

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

**HPLC analýza vo vode rozpustných vitamínov
s využitím elektrochemického detektoru**

Diplomová práca

V Hradci Králové 2006
Vedúci diplomovej práce

Ivan Jesenský
PharmDr. Petr Kastner, Ph.D.

Na tomto mieste by som rád poďakoval svojmu vedúcemu diplomovej práce PharmDr. Petrovi Kastnerovi za cenné rady a pripomienky k práci. Ďalšie moje poďakovanie patrí Mgr. Anne Zerzaňovej, Mgr. Radimovi Kučerovi a Mgr. Václavovi Žižkovskému. Moje poďakovanie patrí samozrejme aj všetkým pracovníkom oddelenia kontroly liečiv za ochotu a pomoc.

OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	CIEĽ PRÁCE.....	9
3	TEORETICKÁ ČASŤ	11
3.1	VITAMÍNY ROZPUSTNÉ VO VODE	12
3.1.1	BIOTÍN.....	12
3.1.1.1	METÓDY STANOVENIA BIOTÍNU	13
3.1.2	B2.....	14
3.1.3	B12.....	14
3.1.4	AF (KYSELINA LISTOVÁ).....	15
3.2	VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRFIA	16
3.3	CHROMATOGRAF.....	17
3.3.1	ČERPADLÁ	18
3.3.2	KOLÓNY.....	18
3.3.3	DETEKTORY	19
3.3.3.1	SPEKTROFOTOMETRICKÝ DETEKTOR	19
3.3.3.2	HMOTNOSTNÝ DETEKTOR	20
3.3.3.3	FLUORIMETRICKÝ DETEKTOR.....	21
3.3.3.4	REFRAKTOMETRICKÝ DETEKTOR	21
3.3.3.5	ELEKTROCHEMICKÝ DETEKTOR.....	21
3.4	DIZAJN ELEKTROCHEMICKEJ CELY	22
3.5	HYDRODYNAMICKÝ VOLTAMOGRAM	26
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	30
4.1	MATERIÁL A POMÔCKY	31
4.1.1	CHEMIKÁLIE.....	31
4.1.2	ZOSTAVA PRE HPLC	31
4.1.3	PRÍSTROJE.....	32
4.1.3	ĎALŠIE POMÔCKY	32
4.2	PRÍPRAVA MOBILNÝCH FÁZ.....	32
4.3	PRÍPRAVA ZÁSOBNÝCH ROZTOKOV VITAMÍNOV A VNÚTORNÝCH ŠTANDARDOV	34
4.4	TVORBA HYDRODYNAMICKÉHO VOLTAMOGRAMU.....	36
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	37
5.1	HĽADANIE OPTIMÁLNEJ MOBILNEJ FÁZY	38
5.2	HYDRODYNAMICKÉ VOLTAMOGRAMY	45

5.3	HĽADANIE VNÚTORNÉHO ŠTANDARDU	55
6	ZÁVER	56
7	SÚHRN	58
8	SUMMARY	60
9	POUŽITÁ LITERATÚRA	62

1 ÚVOD

Kvapalinovú chromatografiu objavil v roku 1903 botanik M. S. Cvet, ktorý ako prvý rozdelil na stĺpci sorbentu zmes listových farbív. Odvtedy prešla chromatografia veľkým vývojom a v súčasnosti sa používa pri separácii veľmi zložitých vzoriek ako sú napr. extrakty biologického materiálu alebo extrakty životného prostredia. Často sa používa aj pri kontrole rôznych výrobných procesov, v potravinárskej chémii, ale bohaté využitie má hlavne v rozličných odvetviach farmaceutického priemyslu.

Pod názvom chromatografické metódy možno zahrnúť všetky operácie, ktoré sú založené na fyzikálno-chemických princípoch, pri ktorých dochádza k postupnému, mnohokrát opakovanému vytváraniu rovnovážnych stavov separovaných látok medzi dvoma fázami (1).

Klasická kvapalinová chromatografia je všeobecne známa separačná metóda. Separácia látok touto tradičnou metódou je však veľmi zdĺhavá, pomerne málo účinná, preto sa v poslednom čase konštruovali prístroje, ktoré tieto nedostatky odstraňujú a vyznačujú sa veľkou rýchlosťou analýz, ale hlavne vysokou separačnou schopnosťou. Na úspešnú realizáciu separačného procesu je nevyhnutné vybrať vhodnú mobilnú a stacionárnu fázu a tiež aj vhodný detektor.

V kvapalinovej chromatografii sa používajú typy detektorov, ktoré pracujú na rôznych princípoch: refraktometrické, deflexné, reflexné, UV detektory, IR detektory, fluorometrické detektory. Ďalšou veľkou skupinou detektorov v chromatografii sú elektrochemické detektory. Vývoj týchto detektorov stále nie je ukončený a sú predmetom záujmu na mnohých výskumných pracoviskách. Elektrochemické princípy možno využiť tak na kvalitatívnu ako aj na kvantitatívnu detekciu látok, ktoré sa nachádzajú v analyzovanej vzorke vo veľmi malých koncentráciách. Pracujú na rôznych princípoch, napr. meranie vodivosti eluátu (konduktometrické detektory) alebo meranie elektrického náboja (coulometrické detektory). Signál, ktorý sa získa pomocou detektora, sa transformuje na elektrickú veličinu a po zosilnení sa zaznamenáva zapisovačom alebo počítačom. Reakcia na odozvu detektora musí byť dostatočne rýchla a je výhodné použiť rôzne rozsahy zapisovača.

HPLC umožňuje vzhľadom na využitie rozdielnych separačných princípov analýzu zložitých biologických systémov. V porovnaní s bioanalytickými metódami, ktoré sú síce citlivé, rýchle, automatizované, má HPLC separácia určite vyššiu špecifičnosť a dáva reálnu možnosť stanoviť simultánne nielen analyzovanú látku, ale aj prípadné metabolity, degradačné produkty ako aj nečistoty. Preto našla HPLC svoje využitie aj vo farmaceutickom priemysle pri vstupnej, medzioperačnej a výstupnej

kontrole liečiv. Využíva sa na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu hlavných aj vedľajších zložiek v liečivách. V klinickom laboratóriu je HPLC doporučovaná aj vo farmakokinetických predklinických a klinických štúdiách. Pri vývoji nových liečiv sa v niektorých prípadoch analyzujú nielen látky syntetické, ale aj zlúčeniny izolované z prírodného materiálu a jednotlivé postupy sa od seba líšia často len vhodnými predseparačnými krokmi, prípadne ich následnosťou alebo kombináciou.

Z týchto dôvodov sa táto diplomová práca zaoberá optimalizáciou podmienok pre stanovenie biotínu práve metódou HPLC coulometrickým detektorom.

2 CIEĽ PRÁCE

Diplomová práca sa zaoberá optimalizáciou chromatografických podmienok na stanovenie biotínu.

Bude hľadaná mobilná fáza pri ktorej bude dochádzať k najlepšej separácii biotínu od ostatných zložiek roztoku, bude hľadaná najvhodnejšia chemická substancia, ktorá by mohla byť použitá ako vnútorný štandard a poslednou úlohou bude zostavenie hydrodynamických voltamogramov jednotlivých vo vode rozpustných vitamínov a niektorých vnútorných štandardov.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 VITAMÍNY ROZPUSTNÉ VO VODE

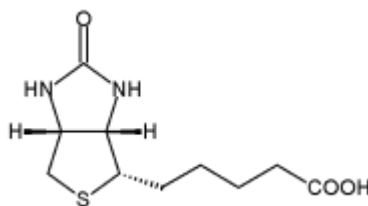
Vitamíny sú nevyhnutnou zložkou potravy. Ich potreba je malá, ale zabezpečujú správnu funkciu organizmu dôležitú pre zachovanie zdravia. Vitamíny sa rozdeľujú podľa rozpustnosti na vitamíny rozpustné v tukoch a vitamíny rozpustné vo vode. Do prvej skupiny patria vitamíny A, D, E, K a medzi vo vode rozpustné vitamíny patria vitamíny skupiny B a vitamín C (2).

Vo vode rozpustné vitamíny na rozdiel od vitamínov rozpustných v tukoch, ktoré sa vstrebávajú do krvného riečišťa a sú uchovávané v pečeni, sa v organizme neukladajú, ale ich nadbytok sa vylúči močom. Preto je nutný ich každodenný prísun.

3.1.1 BIOTÍN

Vitamín H (štruktúrny vzorec – obr. č.1) je dôležitou zložkou mnohých enzýmov, látok potrebných pri trávení a látkovej výmene, priaznivo ovplyvňuje vlasovú štruktúru (3). Podieľa sa taktiež na látkovej výmene cukrov, tukov a bielkovín. Nachádza sa v rôznych druhoch potravy, najmä v pečeni, arašidovom masle, vaječnom žĺtku, mrkve, hrachu, sóji, pšeničných klíčkoch a ovsených vločkách. Podáva sa tehotným a dojčiacim matkám. Pri normálnej strave nie je nedostatok známy, ale môže byť vyvolaný pravidelným požívaním surového vaječného bielka, užívaním antibiotík (z dôvodu zníženia počtu baktérií produkujúcich biotín v čreve), prípadne pri syndróme krátkeho čreva (short – gut syndrome) (4,5). K príznakom patrí dermatitída, vypadávanie vlasov, únava, anorexia, anémia, vysoká hladina cholesterolu a cukru v krvi (6).

Biotín nachádza uplatnenie aj vo veterinárnej medicíne kde sa využíva pri regenerácii nekvalitnej a narušenej rohoviny, na urýchlenie rastu rohoviny kopyta a pre zlepšenie kvality srsti.



Obr.č.1: Štruktúrny vzorec biotínu

3.1.1.1 METÓDY STANOVENIA BIOTÍNU

Jedným zo spôsobov na rýchle a presné stanovenie biotínu z rôznych liekových foriem za pomoci HPLC je separácia na kolóne Supelcosil LC – 18 (25 cm x 4,6 mm, veľkosť častíc 5 µm) s použitím predkolóny Sentry. Mobilná fáza bola tvorená z 80% vodným roztokom (pH upravené kyselinou fosforečnou na hodnotu 3,0) a z 20 % acetonitrilom, pri prietoku 1.5 ml/min. Biotín bol detekovaný s použitím DAD pri vlnovej dĺžke 190 nm. Retenčný čas biotínu bol 3.8 ± 0.2 min (7).

Bola vytvorená a validovaná aj metóda na stanovenie taurínu a 10 ďalších vo vode rozpustných vitamínov, zahŕňajúcich aj biotín. Separácia prebiehala na kolóne Johnson Spherigel C18 s reverznou fázou (25cm x 4.6 mm). Mobilná fáza bola tvorená 5 mM vodným roztokom kyseliny heptafluorobutánovej. Detekcia cieľových látok bola pomocou HPLC – ESI - MS, neustálym prepínaním medzi pozitívnym a negatívnym iónovým módom. Ako interný štandard bola používaná kyselina hippurová (8).

Ďalšiou metódou stanovenia biotínu v multivitamínových a multiminerálnych tabletách je separácia na reverznej fáze s UV detektorom pri vlnovej dĺžke 200 nm a bola vyvinutá autormi Ekpe, A.E., Hazen, C. ako to publikovali vo svojom článku Liquid chromatographic determination of biotin in multivitamin-multimineral tablets (9).

Kolektív ďalších autorov sa vo svojej práci na rozdiel od nás nevenovali výberu optimálnej mobilnej fázy, ale vyvinuli dve citlivé a špecifické metódy na stanovenie biotínu v potrave, tabletách a potravinárskych premixoch, pri ktorých v závislosti na vzorke a obsahu biotínu boli použité dve rôzne metódy extrakcie a podmienky pre HPLC (10)

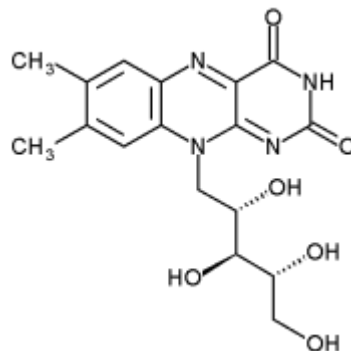
Prehľad analytických metód na stanovenie biotínu bol vytvorený Friedrichom (11). Biologické skúšky s na biotíne závislými kmeňmi baktérií a kvasiniek ako indikátormi prítomnosti biotínu alebo proteíny viažuce biotín, ktoré sa používajú pre kvantifikáciu biotínu v biologických médiách (12). Boli popísané aj metódy založené na potenciometrii s iónovo selektívnymi elektródami (13), polarografii (14), TLC (15) a HPLC (16,17).

