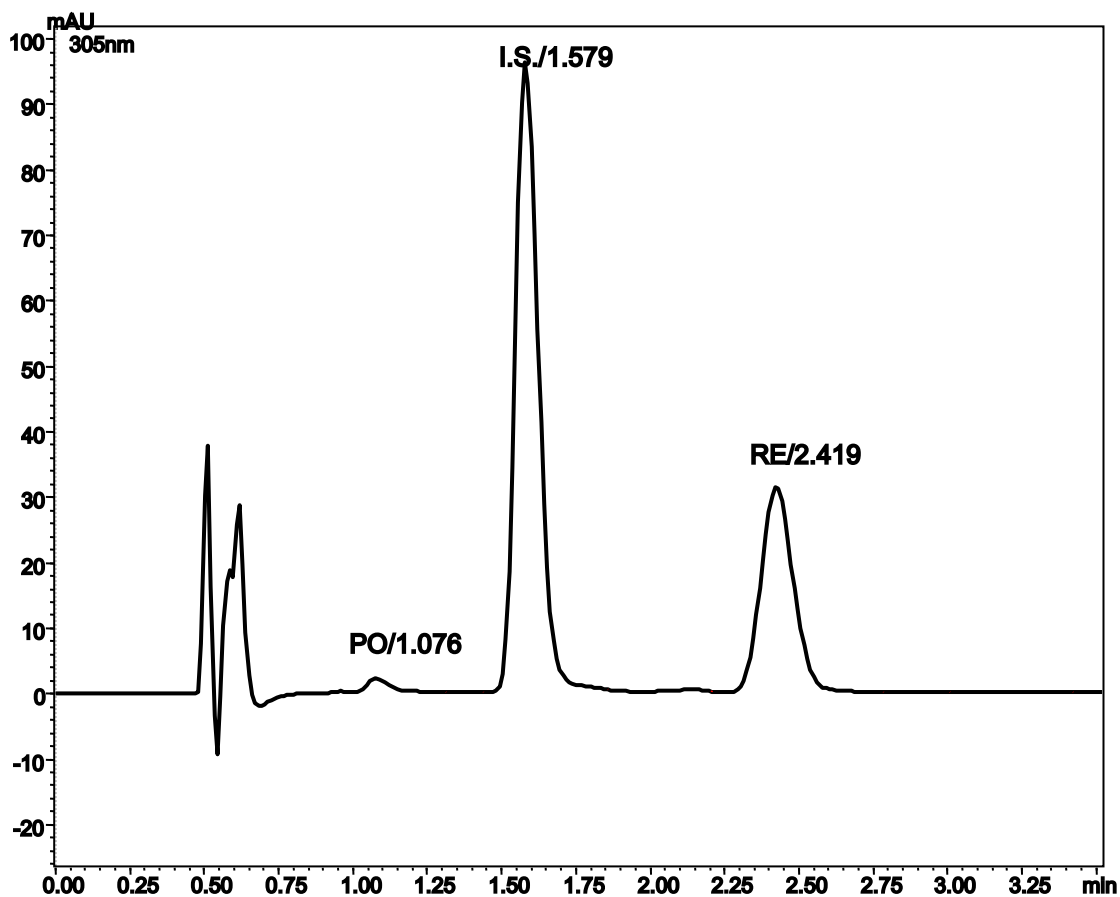
Deklarovaný obsah resveratrolu v přípravku je 50 mg v jedné tobolce. Průměrný obsah resveratrolu stanovený danou metodou byl 43,65 mg. Toto množství odpovídá 87,30 % deklarovaného obsahu.



Obrázek 37 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Resveratrol antiaging

#### 6.4.6 Stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Indonal Partner for Woman

Deklarovaný obsah resveratrolu v přípravku je 20 mg v jedné tobolce. Průměrný obsah resveratrolu stanovený danou metodou byl 18,98 mg. V přípravku bylo nalezeno též 1,58 mg polydatinu. Celkový obsah obou účinných látek v přípravku byl 20,56 mg, což odpovídá 102,80 % deklarovaného množství.



