

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A
KONTROLY LÉČIV**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Analytické hodnocení léčiv s využitím chromatografických
metod VI.

Analytical evaluation of drugs using chromatographic
methods VI.

Hradec Králové 2010

Kristýna Boudová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV-2010-261-001.

Tímto bych ráda poděkovala RNDr. Milanu Mokrému, CSc. za jeho odborné vedení a vstřícnost během celé mé diplomové práce. Ráda bych ještě poděkovala celé své rodině a svému příteli za jejich podporu během celého mého studia na farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	Historie chromatografie.....	7
2.2	Princip chromatografie.....	7
2.3	Rozdělení chromatografických metod.....	8
2.3.1	Plynová chromatografie (GC)	9
2.3.2	Kapalinová chromatografie (LC)	9
2.3.3	Rozdělovací chromatografie	10
2.3.4	Adsorpční chromatografie	11
2.3.5	Iontově-výměnná chromatografie	12
2.3.6	Gelová chromatografie	12
2.3.7	Afinní chromatografie.....	13
2.3.8	Frontální chromatografie	14
2.3.9	Vytěšňovací chromatografie	14
2.3.10	Eluční chromatografie	14
2.4	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	15
2.4.1	Základní části chromatografu.....	16
2.4.2	Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocování chromatografických křivek	21
2.4.3	Teorie HPLC.....	22
2.5	Vitamíny.....	24
2.5.1	Vitamin B ₁ (Thiamin)	25
2.5.2	Vitamin B ₃ (PP- protipelagrový vit., Nikotinamid).....	26
2.5.3	Vitamin B ₆ (Pyridoxin).....	27
2.5.4	Vitamin C (Kys. askorbová).....	28
2.6	Rešerše	29
3	CÍL PRÁCE.....	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	Materiál a pomůcky	34
4.2	Vývoj chromatografických podmínek.....	35
4.3	Příprava roztoků	39
4.3.1	Příprava roztoků pro vývoj metody.....	39
4.3.2	Příprava roztoků pro vytvoření kalibrační přímky	39
4.3.3	Příprava roztoku multivitaminu	40
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
5.1	Optimální chromatografické podmínky pro HPLC analýzu	41
5.2	Kalibrační přímky jednotlivých vitamínů.....	42
5.2.1	Kalibrační přímka pro thiamin:	42
5.2.2	Ověření kalibrační přímky pro thiamin	43
5.2.3	Kalibrační přímka nikotinamidu:	43
5.2.4	Ověření kalibrační přímky nikotinamidu	44
5.2.5	Kalibrační přímka pyridoxinu:	45
5.2.6	Ověření kalibrační přímky pyridoxinu	45
5.2.7	Kalibrační přímka kys. askorbové:	46
5.2.8	Ověření kalibrační přímky kys. askorbové.....	47
5.2.9	Příklad chromatogramu standardů vitamínů.....	48
5.3	Výsledky HPLC analýzy multivitaminu.....	48
5.3.1	Tabulka výsledků jednotlivých měření multivitaminu.....	48
5.3.2	Výpočet koncentrace vitamínů v analyzovaném preparátu	49

6	<i>ZÁVĚR</i>	51
7	<i>SOUHRN</i>	52
8	<i>SUMMARY</i>	53
9	<i>LITERATURA</i>	54

1 ÚVOD

V současné době je vyvíjena velká snaha získat jednoduchou, rychlou a spolehlivou metodiku pro analýzu řady komerčních vitamínových preparátů. Vitamíny jsou organické látky esenciální pro lidský organismus. Lidský metabolismus není schopen vitamíny syntetizovat, proto je nutné je získávat z potravy. Možná je i suplementace pomocí vitamínových doplňků stravy.

Jedna z perspektivních metod pro komplexní a efektivní analýzu vitamínových preparátů je vysokoúčinná kapalinová chromatografie – High Performance Liquid Chromatography (HPLC). HPLC je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metodik, která nachází široké uplatnění ve všech oblastech analýzy léčiv.

Mezi její hlavní přednosti patří zejména to, že umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní hodnocení separovaných složek analyzované směsi. Dále je to její rychlost a citlivost, minimální potřeba vzorku, možnost automatizace. Oproti plynové chromatografii nabízí mnohem širší množství analyzovatelných látek díky faktu, že většina léků není těkavá, ale zato rozpustná ve vhodném rozpouštědle.

Využití HPLC je velmi široké a vhodně doplňuje plynovou chromatografii. Umožňuje analyzovat od anorganických iontů až po polymerní sloučeniny. Proto je to vhodná analytická metoda nejen pro vitamíny, ale i pro steroidy, cukry, pesticidy, barviva apod.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Historie chromatografie

Název chromatografie je spojen se jménem ruského botanika a chemika M. S. Cvěta (1872-1919), který jako první rozdělil listová barviva na skleněné koloně naplněné uhlíčitánem vápenatým. Zjistil, že barviva postupují kolonou nestejnou rychlostí a lze je čistým rozpouštědlem postupně z kolony vymýt. Tento proces nazval chromatografií, i když věděl, že podobně se budou dělit i látky bezbarvé. Je proto považován za zakladatele chromatografických metod, neboť jeho poznatky se staly základem pro všechny typy sloupcových chromatografických technik.

V padesátých letech poklesl zájem o kolonovou chromatografii v souvislosti s rozvojem papírové a tenkovrstvé chromatografie. Doba od konce sedmdesátých let je však ve znamení velkého rozmachu kolonových chromatografických metod, zejména plynové a kapalinové.

Rozvoj kolonové chromatografie souvisí bezprostředně s rozvojem přístrojové techniky, která umožnila, že původní separační metoda se stala i jednou z nejvýznamnějších analytických metod. Dovoluje separaci i stanovování řady anorganických, především však organických látek v nejrůznějších přírodních i technických směsích v širokém rozpětí koncentrací (od desítek do stotisícin procent) a molekulových hmotností (od 100 do několika desítek až stovek tisíc)¹.

2.2 Princip chromatografie

Chromatografie je dělicí metoda, při níž se distribuují složky mezi nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní) fází. Stacionární fází může být látka pevná nebo kapalina, mobilní fází kapalina nebo plyn. Dělení směsi se dosáhne tím, že její jednotlivé složky se pohybují chromatografickým ložem (médiem) různou rychlostí, která závisí na distribuční konstantě příslušné složky v použité soustavě stacionární a mobilní fáze. Složka, jejíž distribuční konstanta je velká, se bude přednostně vyskytovat ve stacionární fází a bude se tedy pohybovat chromatografickým ložem pomaleji než složka, jejíž distribuční konstanta je malá a jež se tedy vyskytuje ve fází mobilní².

Při chromatografických metodách se mnohonásobně ustavuje rovnováha součástí analyzované směsi mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Mobilní fáze vymývá (eluuje) jednotlivé součásti směsi, které jsou zadržovány fází stacionární. K separaci tedy dochází na základě různé afinity dělených látek ke stacionární a mobilní fázi. Stacionární fáze bývá označována také jako sorbent.

Hybnou silou v chromatografickém systému je tok mobilní fáze, která unáší ionty nebo molekuly. Při chromatografickém procesu se ustavuje dynamická rovnováha mezi vratnou sorpcí na stacionární fázi a desorpcí do mobilní fáze^{3,4}.

2.3 Rozdělení chromatografických metod

Chromatografických metod je velké množství. Proto je účelné jejich rozdělení do určitých skupin. Vzhledem ke značné různorodosti se dělí podle několika hledisek:

- **Podle skupenství mobilní fáze**
 - Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography - LC) – mobilní fází je kapalina
 - Plynová chromatografie (Gas Chromatography - GC) - mobilní fází je plyn

- **Podle uspořádání stacionární fáze**
 - Kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici
 - Plošné techniky:
 - Papírová chromatografie (Paper Chromatography - PC) stacionární fáze je součástí chromatografického papíru – dnes je tato metoda již překonaná
 - Tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography – TLC) stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné nebo hliníkové folii).

- **Podle povahy děje, který převládá při separaci**
 - Rozdělovací chromatografie
 - Adsorpční chromatografie
 - Iontově-výměnná chromatografie

- Gelová chromatografie
- Afinitní chromatografie⁵
- **Podle pracovní techniky**
 - Frontální chromatografie
 - Vytěšňovací chromatografie
 - Eluční chromatografie⁶

2.3.1 Plynová chromatografie (GC)

Při plynové chromatografii je mobilní fáze plynná a také separované složky jsou v plynném stavu. Proto při chromatografii kapalných vzorků je nutné volit teplotu, při které jsou molekuly vzorku ve formě par. Nevýhodou je, že některé látky se za vyšších teplot (za kterých by byly plynné) rozkládají.