3.1.2 B2

Riboflavín – Vitamín B2 (štruktúrny vzorec – obr. č.2) – sa v prírode vyskytuje najčastejšie vo forme flavínmononukleotidu (FMN), flavínadinukleotidu (FAD) alebo viazaný na bielkoviny.

Riboflavín je vo forme FMN a FAD koenzýmom oxidoreduktáz, ktoré sú vzhľadom na svoje žlté sfarbenie známe aj ako flavoproteíny. Flavoproteíny získané z potravy sa štiepia na riboflavín, ktorý sa v pečeni transformuje na koenzýmy. Zúčastňujú sa oxidačno – redukčných reakcií v metabolických dejoch a prenosu kyslíka v dýchacom reťazci (18). Jeho dostatočné zastúpenie v organizme pozitívne ovplyvňuje všetky metabolické reakcie, teda metabolizmus cukrov, tukov aj bielkovín. Zúčastňuje sa všetkých procesov získavania energie v bunke (6).

Dlhodobý nedostatok sa prejavuje bolesťami hrdla, zápalom faryngeálnej sliznice, glositídami, seborheickou dermatitídou a inými zápalovými ochoreniami kože. (19)



Obr.č.2 : Štruktúrny vzorec vitamínu B2

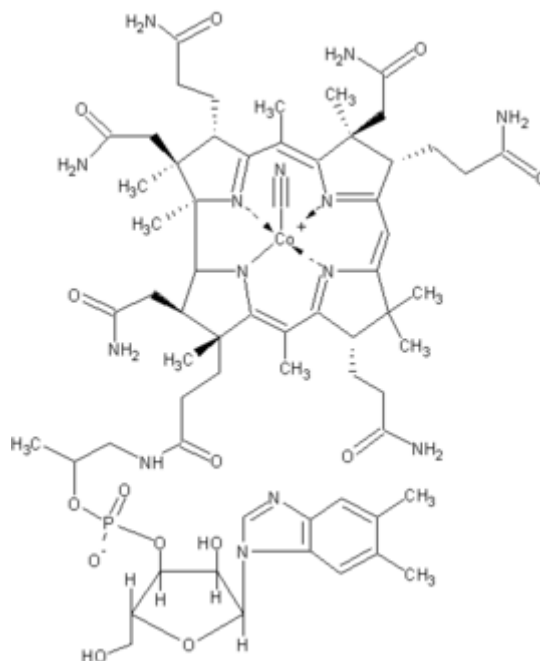
3.1.3 B12

Objavený bol medzi poslednými, a to v pečeni teľaťa. Vitamín B₁₂ (štruktúrny vzorec – obr. č.3), sa tiež volá antiperniciózný faktor. Je to látka patriaca medzi korinoidy (kobalamíny), odvodené od korínu. Je tvorená štyrmi pyrolovými jadrami. V ich skelete je pevne viazaný kobalt. Odtiaľ názvy korinoidy a kobalamíny. Vitamín B₁₂ sa vyskytuje v dvoch formách: kyanokobalamín a hydroxokobalamín, ktorý je aktívnejší pri tvorbe krvi. Pretože rastliny obsahujú tento vitamín len vo veľmi malom množstve,

aj to len v obmedzenom počte druhov, býva tento vitamín jedným z problémov plnohodnotnej vegánskej výživy.

Vitamín B12 a foláty sú základnými látkami niektorých metabolických ciest v centrálnom nervovom systéme. (20, 21). Má význam v biosyntéze nukleových kyselín, je nutný pre tvorbu dopamínu, noradrenalínu a serotonínu. Je dôležitý pre zdravý nervový systém, normálnu funkciu ženských pohlavných orgánov, menštruačný cyklus, správny vývoj plodu, rast detí atd.

Najčastejšou príčinou nedostatku je spôsobená neschopnosťou sliznice žalúdka produkovať tzv. intrinsic faktor, ktorý je nutný pre väzbu a resorpciu kobalamínu. (19)



Obr.č.3 : Štruktúrny vzorec vitamínu B12

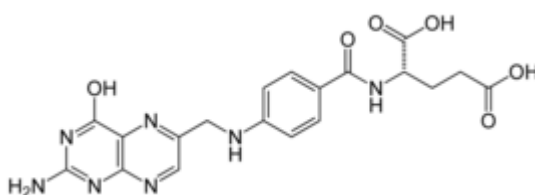
3.1.4 AF (Kyselina listová)

Biologicky aktívne deriváty kyseliny listovej zahrňame pod spoločný názov foláty. Aktívnou formou týchto látok je 5,6,7,8-tetrahydrolistová kyselina.

Kyselina listová (Acidum folicum, AF, štruktúrny vzorec – obr. č.4) a jej deriváty zohrávajú dôležitú úlohu ako koenzýmy pri syntéze nukleových kyselín, bielkovín a niektorých esenciálnych aminokyselín. Sú teda nevyhnutné pre rast, reprodukciu a krvotvorbu. Významná je úloha týchto látok pri metabolizme aminokyselín, najmä pri premene homocysteínu na methionín, pričom účinne zasahujú

aj pyridoxín a vitamín B12 (22,23). Škodlivé pôsobenie homocysteínu na steny ciev je nebezpečné hlavne pre osoby s kardiovaskulárnymi ochoreniami. Kyselina listová má teda ochranný vplyv pri vzniku srdcových a mozgových defektov, ale i defektov chrbtice.

K prejavom nedostatku sú poruchy rastu a krvotvorby. Vzniká makrocytárna, megaloblastická anémia, čiastočne je postihnutá aj tvorba bielych krviniek a krvných doštičiek ako priamy dôsledok poruchy syntézy DNA. Nedostatok spôsobuje aj zmeny na sliznici, gastrointestinálne poruchy, čo môže mať za následok poruchy resorpcie tohto vitamínu.



Obr.č.4: Štruktúrny vzorec kyseliny listovej.

3.2 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA

Klasická kvapalinová chromatografia je dobre známa separačná metóda. Kolóna s rozličným priemerom sa naplní vhodne zvoleným adsorbentom, mobilná fáza pomaly preteká kolónou, unáša zmes látok, ktoré sa počas prechodu kolónou separujú na jednotlivé zložky, priestorovo od seba oddelené. Frakcie eluátu sa zachytávajú a ďalej analyzujú. Separácia látok touto metódou je však značne zdĺhavá a má pomerne malú účinnosť používaných kolón. Preto boli skonštruované prístroje ktoré tieto nedostatky odstraňujú, vyznačujú sa veľkou rýchlosťou analýz s vysokou účinnosťou používaných kolón.

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, skrátene HPLC, pochádzajúce z anglického High-performance liquid chromatography je jednou z chromatografických metód.

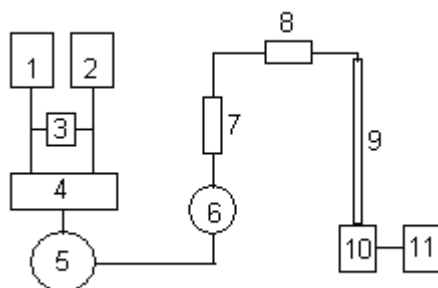
Pri nástreku dvojice látok do chromatografickej kolóny sa najprv vytvorí elučný pás obsahujúci zmes oboch látok. Tie sú potom unášané mobilnou fázou a na náplni kolóny dochádza k ich postupnej separácii. Medzi stacionárnou a mobilnou fázou dochádza k neustálemu rovnovážnemu rozdeľovaniu medzi obe fázy. Zlúčeniny ktoré

sú v mobilnej fáze rozpustné viac ako v stacionárnej prechádzajú kolónou rýchlejšie než látky s vyššou afinitou k fáze stacionárnej. Po výstupe prvej látky z kolóny indikuje detektor jej prítomnosť v eluáte a zaznamená elučný pík, to znamená že na konci analýzy sú obe rozdelené látky detektorom zaznamenané ako dve elučné krivky (píky).

Identifikačnou charakteristikou látky je za presne stanovených chromatografických podmienok jej retenčný čas. Na kvantifikáciu nám slúži výška píku, alebo plocha pod krivkou píku. Kvantifikácia látok sa prevádza použitím interného alebo externého štandardu. Kvantifikácia s použitím interného štandardu je výhodnejšia, pretože celá analýza prebieha rovnako pre sledované látky ako aj pre štandard.

3.3 CHROMATOGRAF

Kvapalinový chromatograf sa skladá z častí, ktoré zabezpečujú transport mobilnej fáze, dávkovanie vzoriek, separáciu látok a ich detekciu. Schéma chromatografu uvedená na obr. 5 môže mať množstvo obmien, v zásade však musí byť zachované radenie základných elementov za sebou. V súčasnej dobe sú kvapalinové chromatografy ovládané pomocou počítačov so špeciálnym, k tomuto účelu vyvíjaným softwarom.



Obrázok č.5.: Schéma kvapalinového chromatografu.

- 1,2 – zásobníky mobilnej fáze
- 3 – programovacia jednotka gradientu
- 4 – zmiešavač

- 5 – odplyňovač
- 6 – vysokotlakové čerpadlo
- 7 – ventil
- 8 – saturačná predkolona
- 9 – kolona
- 10 – detektor
- 11 – PC

3.3.1 ČERPADLÁ

Prietok mobilnej fázy je dôležitý pre presnosť a reprodukovateľnosť chromatografickej separácie. Mobilná fáza je umiestnená v zásobných fľašiach, z ktorých sa dopravuje pomocou vysokotlakového čerpadla to chromatografického systému. V HPLC sa využívajú tlaky od 1 do 60 MPa a prietoky od 0.5 do 20 ml/min. Základné typy čerpadiel sú pulzné alebo bezpulzné.

Pulzné čerpadlá majú objem pracovnej komory pomerne malý a potrebný prietok sa dosahuje mnohokrát opakovaným stlačením a vypudením mobilnej fázy z pracovnej komory čerpadla.

Samostatným typom čerpadiel sú tzv. hydraulické pumpy s viacerými solenoidnými ventilmi a kohútikmi, ktoré umožňujú miešanie viacerých kvapalín, tvoriacich mobilnú fázu (24).

3.3.2 KOLÓNY

Vo vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii má voľba kolón a ich príslušenstva rozhodujúci význam. Účinnosť kolóny závisí na kvalite použitého sorbentu, dĺžke kolóny, na jej tvare, na materiále z ktorého je zhotovená a na jeho vnútornom povrchu atď.

V praxi sa používajú kolóny zo špeciálne tvrdeného borosilikátového skla (pracovné tlaky do 10 Mpa), ale hlavne kolóny z ocele, prípadne titánové, ktoré odolávajú podstatne vyšším tlakom (do 80 Mpa) s dĺžkou 5 – 25 cm a vnútorným priemerom 2 – 6 mm. Dôležité je aby vnútorný povrch bol hladký a náplň kolóny homogénna a rovnomerná. Tieto kolóny musia odolávať vysokým tlakom, chemickému pôsobeniu mobilnej fázy a separovaných látok, na ktoré nesmie pôsobiť rozkladne.

K najpoužívanejším náplniam patrí silikagel, iontomeniče, ale najčastejšie chemicky viazané fázy, ktoré sa pripravujú reakciou silikagelu s chlorsilánmi alebo alkoxyasilánmi. Naviazané môžu byť dlhé alkylové reťazce hydrofóbneho charakteru (C₈, C₁₈), čoho sa využíva pri RP prevedení (reverse phase) alebo kratšie C₂ a C₃, ktoré obsahujú polárne skupiny (-NH₂, -CN, -OH, -COOH). Keďže veľa liečiv patrí medzi opticky aktívne látky, s výhodou sa využívajú aj chirálne stacionárne fázy, ktoré umožňujú separáciu a stanovenie optických izomérov.

3.3.3 DETEKTORY

Súčasťou každej chromatografickej analýzy bezprostredne naväzujúcou na separáciu je detekcia rozdelených látok. Samotný pojem detekcia v sebe zahrňuje okrem snahy o nájdenie všetkých komponent analyzovanej zmesi aj určenie ich kvantitatívneho zastúpenia. Obe tieto funkcie sú v prípade kvapalinového chromatografického detektoru plnené kontinuálnym meraním vhodnej fyzikálnej vlastnosti analyzovaných látok v eluáte. Takouto vlastnosťou môže byť napr. index lomu, absorpcia v UV a VIS oblasti, fluorescencia, oxidačno redukčné chovanie a pod.