Obrázek 38 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu polydatinu a resveratrolu v přípravku Indonal Partner for Woman

Tabulka 27 – Souhrn výsledků stanovení obsahu resveratrolu a polydatinu ve všech hodnocených přípravcích (vztaženo na tobolku, tabletu)

Přípravek	Stanovený obsah v přípravku			
	Resveratrol [mg]	Polydatin [mg]	Celkem [mg]	% deklarovaného množství
A1 – Resveratrol 800 RX	77,27	2,54	79,81	99,76
Evelor Resveratrol 50 mg	45,15	-	45,15	90,30
Resveratrol MAX	56,83	0,37	57,20	71,50
Walmark Lecithin s resveratrolem	0,20	0,03	0,23	115,00
Resveratrol antiaging	43,65	-	43,65	87,30
Indonal Partner for Woman	18,98	1,58	20,56	102,80



## 7 Závěr

Byla vyvinuta, optimalizována a validována HPLC metoda pro současné stanovení resveratrolu a polydatinu v potravních doplňcích a aplikována na stanovení těchto analytů v přípravcích A1 Resveratrol 800 RX (A1 Pharma s.r.o.), Evelor Resveratrol (Medochemie Ltd), Walmark Lecithin s resveratolem (Walmark), Resveratrol MAX (Tachyon), Resveratrol antiaging (TheraTech), Indonal Partner for Woman (Synergia).

K analýze byly využity tyto optimální podmínky: Kolona Ascentis Express ES-Cyano (100 x 3,0 mm; 2,7  $\mu$ m) Supelco Analytical, izokratická eluce mobilní fází o složení acetonitril/0,5% kyselina octová v poměru 20:80 s průtokovou rychlostí 1,0 ml/min a detekce pomocí DAD detektoru při vlnové délce 305 nm při konstantní teplotě 60°C a tlaku 20,0 MPa. Byl zvolen nástřik 5  $\mu$ l. Jako nejvhodnější vnitřní standard byl vybrán *p*-nitrofenol.

U testování parametru linearity v daném koncentračním rozmezí bylo dosaženo korelačního koeficientu pro resveratrol 0,99977 a pro polydatin 0,999203. Opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka byla u roztoků obou analytů na všech třech koncentračních hladinách menší než 1 %. U pracovního roztoku o koncentraci 5 mg/l dosáhla hodnoty u polydatinu 0,27 %, u resveratrolu 0,40 %. U pracovního roztoku o koncentraci 100 mg/l dosáhla hodnoty u polydatinu 0,43 %, u resveratrolu 0,07 %. U pracovního roztoku o koncentraci 500 mg/l dosáhla hodnoty u polydatinu 0,68 %, u resveratrolu 0,76 %.

Byla hodnocena přesnost metody vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou, která byla u přípravku A1 Resveratrol 800 RX 0,79 % pro resveratrol a 2,81% pro polydatin, u přípravku Evelor Resveratrol 50 mg (obsahující pouze resveratrol) 2,76 %, u přípravku Resveratrol MAX 2,54 % pro resveratrol a 4,68 % pro polydatin a u přípravku Indonal Partner for Woman 1,63 % pro resveratrol a 3,72 % pro polydatin. Ve všech stanovovaných přípravcích dosahovala směrodatná odchylka u obou analytů hodnoty < 5 %.

Byla hodnocena správnost metody vyjádřená hodnotou výtěžnosti. Ta se pohybovala u stanovovaných přípravků v rozmezí 87,81 % - 107,33 % u resveratrolu a 83,17 % - 96,70 % u polydatinu. Horší hodnoty těchto parametrů byly pravděpodobně způsobeny velice malými navážkami vzorku k hodnocení parametru výtěžnosti.

Byly získány hodnoty rozlišení, asymetrie a počtu teoretických pater chromatografických píků. Rozlišení mezi píkem polydatinu a píkem vnitřního standardu *p*-nitrofenolu bylo 3,332, rozlišení mezi píkem vnitřního standardu *p*-nitrofenolu a píkem resveratrolu bylo 4,195. Hodnota faktoru asymetrie píků se pohybovala v rozmezí 1,104 – 1,441. Počet teoretických pater *N* byl v rozmezí 872 – 1722.

Testování robustnosti metody neprokázalo významný vliv změn podmínek analýzy na plochy píků analytů. Metodu lze považovat za dostatečně robustní.