Jako všechny chromatografie je i plynová metodou separační, při níž se analyzovaná látka rozděluje mezi dvě heterogenní fáze. Mobilní fáze je vždy plyn. Stacionární fáze může být kapalina zakotvená na nosiči (GLC - Gas-Liquid Chromatography) - toto uspořádání je nejčastější. Nebo je stacionární fáze tuhá (GSC – Gas-Solid Chromatography). Stacionární fáze v obou případech působí selektivně na jednotlivé separované látky a na základě vzájemných interakcí dochází k rozdělení (retenci, zadržování) jednotlivých látek v koloně, a tudíž i jejich rozdílné eluci. Rozdělené složky jsou unášeny nosným plynem z kolony a jejich množství je zaznamenáno detektorem jako funkce času nebo objemu proteklého nosného plynu. Nosný plyn se volí podle detekčního systému, musí být vždy inertní k chromatografické náplni a k analyzovanému vzorku, bez obsahu vody nebo kyslíku. Nejčastěji se používá dusík, argon, vodík nebo helium^{7,8}.

2.3.2 Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinová kolonová chromatografie umožňuje dělení všech organických netěkavých kapalných i tuhých látek, které jsou rozpustné v běžných organických rozpouštědlech a vodě nebo ve zředěných minerálních kyselinách. Kapalinová chromatografie zahrnuje všechny chromatografické způsoby separace, kdy je mobilní fáze kapalná. Podle experimentálního uspořádání mluvíme o kapalinové chromatografii v uzavřeném systému (to představuje klasickou sloupcovou a dnes vysokoúčinnou

kolonovou chromatografií - viz dále) a v otevřeném systému při tzv. plošném uspořádání (papírová a tenkovrstvá chromatografie).

Hlavní výhodou kapalinové chromatografie je to, že k dělení látek je možno využít všechny vratné dvoufázové separační mechanismy – jaké jsou uvedeny v kapitole 2.3.. Tato široká škála mechanismů poskytuje možnost nalézt dostatečně selektivní a účinný chromatografický systém, jímž je možno dosáhnout i potřebného rozlišení⁷.

2.3.2.1 Papírová chromatografie (PC)

Při této metodě dochází k dělení látek při průtoku rozpouštědla chromatografickým papírem. Dnes je tato metoda již překonaná.

2.3.2.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Neliší se příliš od papírové chromatografie. K chromatografickému procesu zde dochází při průtoku mobilní fáze tenkou vrstvou jemnozrnného sorbentu nebo nosiče zakotvené fáze, který je rozprostřen a buď volně uložen (nasypán), nebo fixován na vhodné podložce. Podložkou je buď skleněná deska, nebo hliníková folie, popř. plastová folie. Tenké vrstvy se buď připravují v laboratoři, nebo se užívají komerčně vyráběné desky.

Pro každou látku je na chromatogramu specifická poloha, vyjádřená hodnotou R_f (retenční faktor). Je to poměr vzdálenosti středu skvrny a vzdálenosti čela rozpouštědla od startu⁹.

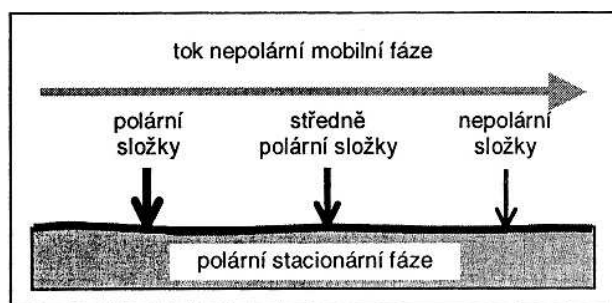
Jako pevné fáze se používá zejména silikagel, oxid hlinitý, křemičitan hlinitý, polyamidy, celulóza a její deriváty, měniče iontů i materiály pro gelovou chromatografii a další¹⁰.

2.3.3 Rozdělovací chromatografie

Podstatou separace je rozdílná rozpustnost složek analyzované směsi ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách. Při rozdělovací chromatografii se zpravidla užívá dvoufázový systém, přičemž jedna fáze bývá bohatší na organická rozpouštědla a druhá na vodu. Zakotvena bývá fáze vodná, a to na pevných hydrofilních nosičích, jako je silikagel, křemelina, škrob, hydrofilní gely, prášková celulóza nebo filtrační papír. Fáze organická bývá zpravidla mobilní. V některých speciálních případech je však výhodnější nasycit hydrofobně impregnovaný nosič organickou fází a fází vodnou volit jako mobilní.

Tímto uspořádáním s tzv. obrácenými fázemi (reversed phase) se v určitých případech dosahuje lepšího dělení.

Rozdělovací chromatografii je možné uskutečnit také mezi plynnou a netěkavou kapalnou fází, je-li kapalná zakotvena na vhodném nosiči. Opět se využívá rozdílné rozpustnosti dělených složek v kapalně fázi. Složky méně rozpustné nebo těkavější (za dané teploty) jsou více unášeny nosným plynem, a tak dochází k jejich dělení^{4,6}.



Obr. č. 1: Schéma interakcí v normálních fázích⁵

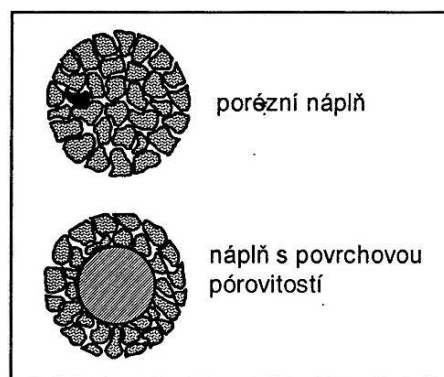


Obr. č. 2: Schéma interakcí na obrácených fázích⁵

2.3.4 Adsorpční chromatografie

Podstatou adsorpční chromatografie je distribuce mezi stacionární a mobilní fází díky rozdílné adsorpční afinitě jednotlivých složek analyzované směsi⁶. Adsorpční chromatografie je jak plynová (v mezifázi plyn – tuhá látka, GSC), tak i kapalinová (v mezifázi kapalina – tuhá látka, LSC). Jejich význam mezi ostatními chromatografickými metodami stále roste, a to díky vývoji adsorbentů s dostatečně homogenním povrchem (chemicky i geometricky) pro plynovou i kapalinovou chromatografii, dále vývojem přístrojové techniky zejména vysoce citlivých detektorů a kapalinových chromatografů s vysokým tlakem na vstup do kolony pro metodu HPLC¹¹.

Jako adsorbenty musí být použity látky splňující několik základních požadavků. Vedle nerozpustnosti a chemické inertnosti k elučním systémům i chromatografované látce, mají mít velkou adsorpční kapacitu při zachování reverzní adsorpce, a další. Nejčastěji používané adsorbenty jsou látky pórovité struktury. Podle toho, zda jsou určeny pro konvenční gravitační chromatografii, nebo pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), mají rozdílné zrnění či stavbu částic¹². To jsou například: silikagel, oxid

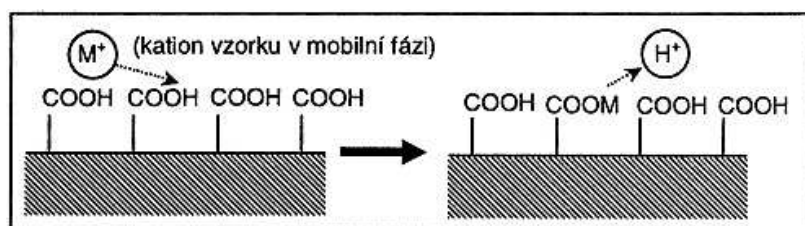


Obr. č. 3: Částice adsorbentů pro kolonovou chromatografii⁵

hlinitý, křemičitan hořečnatý (Florisol), oxid hořečnatý, různé modifikované adsorbenty připravené impregnací silikagelu nebo jiných adsorbentů činidly, která tvoří komplexy s dělenými látkami, hydroxyapatit a aktivní uhlí (jeho využití je minimální) nebo speciální „umělé“ materiály s porézní vrstvičkou adsorbentu¹³.