Medzi základné požiadavky na vlastnosti detektoru patria :

- univerzálnosť
- vysoká citlivosť
- linearita odozvy
- reprodukovateľnosť
- spoľahlivosť, jednoduchá manipulácia ale aj primeraná cena

3.3.3.1 SPEKTROFOTOMETRICKÝ DETEKTOR

Ich značné rozšírenie vo farmaceutickej analýze je podmienené predovšetkým vysokou citlivosťou pre mnohé látky. Jedná sa hlavne o organické zlúčeniny schopné

pohlcovať žiarenie určitej vlnovej dĺžky a poskytovať tak absorpčné spektrum. Detektory používané v kvapalinovej chromatografii merajú úbytok žiarenia v oblasti ultrafialového a viditeľného žiarenia. Veľkosť absorpcie žiarenia roztokom analyzovanej látky je daná Lambert – Beerovým zákonom. Oblasť infračerveného žiarenia sa využíva iba okrajovo, pretože väčšina rozpúšťadiel absorbuje práve v tejto časti spektra.

Typy fotometrických detektorov sú:

- s pevne nastavenou vlnovou dĺžkou (obvykle 220, 254, 280, 436, 546 nm)
- s možnosťou voľby medzi niekoľkými danými vlnovými dĺžkami
- s možnosťou nastavenia ľubovoľnej vlnovej dĺžky
- diode array detector (DAD) - sú to detektory s rýchlym záznamom spektra, pracujú s veľkým počtom fotodiód umiestnených na malej ploche. Po priechode mernou prietokovou celou sa spektrum rozkladá holografickou mriežkou, takže na každú fotodiódu dopadá žiarivý tok o určitej vlnovej dĺžke zoslabený absorpciou v cele detektora. Každá fotodióda je spojená s kondenzátorom, dopredu nabitým na určitú hodnotu a fotoelektrický prúd vznikajúci po dopade žiarenia na fotodiódu vybijie kondenzátor úmerne veľkosti dopadajúceho žiarivého toku. V nasledujúcej fáze sa kondenzátor dobije a meria sa prúd spotrebovaný na dobitie, ktorého veľkosť sa pre každú fotodiódu ukladá do počítača, ktorý výsledky vyhodnocuje.

3.3.3.2 HMOTNOSTNÝ DETEKTOR

Pre detekciu liečiv je využívané tiež spojenie HPLC s hmotnostnou spektrometriou (MS). Po výstupe z kolóny je potrebné z eluátu odstrániť mobilnú fázu a ionizovať molekuly liečiva v plynnom stave. Pre spojenie s HPLC sa najviac používa ionizácia elektrosprejom, chemická ionizácia za atmosférického tlaku a fotoionizácia za atmosférického tlaku. Nabité častice (molekulárne a fragmentové ióny) sú v magnetickom alebo vysokofrekvenčnom poli separované podľa hmotnosti a náboja (hodnôt m/z) a je zaznamenané hmotnostné spektrum (tj. počet iónov vo vzťahu k pomeru – hmotnosť/počet nábojov). Spojenie HPLC-MS je vysoko selektívne, vysoko

citlivé a navyiac poskytuje celú radu údajov potrebných pre identifikáciu neznámych látok.

3.3.3.3 FLUORIMETRICKÝ DETEKTOR

Je to vysoko selektívny detektor, ktorého odozva nezávisí na kolísaní teploty, preto sa vyznačuje dobrou linearitou. Pri fluorimetrickej detekcii prechádza eluovaná látka prietokovou celou detektoru, absorbuje UV žiarenie z intenzívneho zdroja a pritom vydá fluorescenčné žiarenie s väčšou vlnovou dĺžkou, než má žiarenie excitačné. Emitované žiarenie dopadá na fotonásobič a premení sa na elektrický signál ktorého veľkosť je priamo úmerná toku fluorescenčného žiarenia.

3.3.3.4 REFRAKTOMETRICKÝ DETEKTOR

Detekčný princíp je založený na meraní rozdielu indexu lomu analyzovaných látok a mobilnej fázy. Keďže index lomu je veličina závislá na vonkajších podmienkach, refraktometrické detektory sú veľmi citlivé na zmeny teploty, tlaku, prietoku a zložení mobilnej fázy. Citlivosť refraktometrickej detekcie sa pohybuje medzi 1 – 10 ppm. Refraktometrické detektory patria medzi najmenej citlivé detektory, a preto sa využívajú v prípadoch, keď sa jedná buď o vysoké koncentrácie stanovovaných látok, alebo pre detekciu látok, ktoré neposkytujú odozvu u citlivejších detekčných zariadení. (25)

3.3.3.5 ELEKTROCHEMICKÝ DETEKTOR

Využíva deje súvisiace s elektrochemickou reakciou, ktorá prebieha na fázovom rozhraní elektróda roztok. Roztok detekovaných zlúčenín vychádzajúcich z kolóny je vedený do detekčnej cely, kde prichádza do styku s dvoma, prípadne troma elektródami. V podstate sa jedná o elektrochemický článok, ktorého chovanie sa pri meniacom zložení roztoku sleduje. Takýto článok je potom charakterizovaný rôznymi elektrickými

veličinami ako je elektródový potenciál, prúd, kapacita a iné. Ako ďalšia veličina je zaznamenaný čas. Zaznamenaný elektrický signál je potom spravidla priamoúmerný látkovému množstvu detekovanej zložky. Podstatou elektrochemických detektorov je vzťah medzi elektrickými veličinami a koncentráciou (c) sledovanej zložky.

Základným vzťahom popisujúcim elektrochemické deje je Nernstova rovnica. Popisuje potenciál elektródy ponorenej do roztoku elektrolytu ako funkciu koncentrácie elektroaktívnej látky.

$$E = E^0 - \frac{0.059}{n} \log \frac{[ox]}{[red]}$$

E^0 – štandardný redoxný potenciál

n – počet prenášaných elektrónov

ox – koncentrácia oxidovanej formy

red – koncentrácia redukovanej formy

Elektrochemický detektor je v súčasnej dobe považovaný za najcitlivejší detektor pre HPLC (26). Je extrémne citlivý na elektroaktívne frakcie molekuly. Tak ako pri iných detektoroch aj pri elektrochemickom detektore je identifikácia založená na retenčnom čase molekuly, ktorý je porovnávaný s retenčným časom externého štandardu. Tu však vyvstáva problém, že veľa látok sa eluuje v podobnom retenčnom čase. Tento nedostatok môže vyústiť v navýšení koncentrácie sledovanej látky kôli neviditeľnej koelúcii. Takýto problém bol prvýkrát sledovaný pri detekčných technikách založených na absorbcii v oblasti UV/VIS. Odhaliť koelúcie sa podarilo až s nástupom PDA detektorov a kvapalinovej chromatografii s hmotnostným spektrometrom.

3.4 DIZAJN ELEKTROCHEMICKEJ CELY

Komerčne dostupné cely pre elektrochemické detektory sa obvykle skladajú z troch elektród – pracovnej, porovnávacej a referenčnej. Tieto elektródy môžu byť rôzne usporiadané.

Medzi pracovnú a referenčnú elektródu je vkladajú fixný rozdiel potenciálu. Tento potenciál riadi elektrochemickú reakciu na povrchu pracovnej elektródy. Prúd produkovaný elektrochemickou reakciou na pracovnej elektróde je porovnávaný s prúdom pretekajúcim na opačnej strane na porovnávacjej elektróde. Prúd vzniknutý elektrochemickou reakciou sa zosilní a zaznamená ako funkcia času, čo na zázname vytvorí pík. Prúd, ktorý je produkovaný pracovnou elektródou nie je čisto prúd tvorený iba redoxnou reakciou látky, o ktorú sa zaujímate, ale aj nechcenými redoxnými reakciami látok pochádzajúcich z mobilnej fázy. To sa na zázname prejaví ako šum. Niektoré typy šumu sa dajú čiastočne eliminovať dôkladnou prípravou mobilnej fázy, správnym výberom materiálu, z ktorého je zhotovená pracovná elektróda, bezchybnou pumpou atď.

Pracovné elektródy

V súčasnosti existuje široká ponuka pracovných elektród. Najčastejšie využívaným materiálom na ich výrobu je uhlík. Pôvodne používaná elektróda z uhlíkovej pasty bola skoro nahradená vhodnejším a stabilnejším skleneným uhlíkom, pyrolitickým uhlíkom a poróznym grafitom. Kovy ako napríklad platina, zlato striebro, nikel, ortuť a rôzne ich zliatiny sa tiež často využívajú ako materiály na výrobu pracovných elektród. Výber vhodnej pracovnej elektródy je závislý na viacerých faktoroch, ktoré zahŕňajú možný aplikovateľný potenciálový rozsah, účasť elektródy na redoxnej reakcii a kinetiku reakcie spojené s prenosom elektrónu. Iné faktory ako kompatibilita so zložením mobilnej fázy sú tiež dôležité. Napríklad elektróda z uhlíkovej pasty nemôže byť použitá s mobilnou fázou, ktorá obsahuje vysoké množstvo organických modifikátorov, pretože by došlo k rozpusteniu elektródy.

Pre fungovanie elektrochemického detektora mobilná fáza musí obsahovať elektrolyt, ktorý umožní tok prúdu. Príliš málo elektrolytu môže zabrániť elektrolýze na pracovnej elektróde a znížiť tak odpoveď detektora. Príliš veľa elektrolytu môže spôsobiť vysoký šum na pozadí, obmedziť citlivosť prípadne aj zničenie pracovnej elektródy (27).

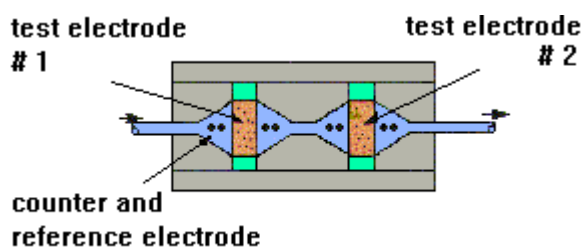
Referenčné elektródy

Úlohou referenčnej elektródy je udržať stabilný potenciál. Slúžia ako porovnávací bod pre meranie alebo nastavovanie potenciálu pracovných elektród. Ich vlastný potenciál je definovaný a podľa možnosti časovo stály (28). Najznámejšou referenčnou elektródou v elektrochémii je štandardná vodíková elektróda, podľa ktorej boli stanovované a neskôr tabelované polvlnové potenciály mnohých látok. Táto elektróda ale pri HPLC s ECD nenašla uplatnenie.

Argentochloridová elektróda je “mokrú” elektróda zložená z kovu uloženého do jeho soli. Je obvykle umiestnená po prúde oproti pracovnej elektróde a tvorí elektrický kontakt s mobilnou fázou cez poróznu zátku vyrobenú z keramiky. Je praktickejšia než štandardná vodíková elektróda, ale vyžaduje vzdialenejšie umiestnenie od pracovnej elektródy. Takéto umiestnenie vedie k zvýšenému šumu, nestabilite aplikovaného potenciálu, a nelineárnym odozvám. Elektróda vyžaduje údržbu, je fotosenzitívna a ľahko ju môžu poškodiť sulfidy prípadne iné anióny. Podobnou elektródou ako argentochloridová je kalomelová elektróda. Má podobnú konštrukciu, vlastnosti, ale pri jej výrobe sa navyše používajú vysoko toxické soli. Obe elektródy musia pracovať v systéme s relatívne nízkymi tlakmi a musia byť umiestnené za kolónou a pracovnou elektródou. Elektródy zostrojované na odstránenie elektroaktívnych interferencií z mobilnej fázy ako napríklad Guard cela ESA 5020 musia vydržať vysoké pracovné tlaky a bežne sú umiestnené pred kolónou.

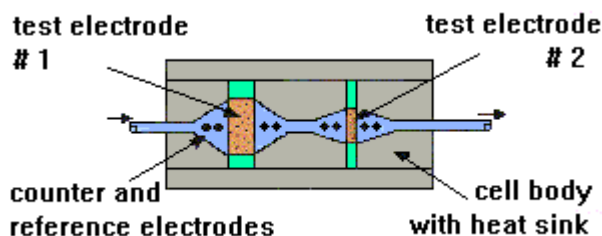
Najpoužívanejšou referenčnou elektródou je hydrogen-paládiová elektróda. Je veľmi malá a môže byť umiestnená v tesnej blízkosti pracovnej a porovnávacej elektródy. Táto referenčná elektróda je používaná vo všetkých typoch ESA analytických senzorov, zahŕňajúc prietokové porózne grafitové coulometrické senzory. Majú jednoduchú údržbu, sú stabilné a schopné pracovať aj pri tlakoch vyšších ako 6000psi. napriek tomu je citlivá na pH. Zmena potenciálu pri zmene pH sa pohybuje okolo 60mV na jednotku pH.

Štandardná analytická cela poskytuje výbornú dlhodobú teplotnú stabilitu a reprodukovateľnosť zo dňa na deň. Schématicky je znázornená na obr. č.6.



Obrázok č.6.: Schéma štandardnej analytickej cely

Vysoko citlivá analytická cely (obr. č.7) je unikátnou kombináciou pre zvýšené potreby prietokovej ampérometrickej elektródy so screeningovým potenciálom coulometrickej elektródy. Poskytuje najvyššiu citlivosť, selektivitu, stabilitu možnú pri elektrochemickej detekcii.