Metoda byla použita pro stanovení resveratrolu ve vybraných potravních doplňcích. U přípravku A1 – Resveratrol 800 RX stanovený obsah resveratrolu spolu s polydatinem odpovídá 99,76 % deklarovaného množství. U přípravku Evelor Resveratrol 50 mg odpovídá stanovený obsah 90,30 % deklarovaného množství resveratrolu. U přípravku Resveratrol MAX odpovídá stanovený obsah resveratrolu spolu s polydatinem 71,50 % deklarovaného množství. U přípravku Walmark Lecithin s resveratrolem odpovídá stanovený obsah resveratrolu spolu s polydatinem 115,00 % deklarovaného množství. U přípravku Resveratrol antiaging odpovídá stanovený obsah 87,30 % deklarovaného množství resveratrolu. U přípravku Indonal Partner for Woman odpovídá stanovený obsah resveratrolu spolu s polydatinem 102,80 % deklarovaného množství.

## 8 Seznam obrázků a tabulek

### 8.1 Obrázky

Obrázek 1 – Chemická struktura stereoizomerních forem resveratrolu a polydatinu [6].....	13
Obrázek 2 – Znázornění endcappingu[28] .....	16
Obrázek 3 – Struktura Fused-Core částice [26].....	16
Obrázek 4 – Strukturní vzorec stacionární fáze ES-Cyano [30] .....	17
Obrázek 5 - Absorpční spektrum polydatinu .....	30
Obrázek 6 - Absorpční spektrum p-nitrofenolu (vnitřní standard) .....	30
Obrázek 7 - Absorpční spektrum resveratrolu.....	31
Obrázek 8 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Ascentis Express RP-amide C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m.....	32
Obrázek 9 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express RP-amide C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m, teplota 50°C , průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 25:75.....	32
Obrázek 10 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Ascentis Express C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m .....	33
Obrázek 11 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express C-18 100 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m, teplota 50°C , průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80.....	33
Obrázek 12 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Ascentis Express F5 100 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m.....	34
Obrázek 13 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express F5 100 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m, teplota 50°C , průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80.....	34
Obrázek 14 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Ascentis Express PHENYL-HEXYL 100 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m .....	35
Obrázek 15 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express PHENYL-HEXYL 100 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m, teplota 50°C , průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80 .....	35
Obrázek 16 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Ascentis Express ES-Cyano 150 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m .....	36
Obrázek 17 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express ES-Cyano 150 x 4,6 mm; 2,7 $\mu$ m, teplota 50°C , průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 25:75 .....	36
Obrázek 18 – Vliv podílu ACN v mobilní fázi na retenční čas analytů u kolony Chromolith SpeedROD NH <sub>2</sub> 50 mm x 4,6 $\mu$ m .....	37
Obrázek 19 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express ES-Cyano 100 x 3,0 mm; 2,7 $\mu$ m, teplota 50°C , průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80 .....	38

Obrázek 20 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express C-18 100 x 3,0 mm; 2,7 µm, teplota 50°C , průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80.....	38
Obrázek 21 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express PHENYL-HEXYL 100 x 3,0 mm; 2,7 µm, teplota 50°C , průtok 0,9 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80 .....	39
Obrázek 22 – Chromatografický záznam - kolona Ascentis Express F5 100 x 3,0 mm; 2,7 µm, teplota 50°C , průtok 1,0 ml/min, MF ACN/0,5% kys. octová 20:80.....	39
Obrázek 23 - Závislost retenčního času analyzovaných látek na teplotě kolony.....	41
Obrázek 24 - Chromatogram za optimálních separačních podmínek.....	42
Obrázek 25 – Kalibrační závislost pro polydatin .....	44
Obrázek 26 – Kalibrační závislost pro resveratrol.....	45
Obrázek 27 – Chromatografický záznam separace analytů při složení MF acetonitril – 0,5% kys. octová 10:90.....	54
Obrázek 28 – Chromatografický záznam separace analytů při složení MF acetonitril – 0,5% kys. octová 25:75.....	54
Obrázek 29 – Chromatografický záznam separace analytů při teplotě 35°C.....	55
Obrázek 30 – Chromatografický záznam separace analytů při teplotě 60°C.....	55
Obrázek 31 – Vliv délky ultrazvukové lázně při přípravě roztoku vzorku na plochu píku polydatinu .....	56
Obrázek 32 – Vliv délky ultrazvukové lázně při přípravě roztoku vzorku na plochu píku resveratrolu.....	56
Obrázek 33 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu polydatinu a resveratrolu v přípravku A1 – Resveratrol 800 RX .....	58
Obrázek 34 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Evelor Resveratrol 50 mg .....	59
Obrázek 35 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu polydatinu a resveratrolu v přípravku Resveratrol MAX.....	60
Obrázek 36 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu polydatinu a resveratrolu v přípravku Walmark Lecithin s resveratrolem.....	61
Obrázek 37 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu resveratrolu v přípravku Resveratrol antiaging .....	62
Obrázek 38 - Chromatografický záznam – stanovení obsahu polydatinu a resveratrolu v přípravku Indonal Partner for Woman.....	63