2.3.5 Iontově-výměnná chromatografie

Tato chromatografie může být realizována pouze jako kapalinová. Stacionární fází jsou iontoměniče (katexy nebo anexy)⁴. Podstatou děje je skutečnost, že pokud složky vytvářejí v roztoku ionty, dochází k elektrostatickým interakcím iontů s ionogenními funkčními skupinami měniče, což je doprovázeno výměnou iontů. Ionty dosud vázané na měnič se vyměňují tím snadněji za souhlasně nabitě vstupující iontové formy složek směsi, čím větší náboj tyto složky mají. Velikost průměrného náboje je dána mocenstvím iontů a velikostí disociační konstanty ionogenní skupiny iontů, která závisí na pH prostředí. Tyto hodnoty jsou u jednotlivých složek směsi rozdílné. Složky lišící se od sebe mocenstvím iontů nebo velikostí iontů nebo disociační konstantou budou jevit rozdílnou afinitu k zrnkům iontoměniče⁶.



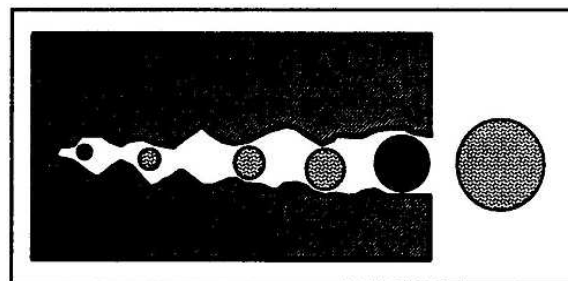
Obr. č. 4: Výměna iontu na povrchu iontoměniče⁵

2.3.6 Gelová chromatografie

Gelovou chromatografií zvanou též gelovou permeační, dělíme složky obsažené ve směsi na základě různých velikostí a tvaru molekul. Jde o kapalinovou chromatografii, kde se rozpouštěná látka distribuuje mezi volné rozpouštědlo protékající mezi částicemi gelu (mobilní fáze) a rozpouštědlo uzavřené v pórech gelových částic (stacionární fáze)¹³. Při průchodu směsi touto soustavou se jednotlivé složky snaží difundovat z roztoku do pórů pevného nosiče. Vhodně zvolená velikost pórů může zabraňovat úplně difuzi velkých molekul a naopak umožnit difuzi a permeaci malých molekul. Středně velké molekuly proniknou do pórů zčásti, většinou však zůstávají v pohyblivé mobilní fázi. Jako první opouští kolonu složka s největšími molekulami, které nemohly do gelu

proniknout. Opožděně procházejí molekuly středně velké a nakonec molekuly malé, které během průchodu kolonou mohly bez zábran difundovat do pórů a tím se značně zdržet¹.

Gely určené pro chromatografii musí splňovat řadu obecných kritérií. Patří mezi ně například: chemická inertnost matrice gelu, chemická stálost v širším rozmezí teplot a pH, nepřítomnost (nebo jen minimální množství) ionizovatelných skupin. Užívané gely jsou k dispozici v různých typech umožňujících vhodný výběr frakcionační oblasti. Jsou to např.: dextranové, polyakrylamidové, hydroxyalkylmethakrylátové, agarosové gely a další¹⁴.



Obr. č. 5: Permeace molekul různé velikosti do póru gelu⁵

2.3.7 Afinitní chromatografie

Tato metoda (nazývaná též bioafinitní nebo biospecifická afinitní chromatografie) spočívá na specifických reakcích funkčních skupin, zabudovaných pro zcela konkrétní účely do syntetických molekul matrice, obdobných gelům, se separovanými látkami. Jde zejména o interakce charakteristické pro některé biologické a biochemické procesy, probíhající mezi dvojicemi látek vysoce selektivně. Např. zcela specificky se na sebe váže protilátka a antigen, enzym na svůj substrát apod.¹.

Stacionární fáze je připravena tak, že látky s biologickými schopnostmi specificky a reverzibilně vážají jiné látky, označované společným názvem jako afinant (podle Reinera a Walche)¹⁵ nebo jako afinantní ligand (podle Lova a Deana)¹⁶ se kovalentně vážají na pevný nosič. Prolijeme-li roztok, obsahující biologicky aktivní látku určenou k izolaci, kolonou pevného nosiče s navázaným afinantem (afinantním sorbentem), všechny látky, které nemají afinitu k danému afinantu, projdou nezadrženy kolonou, kdežto látky, které k němu afinitu mají, budou zadržovány podle poměru svých afinit za daných experimentálních podmínek.

Jako pevné nosiče se používají: agarosové nosiče a jejich deriváty, polyakrylamidové a hydroxyalkylmethakrylátové gely, celulóza a její deriváty a další. Jako afinanty se používají různé aminokyseliny, enzymy, antigeny a protilátky¹⁷.

2.3.8 Frontální chromatografie

Tato technika spočívá ve stálém přivádění roztoku dělené směsi na kolonu až do konce chromatografického procesu. Nejprve z kolony vychází jen mobilní fáze. Pak se objeví a trvale vytéká složka A, mající nejnižší afinitu ke stacionární fázi. Později začne vytékat směs složek A a B, přičemž složka B má středně velkou afinitu ke stacionární fázi. A nakonec, po nasycení stacionární fáze složkou C, která má největší afinitu, vytéká směs složek A, B a C. Tato metoda umožňuje jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu.

Technika není vhodná k preparativním účelům, neboť čistou můžeme dostat jen část látky s nejnižší afinitou ke stacionární fázi⁶.

2.3.9 Vytěšňovací chromatografie

Princip metody spočívá v tom, že se na chromatografickou kolonu jednorázově vnese chromatografovaná směs látek. Pak se až do konce procesu přivádí tzv. „vytěšňovadlo“, které má ke stacionární fázi největší afinitu a ostatní složky před sebou tlačí jako píst a postupně je vytěšňuje z vazby se stacionární fází, podle velikosti jejich afinity.

Nicméně tato metoda nevede k ostrému oddělení látek, vzhledem k nepravidelnostem průtoku a nerovnostem styku dochází k částečnému mísení složek a směs je pak nutno ještě rechromatografovat. Proto byla ještě vyvinuta metoda s vřazenými vytěšňovadly.

Vytěšňovací chromatografie má význam především preparativní nebo poloprovozní, poněvadž daleko lépe využívá kapacity kolony než dále uvedená chromatografie eluční. Nehodí se však k analytickým účelům⁶.

2.3.10 Eluční chromatografie

Na kolonu se nanese jen malá část roztoku směsi a kolona se eluuje mobilní fází, která má ke stacionární fázi nejnižší afinitu. V důsledku opakovaného ustavování rovnováhy se složky pohybují pomalu kolonou. Každá složka se může vymývat nezávisle na druhých a nemusí jedna druhou vytěšňovat. Složky vytékají také v pořadí podle afinit, avšak jejich pohyb je určován v podstatě jen ternární interakcí složka-mobilní fáze-stacionární fáze. Jejich zóny jsou proto při postupu kolonou velmi často odděleny zónou čisté mobilní fáze, nedotýkají se. Složky opouštějí kolonu ve formě zcela oddělených zón, tzv. píků.

Tato metoda se velmi často používá k analytickým účelům a k takovým preparacím, kde je požadováno vysoce účinné dělení i za cenu menší kapacity kolony a větší potřeby rozpouštědel.

Varianty:

- *Prostá neboli izokratická eluce* - k eluci se používá stále stejná mobilní fáze, je vhodná v případech, kde se od sebe stanovované látky neliší moc v afinitě ke stacionární fázi a eluují se tedy v krátkých časových intervalech.
- *Stupňovitá eluce* - provádí se postupným promýváním kolony několika eluenty, z nichž každý následující má vždy vyšší eluční schopnost. Tyto mobilní fáze postupně uvolňují jednotlivé složky směsi a vymývají je⁶.

2.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC (High Performance Liquid Chromatography) je v současné době jedna z nejprogresivnějších analytických metod. Má široké využití ve všech oblastech analýzy léčiv a je využívána v mnoha lékopisných monografiích. Tato metoda byla použita v této práci, a proto je jí věnována samostatná kapitola.