Obrázok č. 7.: Vysokocitlivá analytická cely.

Cely coulochemu sú unikátne pre ich dizajn, ktorý využíva patent firmy ESA porózne prietokové grafitové elektródy. Na obr. č.8 sú zobrazené tri rôzne typy coulochemických detekčných ciel. Tieto nízkoobjemové cely obsahujú dve pracovné elektródy. Na ich obrovskej ploche prebieha kompletná elektrochemická reakcia. Prvá elektróda sa môže použiť na elimináciu prípadných interferujúcich elektroaktívnych látok, druhá na detekciu konkrétnej skúmanej látky.

Elektrochemická selektivita je dosiahnutá oxidáciou alebo redukciou nežiadúcich alebo interferujúcich látok na prvej elektróde. Všetky zlúčeniny s reakčným potenciálom nižším ako látky nášho záujmu sú potom vyradené z reakcií na druhej pracovnej elektróde. Navyše veľa zlúčenín sa ochotne oxiduje a redukuje v sekvencii. Takýto zvrat môže byť využitý k dosiahnutiu vyššej selektivity. Napríklad catecholamíny sú ľahko reverzibilne oxidovateľné. Na prvej elektróde dochádza k oxidácii a na druhej k redukcii.

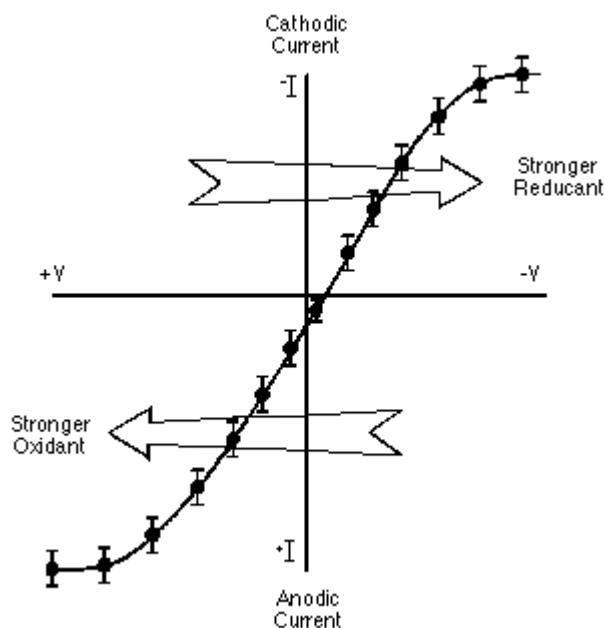


Obrázok č. 8.: Elektrochemické cely

3.5 HYDRODYNAMICKÝ VOLTAMOGRAM

Na úspešné použitie elektrochemického detektora v kvapalinovej chromatografii je nutné poznať potenciál ktorý vyvolá žiadanú reakciu. Tento potenciál je závislý na povrchu elektródy, pH, zložení mobilnej fázy a chemickej štruktúre skúmanej látky.

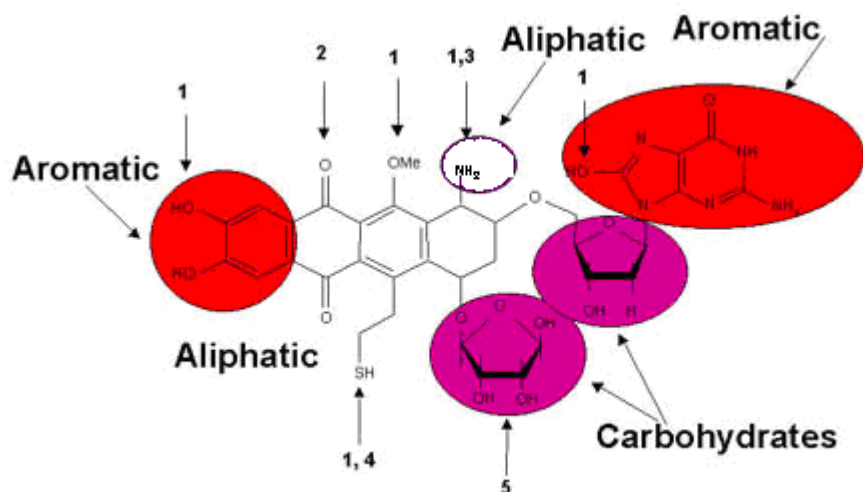
Primeraný potenciál môže byť určený meraním oxidačne-redukčného prúdu analytu (za stálej koncentrácie analytu), ktorý je nad hranicou potenciálu pracovnej elektródy. Záznam vytvoreného prúdu sa nazýva hydrodynamický voltamogram (obr. č.9). Pohľad na krivku udáva potenciál kde oxidačne redukčný prúd je najväčší.



Obrázok č.9.: Graf závislosti prúdu na napatí.

Elektroaktívne zlúčeniny

Elektroaktívne zlúčeniny sú v prírode aromatické látky obsahujúce hydroxylovú skupinu, methoxyskupinu alebo aminoskupinu. Ukážka elektroaktívnych častí molekuly je na obr. č. 10. Alifatické zlúčeniny ako tioly a amíny sú tiež elektroaktívne. Niektoré uhl'ovodíky vyžadujú špeciálne formy detekcie, napríklad pulznú ampérometrickú detekciu (PAD). Medzi takéto látky patria sacharidy a niektoré alkoholy. Takéto látky majú tendenciu znečistiť povrch pracovnej elektródy a preto je stanovenie ampérometrickou detekciou s konštantným potenciálom zložité. V pulznej ampérometrickej detekcii je takzvaný „čistiaci“ potenciál aplikovaný približne raz za sekundu striedavo s detekčným potenciálom. Aplikácia čistiaceho potenciálu však výrazne zvyšuje šum v porovnaní s ampérometrickou detekciou s konštantným potenciálom.



Obrázok č. 10.: Ukážka elektroaktívnych častí molekuly.

- 1) Oxidácia na uhlíkovej elektróde v DC móde (na elektróde je aplikovaný nemenný potenciál)
- 2) Redukcia na uhlíkovej elektróde v DC móde
- 3) Oxidácia na uhlíkovej elektróde po derivatizácii
- 4) Oxidácia na ortuťovej alebo amalgámovej elektróde v DC móde
- 5) Oxidácia na zlatej pracovnej elektróde v PAD móde

Veľa elektroaktívnych zlúčenín môže byť stanovovaných pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie spojenjej s elektrochemickou detekciou. Nasledujúce kategórie ukazujú elektroaktívne zlúčeniny :

- Antioxidanty
- Aminokyseliny
- Herbicídy
- Fenoly
- Hydrochinón
- Chlórované anilíny
- Polychlórované bifenyly a ich metabolity

Neurotoxíny

Neuromediátory

Chlórované naftoly

Vitamíny

4 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

4.1 MATERIÁL A POMÔCKY

4.1.1 CHEMIKÁLIE

Acetonitril - g.g. 99.9% Merck, KGaA, Germany

2-Acetamidofenol - Lachema n.p. Brno

Aceton - Zdravotnické zásobování n.p., Výrobna léčivých přípravků č.1, Praha

Acidum folicum - 99,0, Fluka Chemie GmbH, Buchs

Biotín - Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Dihydrogénfosforečnan draselný - Merck, KGaA, Germany

Ethylparaben - Lachema n.p. Brno

4-hydroxyacetamidofenón - puriss., Fluka AG

Hydrogenfosforečnan draselný - Merck, KGaA, Germany

Kyselina citrónová - 99,0%, Fluka Chemie GmbH, Buchs

Kyselina chlór vodíková – 35% Lachema s.p., Brno, odštěpný závod Neratovice

Kyselina fosforečná - Lachema a.s., Brno

Kyselina mravčia - Lachema a.s., Brno

Kyselina octová - 99,8%, Merck, KGaA, Germany

Lidocain - Zdravotnické zásobování n.p., Výrobna léčivých přípravků č.1, Praha

Metylparaben - Lachema n.p. Brno

Paracetamol - 99,0 Fluka Chemie GmbH, Buchs

Prilocain - Zdravotnické zásobování n.p., Výrobna léčivých přípravků č.1, Praha

Procain - Zdravotnické zásobování n.p., Výrobna léčivých přípravků č.1, Praha

Propylparaben - Lachema n.p. Brno

Sulfacetamid - Sigma chemical co., St. Louis

Vitamín B2 - Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Vitamín B12 - Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Destilovaná voda

4.1.2 ZOSTAVA PRE HPLC

Čerpadlo: LCD 4100, Ecom s.r.o.

Chromatografická kolona: Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μ m), Merck KGaA, Germany

Elektrochemický detektor: Coulochem III

PC program: CSW v. 1.7, Data Apex s.r.o., Praha 5

4.1.3 PRÍSTROJE

Digitálne váhy: A&D HR – 120, Helago s.r.o.

Laboratórna magnetická miešačka: MM2A Laboratorní přístroje Praha

Centrifúga: T51, VEB MLW, Engelsdorf, SRN

Ultrazvuková lázeň: KLN Ultraschall, K10

4.1.3 ĎALŠIE POMÔCKY

delené pipety, nedelené pipety, balónik k pipete

kádinky, Erlenmayerovy banky, odsávacie banky, odmerné banky, odmerné valce, lieviky, fritka, strička, laboratórne lyžička

svorky, držiaky, stojany

mikrostriekačky Hamilton 25 μ l, 100 μ l

skúmavky, centrifugačné skúmavky

4.2 PRÍPRAVA MOBILNÝCH FÁZ

Jedným zo základných cieľov tejto diplomovej práce bolo nájsť optimálne zloženie mobilnej fázy pre dokonalú separáciu biotínu zo stanovovanej vzorky rozdrvených tabliet s obsahom biotínu. Skúšaných bolo šesť druhov mobilných fáz s rozdielnym zložením. Základom každej mobilnej fázy bol štandardný prídavok 15 % acetonitrilu.

Mobilná fáza č. 1:

Do 500 ml odmernej banky bolo navážené 8,71 g K_2HPO_4 a doplnené vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. pH roztoku bolo upravené kyselinou fosforečnou na hodnotu 3,0. Z pripraveného fosfátového pufru pH = 3,0 sa použilo 425 ml a doplnilo 75 ml acetonitrilu na objem 500 ml.

Mobilná fáza č. 2 :

Do 500 ml odmernej banky bolo navážené 4,102 g bezvodého octanu sodného a doplnené vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. pH roztoku bolo upravené kyselinou mravčou na hodnotu 3,0. Z roztoku o pH = 3,0 sa použilo 425 ml a doplnilo 75 ml acetonitrilu na objem 500 ml.

Mobilná fáza č. 3 :

Do 500 ml odmernej banky bolo napipetované 0,091ml (0,049g) 99 % kyseliny fosforečnej a doplnené vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. Z pripraveného roztoku kyseliny fosforečnej s hodnotou pH 3,0 sa použilo 425 ml a doplnilo 75 ml acetonitrilu na objem 500 ml.

Mobilná fáza č. 4 :

Do 500 ml odmernej banky bolo navážené 0,0943g kyseliny citrónovej a doplnené vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. Výsledné pH pripraveného roztoku kyseliny citrónovej bolo rovné 3,0. Z pripraveného roztoku kyseliny citrónovej s hodnotou pH 3,0 sa použilo 425 ml a doplnilo 75 ml acetonitrilu na objem 500 ml.

Mobilná fáza č. 5 :

Do 500 ml odmernej banky bolo napipetované 7ml 98% kyseliny octovej a doplnené vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. Z pripraveného roztoku kyseliny octovej s hodnotou pH 3,0 sa použilo 425 ml a doplnilo 75 ml acetonitrilu na objem 500 ml.

Mobilná fáza č. 6 :

Do 500 ml odmernej banky bolo napipetované 0,0282ml (0,023g) kyseliny mravčej a doplnené vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. Z pripraveného roztoku kyseliny mravčej s hodnotou pH 3,0 sa použilo 425 ml a doplnilo 75 ml acetonitrilu na výsledný objem 500 ml.

4.3 PRÍPRAVA ZÁSOBNÝCH ROZTOKOV VITAMÍNOV A VNÚTORNÝCH ŠTANDARDOV

Zásobný roztok biotínu.

Do 100 ml odmernej banky sa navážilo presne 0,10 mg biotínu a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku.

Zásobný roztok vitamínu B12

Do 100 ml odmernej banky sa navážilo presne 0,10 mg vitamínu B12 a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku.

Zásobný roztok vitamínu B2

Do 10 ml odmernej banky sa navážilo presne 0,10 mg vitamínu B2 a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku.

Zásobný roztok kyseliny listovej.