## 8.2 Tabulky

Tabulka 1 – Chromatografický systém .....	22
Tabulka 2 – Testované kolony .....	22
Tabulka 3 – Příprava pracovních roztoků pro kalibraci .....	25
Tabulka 4 – Volba vnitřního standardu .....	40
Tabulka 5 – Vliv teploty kolony na retenční časy analyzovaných látek .....	41
Tabulka 6 – Optimální podmínky pro HPLC analýzu .....	42
Tabulka 7 – Účinnost chromatografického systému .....	43
Tabulka 8 – Symetrie chromatografických píků .....	43
Tabulka 9 – Rozlišení chromatografických píků .....	43
Tabulka 10 – Testování linearity .....	44
Tabulka 11 – Parametry lineární regrese pro polydatin .....	44
Tabulka 12 – Parametry lineární regrese pro resveratrol .....	45
Tabulka 13 – Opakovatelnost analýzy pracovního roztoku pro kalibraci (c = 5 mg/l) .....	46
Tabulka 14 – Opakovatelnost analýzy pracovního roztoku pro kalibraci (c = 100 mg/l) .....	46
Tabulka 15 – Opakovatelnost analýzy pracovního roztoku pro kalibraci (c = 500 mg/l) .....	46
Tabulka 16 – Přesnost metody – A1 – Resveratrol 800 RX .....	47
Tabulka 17 – Přesnost metody – Evelor Resveratrol 50 mg .....	48
Tabulka 18 – Přesnost metody – Resveratrol MAX.....	48
Tabulka 19 – Přesnost metody – Indonal Partner for Woman .....	49
Tabulka 20 – Správnost metody – A1 – Resveratrol 800 RX .....	50
Tabulka 21 – Správnost metody – Evelor Resveratrol 50 mg .....	51
Tabulka 22 – Správnost metody – Resveratrol MAX.....	52
Tabulka 23 – Správnost metody – Indonal Partner for Woman .....	52
Tabulka 24 – Vliv složení mobilní fáze na plochy píků .....	53
Tabulka 25 – Vliv teploty na plochy píků.....	55
Tabulka 26 – Deklarovaný obsah resveratrolu v potravních doplňcích .....	57
Tabulka 27 – Souhrn výsledků stanovení obsahu resveratrolu a polydatinu ve všech hodnocených přípravcích (vztaženo na tobolku, tabletu) .....	64

## 9 Použitá literatura

- [1] HE H., CHEN X., WANG G., WANG J., DAVEY A. K. High-performance liquid chromatography spectrometric analysis of trans-resveratrol in rat plasma. *Journal of Chromatography B*. 2006, vol. 832, s. 177-180.
- [2] RODRÍGUEZ-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 Chemistry*. 2002, vol. 76, s. 371-375.
- [3] Sigma – Aldrich, Ascentis Express HILIC Guide, dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General\\_Information/1/t412061.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/1/t412061.pdf) (citováno: 29. 12. 2013)
- [4] WU CH., YANG J., WANG F., WANG X. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2013, vol. 11, s. 1-15.
- [5] PIÑEIRO Z., PALMA M., BARROSO C. G. Determination of trans-resveratrol in grapes by pressurised liquid extraction and fast high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2006, vol. 1110, s. 61-65.
- [6] VIAN M. A., TOMAO V., GALLET S., COULOMB P. O., LACOMBE J. M. Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. *Journal of Chromatography A*. 2005, vol. 1085, s. 224-229.
- [7] DOMÍNGUEZ C., GUILLÉN D. A., BARROSO C. G. Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *Journal of Chromatography A*. 2001, vol. 918, s. 303-310.
- [8] CAMONT L., COTTART CH., RHAYEM Y., NIVET-ANTOINE V., DJELIDI R., COLLIN F., BEAUDEUX J., BONNEFONT-ROUSSELOT D. Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous solutions. *Analytica Chimica Acta*. 2009, vol. 634, s. 121-128.
- [9] 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. *Pharmacological Research*. 2012, vol. 66, s. 375-382.