Hlavními přednostmi jsou:

- Možnost kvalitativní i kvantitativní analýzy
- Rychlost a citlivost (záleží na detektoru)
- Potřeba minimálního množství vzorku
- Možnost automatizace
- Oproti plynové chromatografii umožňuje detekci i netěkavých léčiv

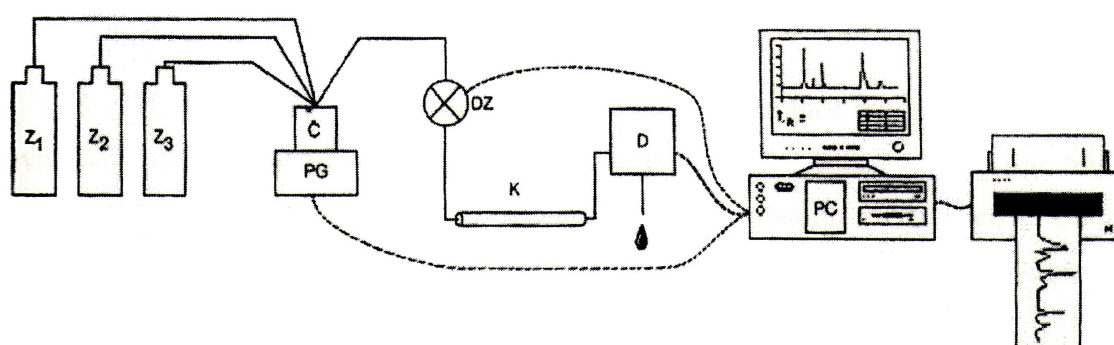
Základem je dělení látek mezi stacionární a mobilní fází několikanásobným ustavováním rovnováhy. Lze k tomu využít všech vratných dvoufázových mechanismů jako je již uvedené rozdělování, adsorpce, iontová výměna a efekt gelu jako síta. Tak lze nalézt efektivní metodu vhodnou pro jakoukoli organickou látku. Základním předpokladem je nalezení optimálních chromatografických podmínek, za nichž získáme ostré a symetrické chromatografické píky, rozdělené pokud možno až na základní linii⁴.

U klasické kapalinové kolonové chromatografie protéká mobilní fáze samospádem. U HPLC se používají čerpadla, tlačící mobilní fázi kolonou pod vysokým tlakem. Dojde tím k výraznému urychlení stanovení³.

2.4.1 Základní části chromatografu

Konstrukce chromatografu může být pojata dvěma způsoby. První způsob je modulární nebo-li stavebnicový systém, druhý je charakterizován kompaktní skříňovou konstrukcí. Oba typy mají své výhody i nevýhody. U stavebnicového je to možnost postupných inovací systému (jeho jednotlivých komponent, připojení přídatných komponent, možnost flexibilní přestavby, snadnější přístup k opravovaným částem). Nevýhodou je množství delších propojovacích kapilár, a tak vyšší spotřeba rozpouštědel. Kompaktní typ má fixní uspořádání, má zajištěn minimální mrtvý prostor, zato sníženou servisní dostupnost¹⁸.

Základní komponenty chromatografu zajišťují transport mobilní fáze, dávkování vzorku, separaci látek a jejich detekci. Blokové schéma – viz obr.č 6



Obr. č 6: Schéma kapalinového chromatografu⁴

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

2.4.1.1 Zásobníky mobilní fáze

Zásobníky bývají konstruovány zejména ze skla, plastů (polyethylen, polypropylen, polytetrafluoroethylen) nebo nerezové oceli. Bývají opatřeny víčkem se dvěma vývody. Jeden je pro přívod helia nebo jiného inertního plynu a druhý je pro spojení s vakuovou

linkou. Tím lze zajistit zbavení mobilní fáze pohlcených plynů. U moderních kapalinových chromatografů je odplyňovací zařízení většinou součástí sestavy.

Na propojování chromatografických systémů se používají většinou kapiláry z plastu. Obecně uplatnění mají tlustostěnné kapiláry polyethylenové nebo teflonové. Umožňují tlakovzdorné spojení i snadnou výměnu součástí¹⁹.

2.4.1.2 Čerpadla

Obecným požadavkem na čerpadla je, aby dávkování bylo plynulé s minimem tlakových pulzů a dále zajištění konstantního průtoku, umožňující kvalitativní i kvantitativní analýzu. Čerpadlo musí být odolné vůči korozivním účinkům přepravované fáze¹⁹. K formování gradientu nebo k vytvoření izokratického systému míšením roztoku dochází buď míšením komponent před čerpadlem (na nízkotlaké straně), nebo za čerpadlem (na vysokotlaké straně). Podle zkušeností laboratorních pracovníků jsou obě možnosti rovnocenné¹⁸.

Pro gradientovou eluci je nutné programovací zařízení, které nastavuje složení mobilní fáze (zvláštní programovací jednotka nebo dnes nejčastěji počítač)¹⁹.

2.4.1.3 Dávkovače vzorků

Dávkovač slouží k přesnému odměření objemu vzorku. Přesnost chromatografického systému je do značné míry závislá na dokonalém dávkování²⁰. Dávkování lze provést buď dávkovacím ventilem (dávkuje se pevně daný přesný objem) nebo pomocí autosampleru (automatický dávkovač). V dnešní době převládá vnášení vzorku do chromatografického systému pomocí šesticestného ventilu s dávkovací smyčkou, která má známý objem²¹.

2.4.1.4 Kolony

Chromatografické kolony jsou zhotovovány z nerezavějící oceli nebo ze skla. Jsou dlouhé 10 až 25 cm o vnitřním průměru 3-5 mm. Dnešní trendy vedou obecně ke zmenšování vnitřních průměrů a zmenšování velikosti částic sorbentů.

Při normálním uspořádání fází je stacionární fáze polární (např. silikagel) a eluuje se nepolární mobilní fází. Při užití převrácených fází (reversed phase) je užit modifikovaný silikagel, kde na jeho OH-skupiny jsou navázány funkční skupiny. Nejčastěji C18

uhlovodíkové řetězce, nebo C8. Případně středně polární skupiny $-NH_2$, $-CN$ a jiné. V tomto uspořádání je lipofilnější látka zadržována na koloně déle, než ta méně lipofilní⁴.

Reverzní fáze se užívají v dnešní době ve více než 80 % aplikací, protože umožňují separace pestré škály organických látek od lipofilních po silně polární či iontové látky.

Na HPLC kolony jsou kladeny značné nároky s ohledem na reprodukovatelnost a robustnost analytických metod. Musí být mechanicky stabilní při pracovních tlacích 30-40 MPa, mít vysokou účinnost a poskytovat symetrické píky i při separaci polárních, kyselých, bazických či vysokomolekulárních látek a měly by mít co nejvyšší permeabilitu (malý odpor i při vysokých průtocích mobilních fází), aby bylo možno dosáhnout rychlých separací. Různé šarže musí mít stejné chromatografické vlastnosti (retenci, selektivitu a účinnost separace) a měly by být dlouhodobě stabilní v co nejširším rozsahu polarit a pH mobilní fáze. Stále větší význam má stabilita kolon při vyšších pracovních teplotách, kdy lze dosáhnout vyšších účinností a rychlejších analýz.

Pro přípravu komerčních kolon pro HPLC se používají dva typy silikagelu- sil-gel a sol-gel. Sil-gel má vyšší pórovitost a nepravidelný tvar pórů. Částice sol-gelu mají menší pórovitost a pravidelnější uspořádání pórů, jsou zpravidla mechanicky stabilnější než částice sil-gelů a pomaleji se rozpouštějí v alkalickém prostředí, proto je řada výrobců používá pro přípravu kolon stabilnějších při vyšším pH (Hypersil, Zorbax, Spherisorb, ...)

Monofunkční silanizační činidla (např. trialkylchlorosilany) umožňují přípravu tzv. „monomerních“ chemicky vázaných stacionárních fází na rozdíl od levnějších di- či trifunkčních silanů, které poskytují „polymerní“ stacionární fáze s vyšším celkovým obsahem chemicky vázané organické fáze, ale zpravidla mají nižší účinnost a odlišnou separační selektivitu pro látky s různým tvarem molekul a jejich vlastnosti jsou hůře reprodukovatelné. Takto připravené stacionární fáze „polymerního“ typu mají významný obsah Si-O-Si můstků paralelních s povrchem silikagelového nosiče, které jsou stabilní v rozmezí pH 2 – 10.

V mobilních fázích s vysokým obsahem vody, které jsou někdy nezbytné pro separace velmi polárních látek, může docházet ke kolapsu chemicky vázaných alkylových řetězců vlivem jejich špatné smáčivosti. Tento problém lze odstranit použitím silanizačních činidel s polárními sekundárními amidovými či karbamátovými skupinami, které působí jako vložka mezi povrchem silikagelu a dlouhými alkyly stacionární fáze. Interakce těchto skupin omezují silanofilní aktivitu stacionární fáze a vedou k odlišné selektivě separace.

V současné době jsou komerčně dostupné stacionární fáze s nejdelšími alkyly C₃₀. Tyto fáze s vysoce uspořádanou strukturou jsou odolné vůči kolapsu v mobilních fázích s vysokým obsahem vody, kde je lze použít pro separace velmi polárních látek. Většinu látek zadržují silněji než stacionární fáze C₁₈ a C₈.

Nově byly vyvinuty i stacionární fáze s chemicky vázanými fluorouhlovodíkovými řetězci, které mají odlišnou selektivitu a v mnoha případech představují užitečnou alternativu k běžným stacionárním fázím s chemicky vázanými oktadecylovými či oktylovými řetězci, zejména pro separaci aromatických látek, např. isomerních nitro-naftalenů.