Do 100 ml odmernej banky sa navážilo 0,10 mg kyseliny listovej a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. Z tohto roztoku bol nedelenou pipetou odobraný 1 ml a v 10 ml odmernej banke doplnený po značku.

Zásobný roztok sulfacetamidu.

Do 100 ml odmernej banky sa navážilo presne 0,10 mg sulfacetamidu a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. Z tohto roztoku bol nedelenou pipetou odobraný 1,0 ml a v 10 ml odmernej banke doplnený po značku.

Zásobný roztok lidokaínu.

Do 100 ml odmernej banky sa navážilo presne 0,10 mg lidokaínu a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. Z tohto roztoku bol nedelenou pipetou odobraný 1 ml a v 10 ml odmernej banke doplnený po značku.

Zásobný roztok prilokaínu.

Do 100 ml odmernej banky sa navážilo presne 0,10 mg prilokaínu a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. Z tohto roztoku bol nedelenou pipetou odobraný 1 ml a v 10 ml odmernej banke doplnený po značku.

Zásobný roztok prokaínu.

Do 100 ml odmernej banky sa navážilo presne 0,10 mg prokaínu a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku. Z tohto roztoku bol nedelenou pipetou odobraný 1 ml a v 10 ml odmernej banke doplnený po značku.

Zásobný roztok metylparabénu.

Do 10 ml odmernej banky sa navážilo presne 1,0 mg metylparabénu a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku.

Zásobný roztok etylparabénu.

Do 10 ml odmernej banky sa navážilo presne 1,0 mg etylparabénu a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku.

Zásobný roztok propylparabénu.

Do 25 ml odmernej banky sa navážilo presne 1,5 mg propylparabénu a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku.

Zásobný roztok paracetamolu.

Do 25 ml odmernej banky sa navážilo presne 1,5 mg paracetamolu a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku.

Zásobný roztok 2-acetamidofenolu.

Do 100 ml odmernej banky sa navážilo presne 1,0 mg 2-acetamidofenolu a doplnilo sa vodou pripravenou reverznou osmózou po značku.

4.4 TVORBA HYDRODYNAMICKÉHO VOLTAMOGRAMU

Ako už bolo spomenuté v kapitole 3.5 hydrodynamický voltamogram je závislosť oxidačne – redukčného prúdu analytu za stálej koncentrácie analytu na potenciálovom napätí vkladanom na pracovnú elektródu. Hydrodynamický voltamogram sa tvorí z toho dôvodu, aby sa zistilo pri akom napätí je odozva detektora pre stanovovaný analyt ideálna.

Pre zistenie optimálneho potenciálu jednotlivých látok bolo nutné zmerať uvedené látky v intervale od 100 – 900 mV. Pre prehľadnosť a úplnosť hydrodynamických voltamogramov bol potenciálový skok medzi jednotlivými meraniami 50mV.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

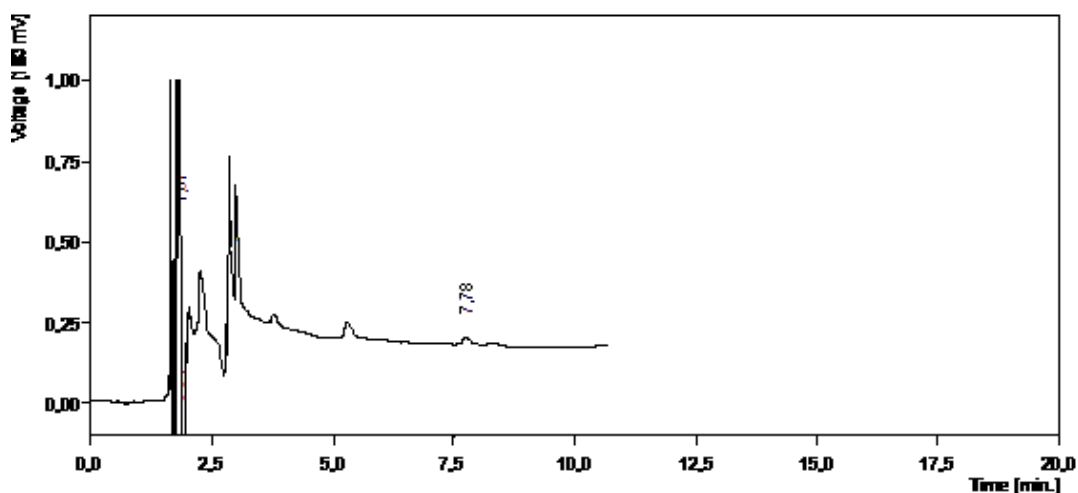
5.1 HĽADANIE OPTIMÁLNEJ MOBILNEJ FÁZY

Cieľom optimalizácie zloženia mobilnej fázy je získať takú zmes, ktorá by umožňovala dokonalú separáciu všetkých látok obsiahnutých vo vzorke. Podľa literárnej rešerše je možné pre hodnotenie biotínu použiť separáciu na reverznej fáze. V prípade použitia systému RP boli najčastejšie používané 0,05 – 0,1 M zmesi fosfátového pufru a acetonitrilu v rôznych pomeroch (10 – 25 % prídavok acetonitrilu).

V tejto práci bolo vyskúšaných 6 mobilných fáz, pH týchto mobilných fáz bolo upravené na hodnotu 3,0, prídavok acetonitrilu bol konštantný – 15 % a menila sa vodná zložka.

Mobilná fáza č . 1.:

Mobilná fáza č. 1 bola tvorená roztokom K_2HPO_4 , ktorého pH bolo upravené na hodnotu 3,0. Citlivosť bola nastavená na 200 nA a napätie vložené na pracovnú elektródu bolo 900 mV. Na obrázku č. 11 je chromatografický záznam vzorky biotínu o koncentrácii 1 $\mu\text{g/ml}$. Ako vidieť na zázname odozva biotínu v retenčnom čase 7,78 s je pomerne malá, z čoho vyplýva, že použitá mobilná fáza nie je vhodná pre stanovenie biotínu.



Obrázok č. 11. : Chromatografický záznam štandardu biotínu

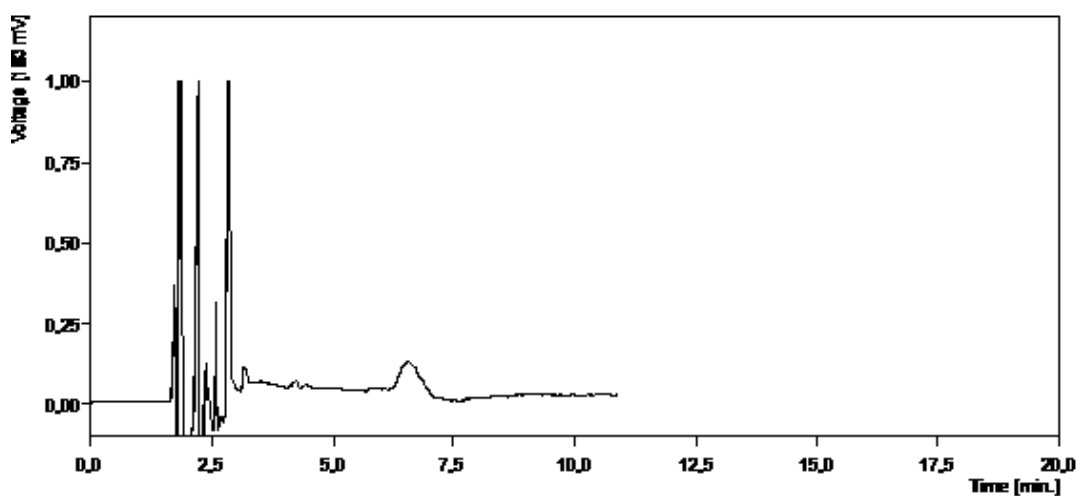
R_t biotínu – 7,78

Kolóna : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μm), Merck KGaA, Germany

Rýchlosť prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min, ampérometrická detekcia

Mobilná fáza č . 2.:

Mobilná fáza č. 2 bola tvorená acetátovým pufrom, ktorého pH bolo upravené na hodnotu 3,0. Citlivosť bola nastavená na 200 nA a napätie vložené na pracovnú elektródu bolo 900 mV. Na obrázku č. 12 je chromatografický záznam vzorky biotínu o koncentrácii 1 µg/ml. Pri použití tejto mobilnej fázy, pík biotínu vôbec nie je viditeľný a je zrejme že je pre našu prácu úplne nevhodná.



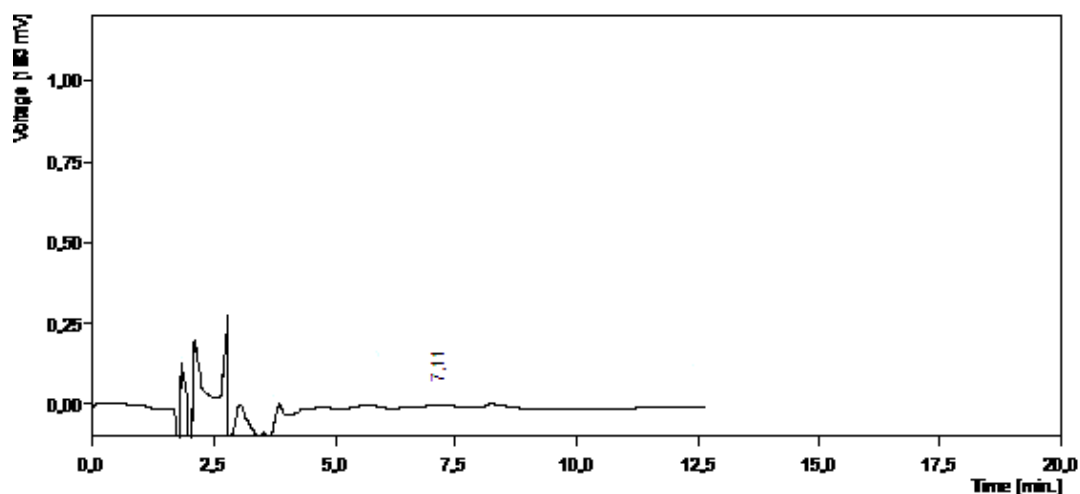
Obrázok č. 12. : Chromatografický záznam štandardu biotínu.

Kolóna : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Germany

Rýchlosť prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min, ampérometrická detekcia

Mobilná fáza č . 3.:

Mobilná fáza č. 3 bola tvorená kyselinou fosforečnou, ktorej pH bolo upravené na hodnotu 3,0. Citlivosť bola nastavená na 200 nA a napätie vložené na pracovnú elektródu bolo 900 mV. Na obrázku č. 13 je chromatografický záznam vzorky biotínu o koncentrácii 1 µg/ml. Tak ako pri mobilnej fáze č. 2 ani tu nie je viditeľný pík biotínu, z čoho vyplýva nevhodnosť tejto mobilnej fázy.



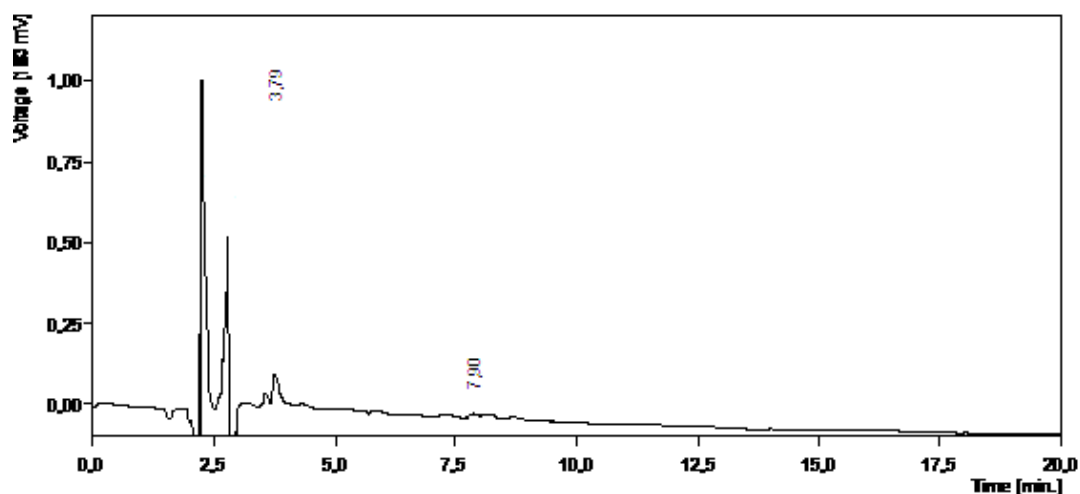
Obrázok č. 13. : Chromatografický záznam štandardu biotínu

Kolóna : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Germany

Rýchlosť prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min, ampérometrická detekcia

Mobilná fáza č . 4.:

Mobilná fáza č. 4 bola tvorená kyselinou citrónovou, ktorej pH bolo upravené na hodnotu 3,0. Citlivosť bola nastavená na 200 nA a napätie vložené na pracovnú elektródu bolo 900 mV. Na obrázku č. 14 je chromatografický záznam vzorky biotínu o koncentrácii 1 µg/ml. Pri použití kyseliny citrónovej je viditeľný slabý pík biotínu v retenčnom čase 7,90 s, ktorý však nie je postačujúci na kvalitné stanovenie biotínu.