- [10] PubChem, Resveratrol - Compound Summary, dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=445154#>  
(citováno: 6. 12. 2013)
- [11] TAVERNIERS I., DE LOOSE M., VAN BOCKSTAELE E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2004, vol. 23, s. 535-552.
- [12] KOLOUCHOVÁ-HANZLÍKOVÁ I., MELZOCH K., FILIP V., ŠMIDRKAL J. Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detections in wines. *Food Chemistry*. 2004, vol. 87, s. 151-158.
- [13] 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. 570-577.
- [14] AMIOT M. J., ROMIER B., DAO T. A., FANCIULLINO R., CICCOLINI J., BURCELIN R., PECHERE L., EMOND C., SAVOURET J., SEREE E. Optimization of trans-Resveratrol bioavailability for human therapy. *Biochimie*. 2013, vol. 95, s. 1233-1238.
- [15] Agilent Technologies, Number of Theoretical Plates, Height Equivalent to a Theoretical Plate, Utilization of Theoretical Efficiency, Resolution, Phase Ratio, dostupné z: <http://www.chem.agilent.com/Library/Support/Documents/f39250232446.pdf>  
(citováno 6. 12. 2013)
- [16] HUBER L. Validation of HPLC Methods. *BioPharm International*. 1999, vol. 12, s. 64-66.
- [17] Chromatographyonline.com, Why Do Peaks Tail?, dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/data/articlestandard/lcgceurope/382003/69793/article.pdf> (citováno 5. 1. 2014)
- [18] Hplc.cz, Validační program pro statistické zpracování analytických dat, dostupné z: [http://www.hplc.cz/Validace/program\\_validace.htm](http://www.hplc.cz/Validace/program_validace.htm) (citováno 20. 1. 2014)
- [19] Santa Cruz Biotechnology, Polydatin, dostupné z: <http://www.scbt.com/datasheet-203203-polydatin.html> (citováno 16. 1. 2014)

- [20] 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. 685-689.
- [21] 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](http://www.biopeople.dk/fileadmin/filer/David/INGRIDMisc/Resveratrol2012/Conclusions_of_the_working_group_Resveratrol2012.pdf) (citováno 30. 1. 2014)
- [22] KLOUDA P. Moderní analytické metody. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [23] FEKETE S., FEKETE J., GANZLER K. Shell and small particles; Evaluation of new column technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2009, vol. 49, s. 64-71.
- [24] KOVAŘÍKOVÁ P., STARIAT J. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, HPLC – popis základního hardwaru, dostupné z: [http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce%202\\_HPLC%20instrumentace.pdf](http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%202_HPLC%20instrumentace.pdf) (citováno 28. 12. 2013)
- [25] KOVAŘÍKOVÁ P., STARIAT J. Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, HPLC – stacionární fáze a separační módy, dostupné z: [http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/221432/mod\\_resource/content/4/HPLC\\_kurz/Lekce\\_PDF/Lekce%204\\_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf](http://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/221432/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%204_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf) (citováno 29. 12. 2013)
- [26] Sigma – Aldrich, Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) with the Ascentis Express Phenyl-Hexyl Column, dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/ultra-high-performance.html> (citováno 28. 12. 2013)
- [27] Sigma – Aldrich, Ascentis Express Columns for Fast HPLC, dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=17841436> (citováno 28. 12. 2013)
- [28] Hplc.cz, Vliv aktivity zbytkových silanolových skupin, dostupné z: <http://www.hplc.cz/Tip/silanol.htm> (citováno 28. 12. 2013)



- [29] Sigma – Aldrich, Ascentis Express ES-Cyano, 2.7  $\mu\text{m}$  HPLC Column, dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=108679944> (citováno 29. 12. 2013)
- [30] Sigma – Aldrich, Ascentis Express, dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/japan/analytical-chromatography/hplc/ascentis-express.html> (citováno 29. 12. 2013)
- [31] Sigma – Aldrich, Product information – Resveratrol, dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/r5010pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/r5010pis.pdf) (citováno 29. 12. 2013)
- [32] LI Y., ZHU W., TAO J., XIN P., LIU M., LI J., WEI M. Resveratrol protects cardiomyocytes from oxidative stress through SIRT1 and mitochondrial biogenesis signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013, vol. 438, s. 270-276.
- [33] LANZILLI G., GOTTARELLI A., NICOTERA G., GUIDA S., RAVAGNAN G., FUGGETTA M. P. Anti-inflammatory Effect of Resveratrol and Polydatin by In Vitro IL-17 Modulation. 2012, vol. 35, s. 240-248.