Nesilikagelové kolony pro HPLC lze připravit i na bázi oxidů kovů: oxidu hlinitého, titaničitého a především zirkoničitého. Oxid zirkoničitý lze připravit ve formě monodisperzních porézních kulových částic, které v mnoha případech vykazují srovnatelnou účinnost jako silikagelové částice stejných rozměrů. Materiály na bázi ZrO₂ mají vynikající stabilitu až do pH = 14 a vysokou tlakovou i tepelnou odolnost, takže je lze využít i pro nejnáročnější rychlé separace při vysokých teplotách (i nad 100° C)²².

Mimo kolon plněných částicovými sorbenty se dnes používají i monolitické kolony, jsou tvořeny jediným kusem pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Jejich výhodou je vysoká odolnost vůči tlaku a s tím související možnost použít vyšší průtokové rychlosti²³.

2.4.1.5 Detektory

Detektory monitorují eluované látky z kolony. Zpravidla sledují koncentraci separovaných látek v eluátu. Detektor pomocí vhodného snímače sleduje některou z vlastností eluátu a signál se po zesílení převádí do zapisovače, který poskytuje záznam závislosti intenzity daného signálu na čase²⁰.

Na detektory jsou kladeny mimořádné požadavky. Je to vysoká citlivost (detekce koncentrací ng až µg), reprodukovatelnost a linearita odezvy, nezávislost odezvy na změně složení mobilní fáze při gradientové eluci a univerzálnost (detekce všech oddělených složek vzorku)³.

Protože většina léčiv obsahuje systém konjugovaných dvojných vazeb nebo aktivní skupiny v organické struktuře molekuly, které jsou schopny absorpce v ultrafialové (UV) nebo viditelné (VIS) oblasti světelného záření, je nejčastějším detektorem **spektrofoto-**

metrický detektor¹⁸. V praxi se uplatňuje zejména UV, eventuelně UV-VIS detektor. Nejužívanější UV detektory jsou:

- *UV detektor s fixní vlnovou délkou* (nejčastěji 254 nm a 280 nm - většina léčiv při nich absorbuje)
- *UV-VIS detektor s proměnnou vlnovou délkou*
- *skenovací (scanning) UV detektor* (snímá během několika sekund absorpční spektrum v maximu píku hodnoceného léčiva)
- *detektor s diodovým polem (diode array detektor, řízený počítačem, trojrozměrná projekce, snímá absorpční spektrum, hodnotí léčivo současně při několika vlnových délkách, porovnává poměry absorbancí)*

Citlivost spektrofotometrických detektorů je velmi vysoká (10^{-9} až 10^{-10} g/ml). Lze je využít i ke gradientové eluci.

Fluorimetrické detektory jsou použitelné pokud analyzované léčivo vykazuje fluorescenci. Některé nefluoreskující látky lze derivatizovat na fluoreskující deriváty. Jsou tedy méně univerzální, zato citlivější (10^{-9} až 10^{-12} g/ml) a selektivnější. Stejně jako UV detektory jsou použitelné pro gradientovou eluci.

Refraktometrické detektory pracují na základě měření rozdílného indexu lomu mobilní fáze a stanovované látky. Díky tomu jsou prakticky univerzální. Jejich nevýhody jsou: nutnost přesného termostátování ($\pm 0,001^\circ\text{C}$), nižší citlivost (10^{-6} g/ml) a nemožnost užití při gradientové eluci^{4,20}.

Mikroadsorpční detektory využívají adsorpční a desorpční teplo, které zaznamenávají v závislosti na množství proteklého eluátu. Je u nich opět nutná stabilizace teploty ($\pm 0,003^\circ\text{C}$), vyhodnocování chromatogramů je mnohem složitější, než u ostatních typů chromatogramů. Citlivost je velmi dobrá – 10^{-9} g s⁻¹²⁰.

Elektrochemické detektory využívají dějů souvisejících s elektrochemickou reakcí na rozhraní elektroda - eluent. Roztok z kolony je veden do detektorové cely, kde je ve styku s elektrodami (mohou být kovové, uhlíkové, ze skleněných vláken potažených vrstvou uhlíku, apod.). V daném uspořádání je tento elektrochemický článek charakterizován hodnotami elektrických veličin - elektrodový potenciál, proud, kapacita a další. Tyto detektory jsou velmi citlivé (10^{-9} až 10^{-12} g/ml) a nelze je použít při gradientové eluci^{4,20}.

V poslední době je užíváno též spojení HPLC s **hmotnostní spektroskopií (MS)**. toto spojení je vysoce selektivní, vysoce citlivé a poskytuje řadu údajů pro identifikaci léčiv. Nicméně jsou velmi finančně náročné⁴.

2.4.2 Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocování chromatografických křivek

Základní kvalitativní veličinou je retenční (eluční) čas t_R , tj. čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Porovnáním elučních dat jednotlivých komponent vzorku se současně získanými daty standardních látek (RL-referenční látka) lze potvrdit identitu neznámých látek analyzovaného vzorku.

Plocha pod eluční křivkou je kvantitativním údajem a je úměrná koncentraci separované složky. Díky tomuto faktu lze zjištěním plochy píku vypočítat množství látky. Obsah látky se zjišťuje pomocí standardu. Používá se metoda vnitřního nebo vnějšího standardu nebo kalibrační postup (metoda kalibrační přímky)^{4,7}.

Metoda vnějšího standardu

Tato metoda spočívá ve dvou krocích. V prvním kroku se na kolonu nastříkne roztok analyzovaného vzorku a po registraci chromatografického záznamu se nastříkne vnější standard a opět se registruje chromatogram. Jako vnější standard se používá u složených lékových přípravků jedna z analyzovaných složek směsi. Koncentrace stanovovaných složek směsi se pak vypočítá z poměru ploch píků jednotlivých stanovovaných látek a plochy píku standardu²⁴.

Metoda vnitřního standardu

Vnitřní standard se přidává ke stanovované látce v přesně známém množství a po důkladném promíslení se směs chromatografuje. Koncentrace stanovovaných látek se vypočítá z poměru ploch jednotlivých separovaných složek a plochy píku vnitřního standardu. Tato metoda má výhodu v tom, že není zatížena chybou dvojího nástřiku, je časově méně náročná. Nicméně vnitřní standard může být jen látka s podobnou chemickou strukturou a podobnými fyzikálně chemickými vlastnostmi, která se samostatně eluuje odděleně od stanovovaných látek a musí být chemicky inertní. Její hledání je často velmi náročné^{7, 24}.

Kalibrační postup

Stanoví se vztah mezi měřeným nebo vyhodnocovaným signálem (y) a množstvím (koncentrace, hmotnost atd.) stanovované látky (x) a vypočítá se kalibrační funkce. Výsledky analýzy se vypočítají ze změřeného nebo vyhodnoceného signálu stanovované látky pomocí inverzní funkce²⁹.

2.4.3 Teorie HPLC

Charakteristickou veličinou pro každou chromatografovanou látku v daném chromatografickém systému je **eluční (retenční) čas** t_R (tj. čas, který uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky) a **eluční (retenční) objem** V_R (proteklý objem mobilní fáze za dobu t_R). Z retenčního času může být retenční objem vypočítán podle vzorce :

$$V_R = t_R v$$

kde: v - průtoková rychlost mobilní fáze.

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

Retenční objem V_R je dán součtem dvou objemových veličin:

$$V_R = V'_R + V_M$$

kde: V'_R - redukovaný retenční objem

V_M - mrtvý objem představující celkový objem, který zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku přes kolonu až po detektor. U většiny dobře sestrojených přístrojů jej lze zanedbat.

Další retenční charakteristikou je hmotnostní **distribuční poměr** D_m (známý jako **kapacitní faktor** k' nebo **retenční faktor** k). Je definován takto:

$$D_m = K_D \frac{V_S}{V_M}$$

kde: K_D - distribuční konstanta

V_S - objem stacionární fáze

V_M - objem mobilní fáze

V praxi se z chromatogramu distribuční poměr složky určí použitím vzorce:

$$D_m = \frac{V_R - V_M}{V_M} = \frac{V'_R}{V_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

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

t_M - mrtvý čas (nebo objem) nebo vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce.

Distribuční poměr lze vyjádřit, pokud se složka vyskytuje v obou fázích ve stejné formě. Umožňuje nám odhadnout, do jaké míry lze eluovat látky z kolony v přijatelném čase a koncentračním profilu. Pokud je D_M malé (1 až 10) jsou i eluční objemy a trvání analýzy krátké^{20,29}.