Obrázok č. 14. : Chromatografický záznam štandardu biotínu

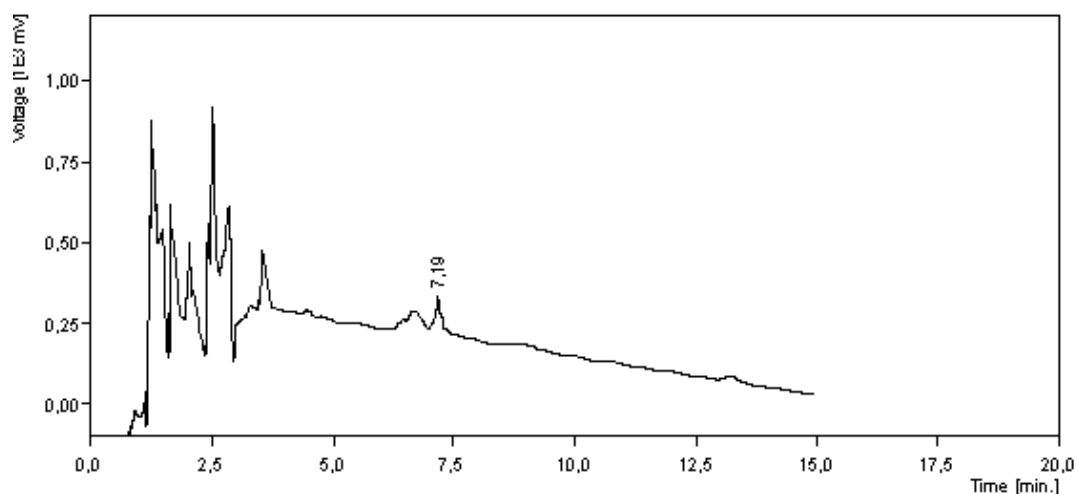
R_t biotínu – 7,90

Kolóna : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Germany

Rýchlosť prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min, ampérometrická detekcia

Mobilná fáza č. 5.:

Mobilná fáza č. 5 bola tvorená kyselinou octovou, ktorej pH bolo upravené na hodnotu 3,0. Citlivosť bola nastavená na 200 nA a napätie vložené na pracovnú elektródu bolo 900 mV. Na obrázku č. 15 je chromatografický záznam vzorky biotínu o koncentrácii 1 µg/ml. V retenčnom čase 7,19 s je vidieť pík biotínu, ktorý je aj napriek nízkej koncentrácii pomerne ostrý a symetrický. Na obrázku č. 16 v retenčnom čase 7,30 s je vidieť pík biotínu o koncentrácii 0,1 mg/ml.

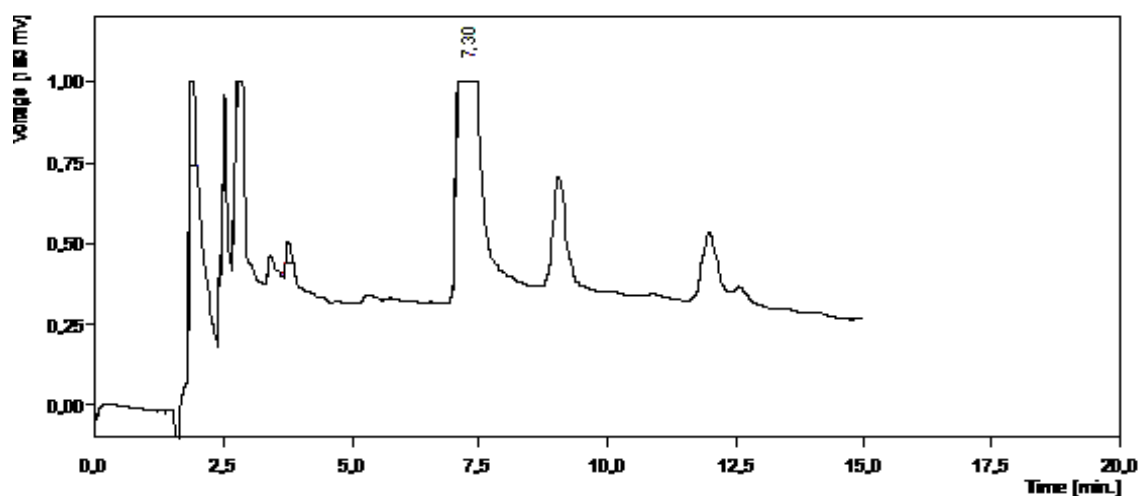


Obrázok č. 15. : Chromatografický záznam štandardu biotínu

R_t biotínu – 7,19

Kolóna : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μ m), Merck KGaA, Germany

Rýchlosť prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min, ampérometrická detekcia



Obrázok č. 16. : Chromatografický záznam štandardu biotínu (0,1 mg/ml)

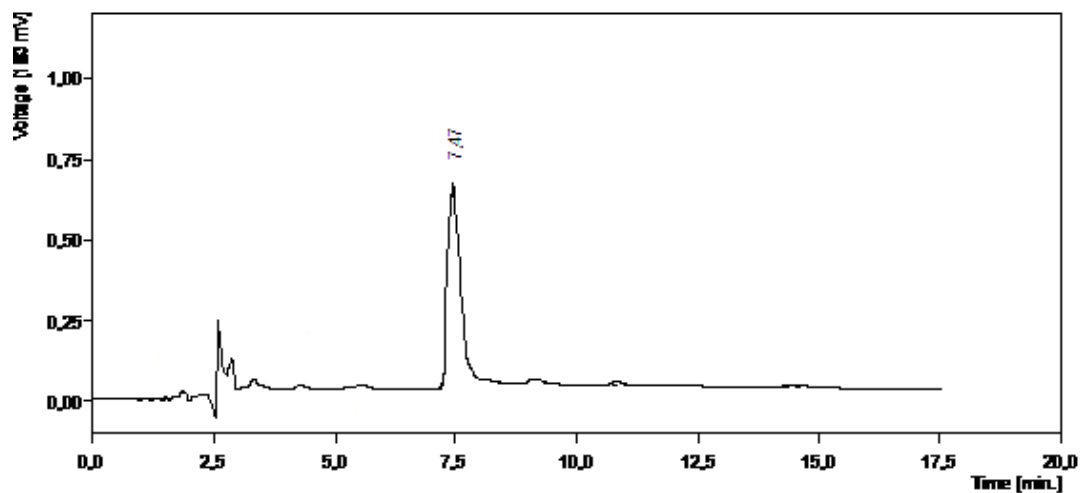
R_t biotínu – 7,30

Kolóna : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μ m), Merck KGaA, Germany

Rýchlosť prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min, ampérometrická detekcia

Na obrázku č. 17 je chromatografický záznam vzorky biotínu o koncentrácii 0,10 mg/ml. V retenčnom čase 7,47 s je vidieť pík biotínu, V tomto prípade boli

chromatografické podmienky zhodné, len citlivosť bola nastavená na 5 μ A. Na obrázku č. 18 v retenčnom čase 9,05 s je vidieť pík prokaínu o koncentrácii 2 μ g/ml. Citlivosť bola nastavená zhodne na 5 μ A a napätie vložené na pracovnú elektródu bolo 900 mV.

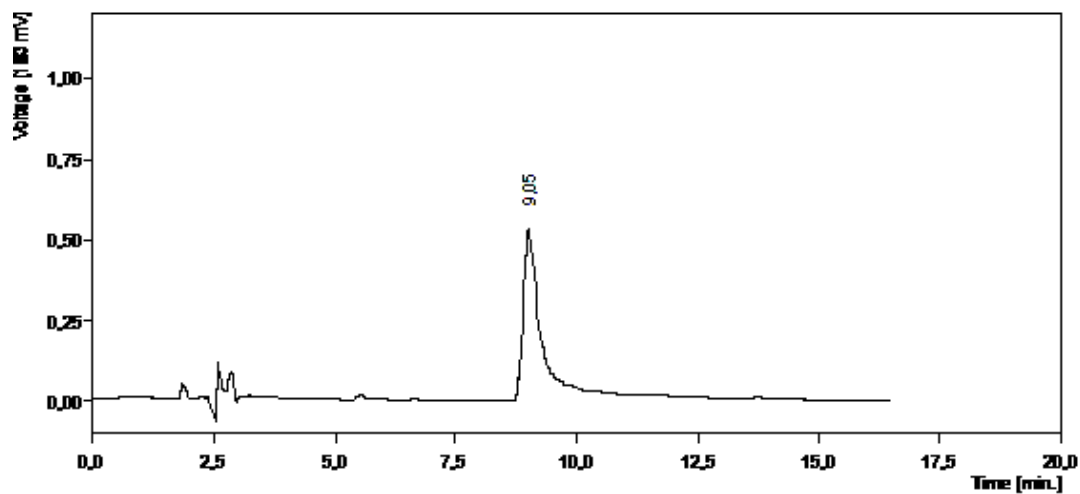


Obrázok č. 17. : Chromatografický záznam štandardu biotínu

R_t biotínu – 7,47

Kolóna : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μ m), Merck KGaA, Germany

Rýchlosť prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min, ampérometrická detekcia



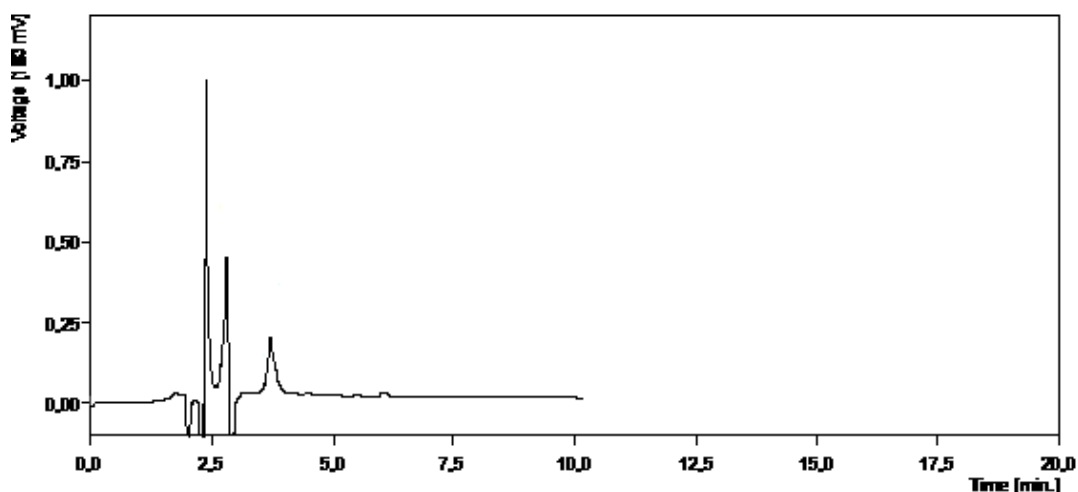
Obrázok č. 18. : Chromatografický záznam štandardu prokaínu

R_t prokaínu – 9,05

Kolóna : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μ m), Merck KGaA, Germany

Mobilná fáza č. 6.:

Mobilná fáza č. 6 bola tvorená kyselinou mravčou, ktorej pH bolo upravené na hodnotu 3,0. Citlivosť bola nastavená na 200 nA a napätie vložené na pracovnú elektródu bolo 900 mV. Na obrázku č. 19 je chromatografický záznam vzorky biotínu o koncentrácii 1 µg/ml. Biotín ako hlavný stanovovaný analyt je na zázname neidentifikovateľný.



Obrázok č. 19. : Chromatografický záznam štandardu biotínu

Kolóna : Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 µm), Merck KGaA, Germany

Rýchlosť prietoku mobilnej fázy 1,0 ml/min, ampérometrická detekcia

Z uvedených chromatografických záznamov je zrejmé, že mobilnú fázu č. 2, 3 a 6 nie je možné použiť na stanovenie biotínu, pretože pík biotínu nie je vôbec viditeľný. Pri použití mobilnej fázy č. 1 a 4 sú píky biotínu slabo viditeľné ale pre kvantitatívne stanovenie sú nepostačujúce. Najvhodnejšia mobilná fáza na stanovenie biotínu sa javí mobilná fáza č. 5 zložená z kyseliny octovej, ktorej pH bolo upravené na hodnotu 3,0 s 15% prídavkom acetonitrilu. Pík biotínu je za daných chromatografických podmienok zreteľne viditeľný v retenčnom čase 7,19 s (koncentrácia 1 µg/ml) a 7,30 s (koncentrácia 0,1 mg/ml).