Pík může být definován **plochou píku (A)** nebo **výškou (h)** a **šířkou v poloviční výšce (w_h)** nebo **výškou píku (h)** a **šířkou píku mezi body inflexe (w_i)**.

Faktor symetrie píku (A_s) se vypočítá ze vzorce:

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

kde: $w_{0,05}$ - šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku v jedné dvacetině jeho výšky.

Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou symetrii píku.

Separční účinnost kolony se vyjadřuje pomocí parametru **účinnost kolony**, který je dán **počtem teoretických pater (N)**, pro které platí:

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

Zdánlivý počet pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou a retenčním časem.

Jako popis účinnosti separace se užívá parametr **rozlišení (R_s)**. Tímto parametrem se rozumí vzdálenost píků dvou složek. Rozlišení se vypočítá ze vztahu:

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

kde : $t_2 > t_1$

w_{h1}, w_{h2} - šířky píků v polovině výšky

Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii.

Při analýzách velmi malých množství látek (nečistoty, rozkladné produkty) se užívá parametr **poměr signálu k šumu (S/N)** a vypočte se ze vztahu:

$$S / N = \frac{2H}{h}$$

Kde : H – výška píku odpovídající dané látce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřená od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky.

h - rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a zaznamenávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík²⁹.

2.5 Vitamíny

Vitamíny jsou organické sloučeniny, které lidské tělo potřebuje pro svůj metabolismus. Člověk sám nemůže vitamíny syntetizovat vůbec, nebo jen v omezeném množství. Přesto, že je jich většinou zapotřebí jen velmi málo, může docházet při jejich nedostatečném přísunu k projevům avitaminózy (nedostatku). Naopak nadměrný přívod určitých vitamínů (A,D) má za následek toxické projevy tj. hypervitaminózu²⁵.

Aby získaly vitamíny potřebnou účinnost, jsou mnohé v organismu modifikovány. Za hlavní funkci vitamínů lze považovat jejich působení jako kofaktorů různých enzymů, resp. substituci jejich funkčních skupin, spotřebovaných v průběhu metabolických pocho-

dů; v některých případech po metabolické konverzi mohou připomínat funkci hormonů (např. vit. D). Racionální indikací vitamínů je především substitute v případě nedostatku. Některé vitamíny působí jako antioxidanty, chrání buněčné struktury před oxidací (vit. E, C). Celkově je nutno říci, že nedostatek vitamínů není u obyvatel rozvinutých zemí častý, spíše se lze setkat s relativním nadbytkem. Nicméně některá podávaná léčiva dovedou narušit vitamínovou bilanci. Seznam vitamínů pro člověka není shodný s jinými živočichy, mnohdy ani s blízkými druhy^{26,27}.

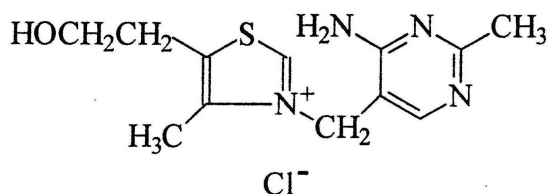
Vitamíny dělíme na rozpustné v tucích (A, D, E, K) a rozpustné ve vodě (vit. skupiny B, C).

V následujícím přehledu jsou uvedeny vitamíny, jejichž analýzou se tato práce zabývá.

2.5.1 Vitamin B₁ (Thiamin)²⁸

Synonyma: Thiaminium dichloratum, vitamin B₁, Thiamini hydrochloridum

Sumární vzorec: C₁₂H₁₈Cl₂N₄OS



$M_r = 337,27$

Obr. č. 7: Thiamin²⁸

Chemický název: 3-[(4-amonio-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl]-5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazoliumdichlorid

Vlastnosti: Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v glycerolu, těžce rozpustný v lihu 96%²⁹.

Vitamín B₁ je nejdéle známým vitamínem (od roku 1905). V klasických postupech léčil východoasijskou, dříve masově se vyskytující chorobu beri-beri. Vyvolávajícím činitelem této závažné choroby napadající nervový („suchá“ beri-beri) a kardiovaskulární systém („vlhká beri-beri), byl fakt, že naturální rýže se začala omílat, tím se odstraňovaly zevní vrstvy obilky a jedině ty obsahovaly thiamin. A protože ve východoasijských zemích je rýže výsadní obilninou, nemohl se deficit B₁ nahrazovat z jiných zdrojů. Avšak i dnes, kdy se tak významná avitaminóza již nevyskytuje, lze se setkat s nedostatkem thiaminu (např. z důvodu alkoholismu). Současná mlýnská technologie také výrazně

snižuje obsah thiaminu v mouce z domácích obilí. Bílý chléb se thiaminem uměle fortifikuje.

Žena potřebuje ke zdárnému vývoji denně alespoň 1 mg thiaminu, muž 1,4 mg. Těhotná či kojící žena má potřebu vyšší. Mimořádně mnoho thiaminu potřebuje alkoholik, ten patří do nejohroženější skupiny. Příčinou je změněný poměr redukováných koenzymů k oxidovaným (NADH/NAD⁺), což ovlivní vznik koenzymu, jenž se v těle z thiaminu tvoří - thiamindifosfátu, ten je nezbytný pro oxidační dekarboxylace a stejně tak pro transketolázu v pentosovém cyklu. Proto se avitaminóza B₁ projevuje porušeným metabolismem sacharidů a aminokyselin. Dodávku thiaminu je užitečné zvyšovat také tehdy, když pH žaludeční šťávy je vysoké; v nepřítomnosti kyseliny chlorovodíkové se požitý thiamin rozloží v žaludku dříve, než se stačí vstřebat. Některé sladkovodní ryby, nejsou-li dopečené, enzymem thiaminásou thiamin destruuje. Dodávka thiaminu by se měla řídit dodávkou sacharidů, existuje mezi nimi přímá úměrnost. Thiamin se v těle neukládá, přebytek se vylučuje močí i ve formě metabolitů^{26,27}.

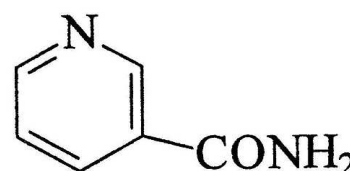
Co se týče zvířat, vitamíny skupiny B jsou důležité zejména pro intenzivně rostoucí drůbež, prasata a též mláďata, jejichž schopnost tvorby těchto vitamínů je limitována. U dospělých zvířat jsou vitamíny skupiny B syntetizovány v dostatečném množství bачorovou a střevní mikroflórou^{30,31}.

2.5.2 Vitamin B₃ (PP- protipelagrový vit., Nikotinamid)

Synonymum: Niacinamid

Sumární vzorec: C₆H₆N₂O

Mr: 122,13



Obr. č. 8: Niacinamid²⁸

Chemický název: Amid kyseliny 3-pyridinkarboxylové

Vlastnosti: Bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Je snadno rozpustný ve vodě a v ethanolu²⁹.

Nikotinamid a kys. nikotinová nebo-li niacin ne zcela odpovídají definici vitamínů, protože se v těle do jisté míry syntetizují z tryptofanu. Nikotinát i nikotinamid jsou předchůdci oxidoredukčních koenzymů NAD⁺ a NADP⁺. Obě vitamínové látky se tradičně řadí mezi komplex vitamínů B.

Nikotinamid se nachází v potravinách rostlinného i živočišného původu. Nejbohatší jsou kvasnice, otruby, játra, maso, vejce, luštěniny, ořechy, rýže a těstoviny; běžná hlazená rýže je zdrojem chudým. Člověk musí denně přijmout relativně velké množství: 13-18 mg.

Klasickou avitaminózou niacinu je pelagra, nemoc tří D (dermatitis, diaree-průjem a demence). Kožní změny se projevují hlavně na místech vystavených slunečnímu záření. Zánětlivé změny se najdou také na sliznicích ústní dutiny, jazyka a žaludku. Pelagra byla značně rozšířena v jihovýchodních státech USA, kde se chudí lidé stravovali převážně kukuřicí, která obsahuje volného nikotinamidu a tryptofanu velmi málo.

Niacin není toxický a nevyvolává hypervitaminózu. Jako léčivo se uplatňuje při cévních poruchách a při zánětech žil. Také snižuje hladinu cholesterolu²⁷.

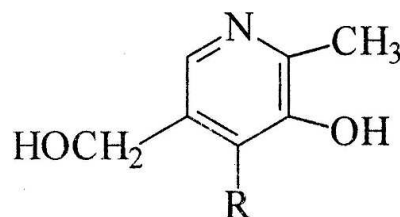
Absorpce nikotinamidu je dobrá, distribuuje se do všech tkání a vylučuje z větší části ve formě metabolitů²⁶.