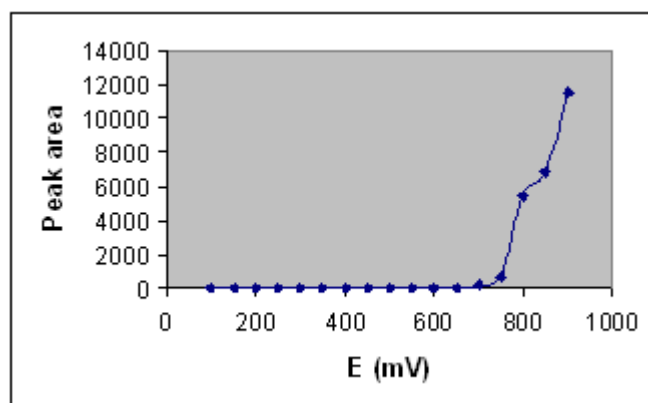
5.2 HYDRODYNAMICKÉ VOLTAMOGRAMY

V práci sú vyhodnocované štyri vo vode rozpustné vitamíny, ktoré by sa mohli nachádzať v multivitamínových tabletách, prípadne potravinárskych premixoch. Okrem týchto vitamínov boli tvorené hydrodynamické voltamogramy aj pre tri látky, ktoré by mohli byť použité ako vnútorné štandardy.

Biotín

H (Biotinum)	
E2 (mV)	Peak Area
100	0
150	0
200	0
250	0
300	0
350	0
400	0
450	0
500	0
550	0
600	0
650	0
700	159,83
750	733,73
800	5493,30
850	6823,86
900	11473,84

Tabuľka č.1.:



Graf č.1.

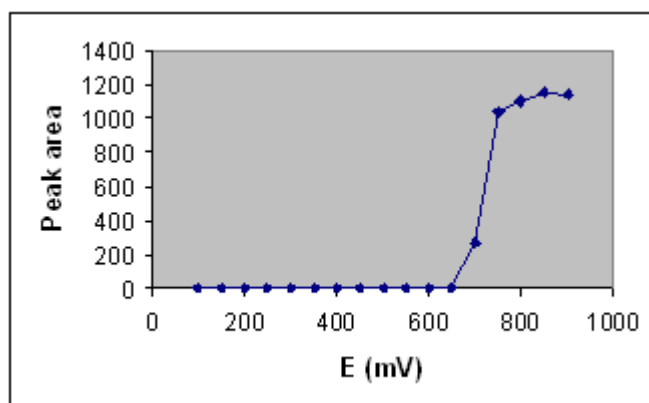
V tabuľke č. 1 sú uvedené hodnoty potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v mV a plochy píku biotínu o koncentrácii 100 μ g/ml. Graf č.1 zobrazuje

hydrodynamický voltamogram biotínu o koncentrácii 100 μ g/ml meraný pri citlivosti 5 μ A v intervale 100 – 900 mV.

Riboflavín

B2 (Riboflavinum)	
E2 (mV)	Peak Area
100	0
150	0
200	0
250	0
300	0
350	0
400	0
450	0
500	0
550	0
600	0
650	0
700	264,42
750	1040,39
800	1106,60
850	1152,40
900	1144,14

Tabuľka č. 2.



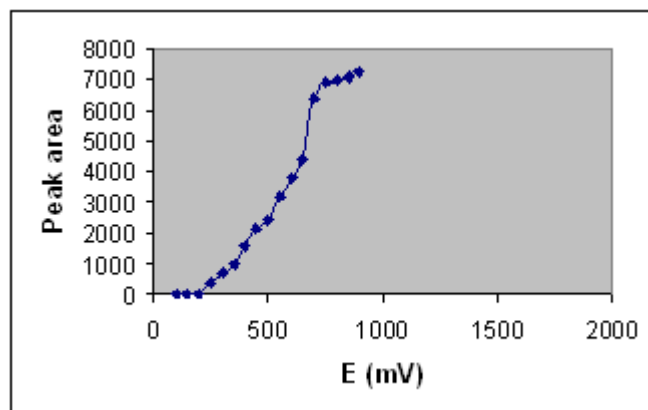
Graf č. 2.

V tabuľke č. 2 sú uvedené hodnoty potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v mV a plochy píku vitamínu B2 (riboflavínu) o koncentrácii 100 μ g/ml. Graf č.2 zobrazuje hydrodynamický voltamogram vitamínu B2 (riboflavínu) o koncentrácii 100 μ g/ml meraný pri citlivosti 5 μ A v intervale 100 – 900 mV.

Kyselina listová

B9 (Acidum folicum)	
E2 (mV)	Peak Area
100	0
150	0
200	0
250	407,91
300	725,30
350	978,80
400	1570,09
450	2118,33
500	2403,37
550	3188,92
600	3785,23
650	4373,59
700	6364,11
750	6916,20
800	6968,80
850	7056,45
900	7227,02

Tabuľka č. 3.



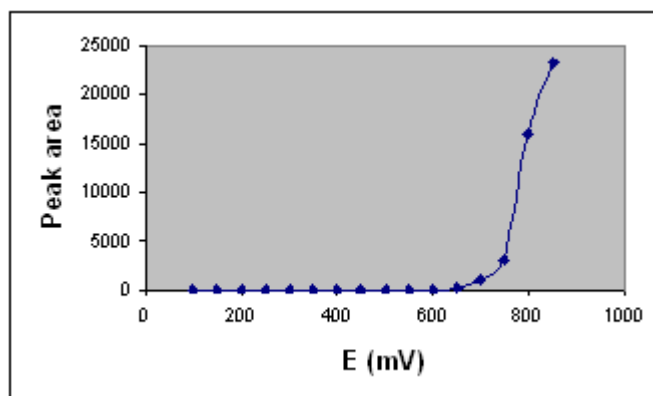
Graf č. 3.

V tabuľke č. 3 sú uvedené hodnoty potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v mV a plochy píku kyseliny listovej (acidum folicum) o koncentrácii 2 $\mu\text{g/ml}$. Graf č.3 zobrazuje hydrodynamický voltamogram kyseliny listovej (acidum folicum) o koncentrácii 2 $\mu\text{g/ml}$ meraný pri citlivosti 5 μA v intervale 100 – 900 mV.

Vitamín B12

B12(Cyanocobalaminum)	
E2 (mV)	Peak Area
100	0
150	0
200	0
250	0
300	0
350	0
400	0
450	0
500	0
550	0
600	0
650	222,77
700	952,96
750	3090,28
800	16119,26
850	23241,15

Tabuľka č. 4.

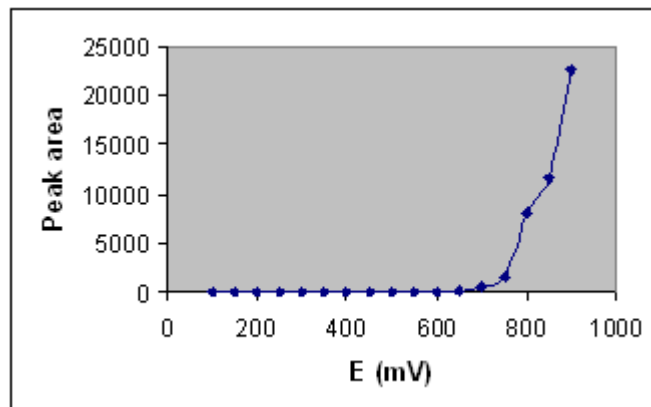


Graf č. 4.

V tabuľke č. 4 sú uvedené hodnoty potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v mV a plochy píku vitamínu B12 (cyanocobalaminum) o koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$. Graf č.4 zobrazuje hydrodynamický voltamogram vitamínu B12 (cyanocobalaminum) o koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$ meraný pri citlivosti 5 μA v intervale 100 – 900 mV.

B12(Cyanocobalaminum)	
E2 (mV)	Peak Area
100	0
150	0
200	0
250	0
300	0
350	0
400	0
450	0
500	0
550	0
600	0
650	111,38
700	476,48
750	1545,14
800	8059,63
850	11620,58
900	22596,15

Tabuľka č. 5.



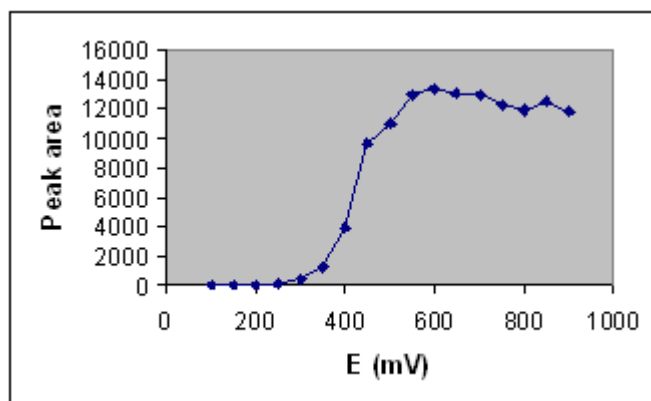
Graf č. 5.

V tabuľke č. 5 sú uvedené hodnoty potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v mV a plochy píku vitamínu B12 (cyanocobalaminum) o koncentrácii 50 $\mu\text{g/ml}$. Graf č.5 zobrazuje hydrodynamický voltamogram vitamínu B12 (cyanocobalaminum) o koncentrácii 50 $\mu\text{g/ml}$ meraný pri citlivosti 5 μA v intervale 100 – 900 mV.

2 - acetamidofenol

2-acetamidofenolum	
E2 (mV)	Peak Area
100	0
150	0
200	0
250	130,08
300	416,16
350	1223,12
400	3913,81
450	9608,29
500	10927,03
550	12917,91
600	13398,63
650	13065,57
700	12919,86
750	12184,25
800	11894,52
850	12461,41
900	11757,87

Tabuľka č. 6.



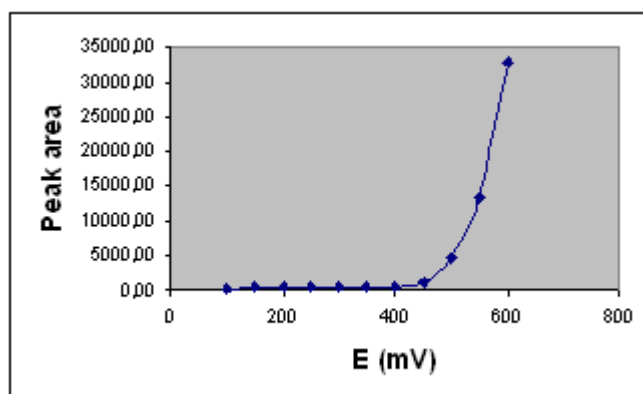
Graf č. 6.

V tabuľke č.6 sú uvedené hodnoty potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v mV a plochy píku 2- acetamidofenolu o koncentrácii 10 $\mu\text{g/ml}$. Graf č.6 zobrazuje hydrodynamický voltamogram 2- acetamidofenolu o koncentrácii 10 $\mu\text{g/ml}$ meraný pri citlivosti 5 μA v intervale 100 – 900 mV.

Prokaín

Procainum	
E2 (mV)	Peak Area
100	358,55
150	379,22
200	393,54
250	423,09
300	517,17
350	528,50
400	557,92
450	1184,18
500	4585,05
550	13369,27
600	32693,45

Tabuľka č. 7.

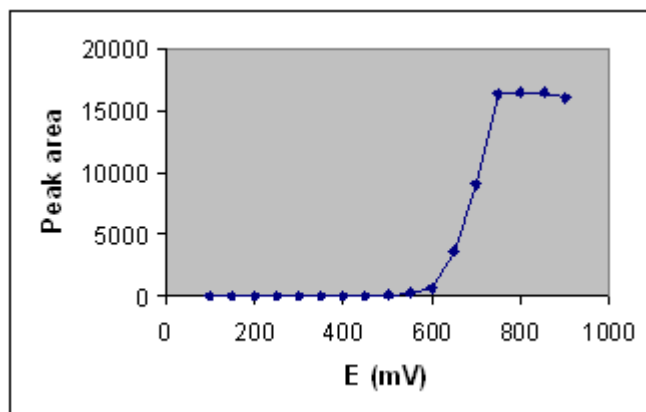


Graf č. 7.

V tabuľke č.7 sú uvedené hodnoty potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v mV a plochy píku prokaínu o koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$. Graf č. 7 zobrazuje hydrodynamický voltamogram prokaínu o koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$ meraný pri citlivosti 5 μA v intervale 100 – 900 mV.