2.5.3 Vitamin B₆ (Pyridoxin)

Synonyma: Pyridoxolium chloratum, Pyridoxinium chloratum, vitamin B₆

Sumární vzorec: C₈H₁₂ClNO₃

Mr: 205,64



Obr. č. 9: Pyridoxol -R=CH₂OH
Pyridoxal - R=CHO
Pyridoxamin - R=CH₂NH₂²⁸

Chemický název: 3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridiniumchlorid

Vlastnosti: Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek. Je snadno rozpustný ve vodě, těžce rozpustný v lihu 96%. Taje při asi 205 °C, za rozkladu.

Představuje trojici sloučenin – pyridoxal, pyridoxol a pyridoxamin. Biologicky aktivní jsou tyto látky až po vnitřní transformaci a fosforylaci. Pak funguje jako kofaktor mnohých enzymů ovládajících metabolismus aminokyselin, v první řadě aminotransferas a dekarboxylas, je však zásadní také pro svalovou glykogenfosforylázu.

Lidský organismus vyžaduje příjem přibližně 2 mg pyridoxinu na den. Starší lidé nad 60 let mívají nižší hladiny tohoto vitamínu, protože jeho absorpce a využití jsou oslabené; proto by dodávka starším lidem měla být asi o třetinu vyšší. Také těhotné ženy i ženy v premenstruálním období potřebují vyšší dodávku.

Zdrojem pyridoxinu jsou játra, ryby, mléko, celozrnná mouka, brambory, banány a zelenina.

Deficit pyridoxinu nebývá izolovaný, ale spojuje se s deficitem dalších vitamínů B. Vyvolává záněty kůže, sliznic a poruchy CNS. Výrazně je deficitem narušen metabolismus tryptofanu – v těle se pak hromadí xanthurenát, jehož močová sekrece po orálním podání tryptofanu se užívá k diagnóze pyridoxinové hypovitaminózy. K deficitu, projevujícím se jako polyneuritida, dochází též při léčení antituberkulotikem hydrazidem kyseliny isonikotinové (INH), který je antagonistou pyridoxalfosfátu (účinná forma pyridoxinu v těle)²⁷.

Dalším projevem deficitu pyridoxinu je sideroplastová anémie. Pyridoxalfosfát je totiž potřebný k syntéze porfyriu. Nedostatek vitamínu má pak za následek nadbytek železa, které ovšem nemůže být inkorporováno do porfyriu.

Pyridoxin má řadu lékových interakcí. Některé léky alterují metabolismus či biologickou dostupnost pyridoxinu, např. INH, perorální kontraceptiva, některá antibiotika, léky tlumící imunitní systém. Současné podání penicilaminu může způsobit anémii či periferní neuritidu v důsledku antagonismu²⁶.

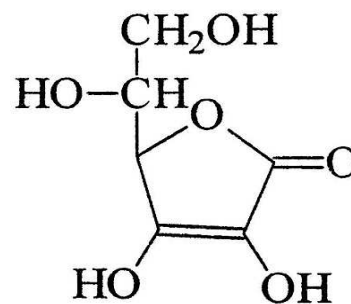
2.5.4 Vitamin C (Kys. askorbová)

Synonymum: Vitamin C

Sumární vzorec: C₆H₈O₆

Mr: 176,13

Charakteristika: (R)-5-[(S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxy-5H-furan-2-on.



Obr. č. 10: Kys. askorbová²⁸

Vlastnosti : Bílý nebo téměř bílý krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly. Působením vzduchu a vlhkostí mění barvu. Je snadno rozpustná ve vodě, dobře rozpustná v lihu 96% a prakticky nerozpustná v etheru. Taje při asi 190 °C, za rozkladu.

Je vitamínem jen u člověka, primátů a morčat. U ostatních savců a jiných živočichů se syntetizuje v těle. Je málo odolná vůči teple, oxidaci a přítomnosti kovů. Oxidovaným produktem je kys. dehydroaskorbová, jež je vitamínově účinná jen nepatrně. V organismu působí jako antioxidant. Dále působí jako faktor potřebný pro hydroxylaci prolinu a

lysinu při biosyntéze kolagenu, což podmiňuje řádné vyžívání pojiva, hojení ran a vývin zubů. Dále se podílí na hydroxylaci steroidů. Uplatňuje se jako faktor při syntéze katecholaminů, pomáhá absorpci železa ve střevech, působí na metabolismus tyrosinu a tryptofanu.

Askorbát se nejvíce nachází v černém rybízu, červené paprice, křenu, kysaném zelí. Dále v menším množství v ostatním ovoci a zelenině. Jistým zdrojem je i živočišná potrava, hlavně játra.

Doporučená denní dávka je 60 mg. Klasická avitaminóza, známa jako kurděje (skorbut) se projevuje otokem sliznic, ztrátou zubů, vadnou osifikací a poškozením kapilár se vznikem podkožních hemoragií. Tato avitaminóza se v dnešní době téměř nevyskytuje, nebo alespoň ne v tak rozvinutém stadiu.

Používá se jako preventivní prostředek působící proti infekčním nemocem a nachlazení. Má jistý vliv na cholesterol. Jako sporný efekt je považován efekt velkých dávek proti zhoubným nádorům. Má prokazatelný pozitivní vliv na činnost mozkové kůry²⁷.

Jak již bylo řečeno výše, zvířata kromě primátů a morčat si vitamín C syntetizují v těle. Nicméně jeho preventivní podávání je důležité zejména u mláďat, ale i u dospělých zvířat při mimořádné zátěži organismu a při stresových stavech u prasat a drůbeže. U drůbeže je vitamín C podáván za účelem pozitivního ovlivnění snůšky³¹.

2.6 Rešerše

Vzhledem k tomu, že vitamíny B₁, B₆, nikotinamid a vitamín C jsou velmi dlouho známé látky, byla na nich již provedena celá řada analytických studií, založených na různých principech (zejména HPLC, micelární chromatografie, spektrofotometrie a další). Méně je ovšem studií, kde jsou analyzovány všechny čtyři vitamíny najednou. Tato práce je zaměřena pouze na studie od roku 2002, kde byly vitamíny stanovovány ve farmaceutických přípravcích.

Studie pomocí HPLC

1. C. K. Markopoulou et al. pomocí RP-HPLC s gradientovou elucí stanovovali vit. **B₁**, **B₆** a B₁₂ v multivitaminových tabletách. Byla použita kolona Hypersil-BDS C18. Jako mobilní fáze A: 0,015% triethylamin, pH upraveno na 2,7 pomocí

kyseliny sírové 2 mol/l; B: acetonitril. Jejich poměr byl během analýzy měněn. Doba analýzy byla 15 min. Vitamíny B₁ a B₆ byly detekovány spektrofotometricky na vlnové délce 280 nm. Analýza probíhala při 30°C průtokovou rychlostí 1,6 ml/min³².

2. B. Klejdus et. al. při stanovování ve vodě a tucích rozpustných vitamínů ve farmaceutických přípravcích (B-komplex, šumivé multivitamíny a další) použil kolonu MetaChem Polaris C18-A (150 mm x 4,6 mm), při izokratické a lineárně gradientové eluci s mobilní fází obsahující A: 0,01% trifluorooctovou kyselinu, pH 3,9, B: methanol. Průtoková rychlost byla 0,7 ml/min. Detekovány byly spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm. Analýza trvala 30 min³³.
3. U. Höller et al. stanovovali kys. listovou, **nikotinamid**, nikotinovou kys., riboflavin, riboflavin-5'-fosfát, **pyridoxin** a **thiamin** pomocí RP (C18) s UV-detekcí v multivitaminových tabletách. Použili kolonu LiChrospher 60, RP-select B, 250 x 4,6 mm (Grom, Herrenberg, Německo). Mobilní fáze fosfátový pufr - methanol (4:1 v/v) o pH 2,8. Detekce byla měněna v čase na 264, 280 a 245 nm. Analýza trvala cca 20 min při 30°C, s průtokovou rychlostí 1 ml/min³⁴.
4. V. M. Staroverov et al. provedli analýzu ve vodě rozpustných vitamínů v sirupu Oligovit pomocí RP(C18)-HPLC. Byla použita kolona Diaspher-110 C 18, 250 mm x 4 mm . Byly použity tři různé mobilní fáze pro tři skupiny vitamínů. Průtoková rychlost pro všechny měření byla 1 ml/min. Detekce byla na třech vlnových délkách: 210, 270 a 254 nm³⁵.
5. L.A. Kozhanova et. al. stanovovali ve vodě i v tucích rozpustné vitamíny v multivitaminových přípravcích pomocí RP-HPLC za použití gradientové eluce. Byla použita kolona Nucleosil 100-5 C18, 75 x 2 mm. Jako mobilní fáze byl použit 0,4 M roztok LiClO₄ o pH 2,4 a acetonitril – jejich poměr byl v průběhu analýzy měněn. Průtoková rychlost byla 0,1 ml/min při 35°C. Detekce byla při šesti vlnových délkách³⁶.
6. I. Almagro et al. stanovovali **thiamin**, **pyridoxin**, riboflavin, kys. listovou, nikotinovou a **nikotinamid** pomocí RP-HPLC ve farmaceutických přípravcích.