Procainum	
E2 (mV)	Peak Area
100	0
150	0
200	0
250	0
300	0
350	0
400	0
450	0
500	91,70
550	267,39
600	653,87
650	3680,90
700	9081,12
750	16307,92
800	16430,69
850	16445,31
900	16086,41

Tabuľka č. 8.



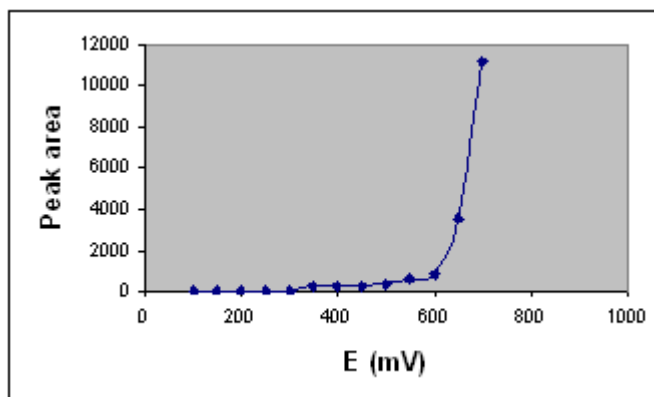
Graf č. 8.

V tabuľke č.8 sú uvedené hodnoty potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v mV a plochy píku prokaínu o koncentrácii 2 $\mu\text{g/ml}$. Graf č. 8 zobrazuje hydrodynamický voltamogram prokaínu o koncentrácii 2 $\mu\text{g/ml}$ meraný pri citlivosti 5 μA v intervale 100 – 900 mV.

Sulfacetamid

Sulfacetamidum	
E2 (mV)	Peak Area
100	0
150	0
200	0
250	0
300	0
350	249,48
400	254,77
450	281,59
500	354,91
550	603,02
600	857,25
650	3559,41
700	11214,91
750	
800	
850	
900	

Tabuľka č. 9.

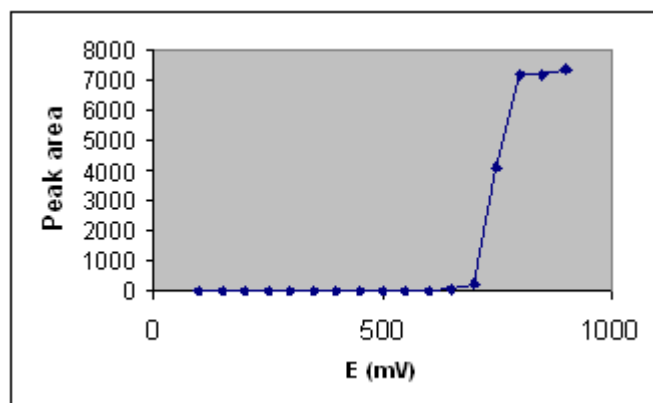


Graf č. 9

V tabuľke č.9 sú uvedené hodnoty potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v mV a plochy píku sulfacetamidu o koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$. Graf č. 9 zobrazuje hydrodynamický voltamogram sulfacetamidu o koncentrácii 100 $\mu\text{g/ml}$ meraný pri citlivosti 5 μA v intervale 100 – 700 mV.

Sulfacetamidum	
E2 (mV)	Peak Area
100	0
150	0
200	0
250	0
300	0
350	0
400	0
450	0
500	0
550	0
600	0
650	71,19
700	224,30
750	4057,29
800	7134,80
850	7155,29
900	7350,00

Tabuľka č. 10.



Graf č. 10.

V tabuľke č.10 sú uvedené hodnoty potenciálu vkladaneho na pracovnú elektródu v mV a plochy píku sulfacetamidu o koncentrácii 2 $\mu\text{g/ml}$. Graf č.10 zobrazuje hydrodynamický voltamogram sulfacetamidu o koncentrácii 2 $\mu\text{g/ml}$ meraný pri citlivosti 5 μA v intervale 100 – 900 mV.

5.3 HĽADANIE VNÚTORNÉHO ŠTANDARDU

Hľadanie vnútorného štandardu bolo zamerané na nájdenie takej látky ktorá by neprekryvala pík najdôležitejšej zo stanovovaných látok – biotínu. Vyskúšaných bolo desať látok, z ktorých sa najvhodnejšie zdali sulfacetamid s retenčným časom 5,57 s a prokaín s retenčným časom 9,04 s. Retenčný čas biotínu bol v priemere 7,51 s. Vzhľadom na stanovovanie ďalších vitamínov však sulfacetamid nie je vhodný, pretože jeho retenčný čas sa kryje s vitamínom B12 (priemerný retenčný čas 5.33 s) a vitamínom B2 (priemerný retenčný čas 6,04 s). Ostatné vnútorné štandardy aj napriek súmerným píkom nemôžu byť použité pre podobnosť retenčných časov s biotínom, prípadne pre príliš dlhé retenčné časy, ktoré by zbytočne predlžovali analýzu.

Názov látky	koncentrácia	Retenčný čas
Sulfacetamid	2 µg/ml	5,57
Lidocain	0,1µg/ml	18,9
Procain	2 µg/ml	9,04
Prilocain	0,1 µg/ml	13,60
Methylparabén	0,1 mg/ml	7,80
Ethylparabén	40 µg/ml	7,54
Propylparabén	60 µg/ml	7,57
2 - acetamidofenol	10 µg/ml	8,20
4 - hydroxyacetophenón	60 µg/ml	8,19
Paracetamol	6 µg/ml	4,42

6 ZÁVER

1. Boli spracované literárne údaje týkajúce sa stanovenia biotínu a vo vode rozpustných vitamínov pomocou HPLC.
2. Bola vybraná mobilná fáza na stanovenie biotínu. Najvhodnejšou sa javila mobilná fáza č. 5, tvorená kyselinou octovou o koncentrácii $c = 0,2410 \text{ mol/l}$, ktorej pH bolo upravené na hodnotu 3,0. Z pripraveného roztoku kyseliny octovej sa použilo 425 ml a doplnilo 75 ml acetonitrilu na objem 500 ml.

Chromatografické podmienky:

Chromatografická kolona: Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μm), Merck KGaA, Germany

Teplota : 30°C

Prietok : 1,0 ml/min

Napätie prac. elektrody : 900 mV

Citlivosť : 200 nA

Elektrochemický detektor: Coulochem III

PC program: CSW v. 1.7, Data Apex s.r.o., Praha 5

3. Bol vybraný vnútorný štandard. Jedná sa o prokaín, ktorý za stanovených chromatografických podmienok nenaruša elúciu biotínu a poskytuje pík dobre separovaný od analyzovanej látky, ktorý neinterferuje s prípadnými ďalšími separovanými vitamínmi.
4. Boli vytvorené hydrodynamické voltamogramy týchto látok:
 - biotín
 - kyselina folová
 - vitamín B2
 - vitamín B12
 - sulfacetamid
 - prokaín
 - 2-acetamidofenol

Z uvedených hydrodynamických voltamogramov vyplýva najvhodnejšie napätie na stanovenie biotínu je 900 mV

7 SÚHRN

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia je v súčasnosti cennou analytickou metódou často využívanou vo farmácii.

Biotín je vo vode rozpustný vitamín, ktorý je dôležitou zložkou mnohých enzýmov, látok potrebných pri trávení a látkovej výmene. Podieľa sa taktiež na látkovej výmene cukrov, tukov a bielkovín. Nachádza sa v rôznych druhoch potravy, najmä v pečeni, arašidovom masle, vaječnom žĺtku, mrkve, hrachu, sóji, pšeničných klíčkoch a ovsených vločkách.

Táto práca sa zaoberá optimalizáciou chromatografických podmienok na stanovenie biotínu. Jej cieľom je nájsť vhodnú mobilnú fázu, pri ktorej dochádza k najlepšej separácii biotínu od ostatných zložiek roztoku, nájsť vhodný vnútorný štandard a zostaviť hydrodynamické voltamogramy jednotlivých vo vode rozpustných vitamínov.

Na stanovenie bol použitý coulometrický detektor Coulochem III. Analýza prebiehala na kolóne Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm i.d., 5 μ m), od firmy Merck. Mobilná fáza na stanovenie biotínu bola v zložení kyselina octová : acetonitril (CH_3COOH 0,2410 mol/l; pH 3,0) 85: 15. Prietoková rýchlosť bola nastavená na 1ml/min, pri teplote 30°C. Vložené napätie na pracovné elektródu bolo 900 mV, pri citlivosti 200 nA.

8 SUMMARY

High performance liquid chromatography is valued analytical method, which is one of the most frequently used in pharmacy.

Biotine is at water soluble vitamin, which is an important element of various enzyme, stuff necessary in metabolism. It part take on metabolism of sugar, fat and protein. It occur in several sort of food, especially in roast, peanut butter, egg yolk, carrot, peas, soya, wheat gemmule and oaten flake.

This work deals with optimalization chromatographic condition on determination of biotine. Its target is to find optimal mobile phase, near which give out best separation biotine from others element in solution, to find internal standard and form hydrodynamic voltamograms, individual at water soluble vitamin.

For determination was used coulometric detector Coulochem III. Analysis overshoot on column Lichrospher 60, RP – select B (240 x 4,0 mm and.d., 5 μm), Merck. Mobile phase was composed of acetic acid : acetonitrile (CH₃COOH 0,2410 mol/l; pH 3,0) 85: 15. Flow rate was 1ml/min, in temperature 30°C. Current inserted on working electrode was 900 mV, sensitiveness 200mV.

9 POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] Karlíček R. et al.: Analytická chemie pro farmaceuty, Praha, Karolinum, 1998
- [2] Wardlow G.M., Insel P.M.: The water soluble vitamins, St. Louis, 1995, 437-479
- [3] Shils M.E., Olson J.A., Shike M.: Modern Nutrition in Health and Disease, Philadelphia, Lea & Febiger, 1988, 426–431
- [4] Shils M.E., Young V.R.: Modern nutrition in health and disease, Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1988, 436-439
- [5] Burtis C.A., Ashwood E.R.: Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, WB Saunders, 1994, 1275-1316
- [6] Uherová R.: Čo vieme o vitamínoch dnes, Bratislava, Malé Centrum, 2002
- [7] Aboul-Enein Hassan Y., Hussein Rajaa F., Radwan Mahasen A., Al-Rawithi Sameer: Journal of Chromatography B 718, 1998, 211-224
- [8] Zhi Chen, Bo Chen and Shouzhuo Yao : Analytica chimica acta, 2006, 569
- [9] Ekpe, A.E., Hazen, C.: Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Vol. 16, No. 8, 1998, 1311-1315
- [10] Holler U., Wachter F., Wehrli C., Fizez C.: Journal of chromatography. B. 2001
- [11] Friedrich W.: Handbuch der Vitamine, Munich, Urban & Schwarzenberg, 1987
- [12] Bayer E.A. and Wilchek M.: Methods Biochem. Anal., 26, 1980, 145
- [13] Gebauer C.R. and Rechnitz G.A.: Anal. Biochem., 103, 1980, 280 – 284
- [14] Serna A., Vera J. and Marin D.: J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem., 103, 1973, 156 – 158

- [15] Gröningsson K. and Jansson L.: J. Pharm. Sci., 68, 1979, 364 – 366
- [16] Desbene P.L., Coustal S. and Frappier F.: Anal. Biochem., 128, 1983, 359 – 362
- [17] Röder E., Engelbert U. and Troschiitz J., Fresenius Z.: Anal. Chem., 319, 1984, 426 – 427
- [18] Meyers R.A.: Encyklopedia of molecular biology and molecular medicine, Weinheim , 1996, 396-406
- [19] Silbernagl S., Lang F.: Atlas patofyziologie člověka, Praha, Grada Publishing, 2001
- [20] Cannarin I., Deacon R., Lumb M., Perry J.: Blood rev., 1989, 211 - 215
- [21] Shane B., Stokstad B.L.: Annu Rev. Nutr. 5, 2001, 115 -141.
- [22] Bottiglieri T.: Nutr. Rev. 54, 1996, 382–390
- [23] Parnetti L., Bottiglieri T. and Lowenthal D.: Role of homocysteine in age-related vascular and non-vascular diseases, Milano, 1997, 241–257
- [24] Martin M., Guichon G.: J. F. K. Huber : Instrumentation for High Performance Liquid Chromatography, Elsevier, 1978
- [25] Šaršunová M., Hanč O., et. al.: Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia vo farmácii a biochémií, Bratislava, Osveta, 1985
- [26] Parvez H., Bastart-Malsot M., Parvez S., Nagatsu T. and Carpentier G.: Electrochemical Detection in Medicine and Chemistry, Progress in HPLC-HPCE, 1999

[27] Acworth, I.N., and Gamache, P.H. : The coulometric electrode array: for use in HPLC analysis. Part 1. Theory. American Lab., 1996

[28] Skládal P. : Biosenzory, Brno, 2002