Kolona byla použita RP-18 (150 mm x 3,9 mm) ze Sugelabor (Madrid, Španělsko). Během gradientové eluce byla použita jako mobilní fáze směs sodné soli kyseliny dodecylsulfonové (SDS), propanolu a H₃PO₄, průtoková rychlost byla 1 ml/min³⁷.

7. Ke- Li ve své práci stanovil **nikotinamid**, **pyridoxin**, **thiamin** a riboflavin v multivitaminových tabletách pomocí RP-HPLC. S použitím kolony Hypersil C-18, mobilní fázi methanol:vodná fáze 18:82 (vodná fáze obsahovala 2,5 mmol/l sodné soli hexansulfonové kyseliny (SHS) a byla okyselená kys. octovou na pH 2,8). Průtoková rychlost byla 1,2 ml/min a analýza trvala 17 min při 30 °C³⁸.
8. R. Amidžič et al. stanovil **thiamin**, **nikotinamid** a **pyridoxin** v multivitaminu Pentovit pomocí RP-HPLC s kolonou Supelcosil ABZ⁺ (150 mm x 4,6 mm). Při lineární eluci byla použita jako mobilní fáze: methanol a vodný roztok sodné soli kyseliny heptansulfonové 0,005 mol/l, 0,10% triethylamin, pH bylo upraveno na 2,8 pomocí ortofosforečné kyseliny (V/V 25:75). Průtoková rychlost 1ml/min. Detekce byla provedena spektrofotometricky při 290 nm³⁹.

Studie pomocí micelární chromatografie

9. L. Monteferrer-pons stanovoval touto metodou **nikotinamid**, **thiamin**, riboflavin a **pyridoxin** v multivitaminových farmaceutických přípravcích. Mobilní fáze obsahovala sodnou sůl dodecylsulfonové kyseliny (SDS), pentanol a byla okyselená na pH 3. Kolona byla C-18 a průtoková rychlost byla prvních 6 minut 1 ml/min a pak 2 ml/min. Detekce byla spektrofotometricky při vlnových délkách 270, 290 a 350 nm⁴⁰.
10. A.R. Ghorbani stanovoval 7 ve vodě rozpustných vitamínů pomocí MLC. Mobilní fáze opět obsahovala SDS a dále fosfátový pufr s pH 3,6. Detekce byla provedena spektrofotometricky při vlnových délkách 254, 295, 361 nm⁴¹.

Po HPLC a micelární chromatografii následuje řada různých dalších metod, kterými byly již vitamíny stanovovány. Např. :

11. M. M. Delgado-Zamarreño⁴² et al. použil pro stanovení ve vodě rozpustných a v tucích rozpustných vitamínů elektrokinetickou kapilární chromatografií.
12. F. R. P. Rocha et al.⁴³, H. Zhu et al.⁴⁴, J. G. Portela et al.⁴⁵ použili ke stanovení vitamínů (většinou skupiny B) spektrofotometrické metody.
13. P. L. de la Alba et al. stanovoval ve své práci **thiamin**, riboflavin, **nikotinamid** a **pyridoxin** pomocí UV-spektrofotometrie a multivariační analýzy⁴⁶.
14. L. G. Shaidarova et al. použili ke stanovení **thiaminu**, riboflavinu a **pyridoxinu** průtokovou injekční analýzu (FID)⁴⁷.

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit vhodné chromatografické podmínky pro simultánní stanovení vitamínů B₁ (thiamin), B₃ (nikotinamid), B₆ (pyridoxin) a vitamínu C (kys. askorbová) pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí v multivitaminových šumivých tabletách, prodávaných jako doplněk stravy, následně provést stanovení obsahu a porovnat získané hodnoty s hodnotami deklarovanými výrobcem na obalu.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a pomůcky

Použité standardy:

Aneurine hydrochloride (Thiamin hydrochlorid), Koch-light Laboratories Ltd,
Coinbrook Bucks, England
Pyridoxine hydrochloride, Koch-light Laboratories Ltd, Coinbrook Bucks, England
Kyselina listová (Folic acid), USP XVI, Koch-light Laboratories Ltd Coinbrook
Bucks, England
Nikotinamid (Nicotinamide), Loba Feinchemie, Fischamed, Rakousko
Riboflavin, Koch-light Laboratories Ltd, Coinbrook Bucks, England
Vitamin B₁₂ (Cyanocobalaminum), Léčiva, ČR
Kyselina askorbová (Acidum ascorbicum), ČL 2005, Farmakon Olomouc, ČR

Chemikálie

Methanol gradient grade, Merck, Darmstadt, Německo
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema, Brno, Česká republika
Kyselina trihydrogenfosforečná p.a, Lachema, Brno, Česká republika
1-butansulfonová kyselina, Sigma-Aldrich, Německo
Hydrogenfosforečnan amonný p.a, Lachema, Brno, Česká republika
Sodná sůl kyseliny hexansulfonové aprox. 98% (SHS), Sigma-Aldrich, Německo
Amonná sůl kyseliny octové p.a., Balex, Pardubice, Česká republika
Triethylamin purum ≥98% (GC), Fluka, Švýcarsko
Kyselina octová p.a., Lachema, Brno, Česká republika
Voda čištěná reverzní osmózou

Zkoušené vnitřní standardy

Acetanilid, Léčiva, Praha, Česká republika
Ambroxol hydrochlorid, Léčiva, Praha, Česká republika
Ethylaparaben, Léčiva, Praha, Česká republika
Chinidin sulfát, Léčiva, Praha, Česká republika
Phenacetin, Léčiva, Praha, Česká republika

Pilocarpin hydrochlorid, Léčiva, Praha, Česká republika
Procainamid hydrochlorid, Léčiva, Praha, Česká republika
Promethazin hydrochlorid, Léčiva, Praha, Česká republika
Salicylan sodný, Léčiva, Praha, Česká republika
Sulpirid, Léčiva, Praha, Česká republika

Kolony

Chromatografická kolona- 150x3 mm I.D.s náplní SGX C18, 5 µm, Tessek Ltd,
Praha, Česká republika
Chromatografická kolona - 150x3 mm I.D.s náplní SGX – NH₂, Tessek Ltd,
Praha, Česká republika
Chromatografická kolona - 150x4,6mm I.D. s náplní Discovery Cyano, 5 µm,
SUPELCO, Praha, Česká republika
Chromatografická kolona - 250x4mm I.D. s náplní Lichrosphere 100 RP C18, 5 µm,
Merck, Německo
Chromatografická kolona -250x3mm I.D. Separon SGX C 18 ,7 µm, Tessek Ltd,
Praha, Česká republika

Přístroje

Acidimetr 333, Druopta Praha, Česká republika
Spektrofotometr Shimadzu, UV-2401 PC, Shimadzu, Japonsko
Ultrazvuková lázeň K10, Kraittek, Slovensko
Kapalinový chromatogram, Agilent 1100 series, HPST, s. r. o., Praha, ČR
Analytické váhy AND, Helago, Česká republika

Ostatní

Laboratorní sklo
Vakuová vývěva pro filtraci mobilní fáze

4.2 Vývoj chromatografických podmínek

Při vývoji chromatografických podmínek byly použity chromatografické kolony, uvedené ve výčtu níže, u nichž byly vždy vyzkoušené uvedené mobilní fáze. Chromatografické podmínky byly zkoušené na standardech vitamínů, zejména thiaminu,

pyridoxinu, nikotinamidu a kys. askorbové, později byly pro zajímavost nastříknuty i ostatní vitamíny, vyskytující se v multivitaminovém přípravku, aby bylo vidět, kde je možno čekat jejich píky. Díky tomu, že každý vitamín má jiné absorpční maximum (thiamin-244 nm, pyridoxin-291 nm, nikotinamid-262 nm, kys. askorbová- 243 nm), bylo nutno stanovit optimální vlnovou délku, vhodnou pro detekci všech čtyř vitamínů. Při hledání optimálních chromatografických podmínek byl každý vitamín detekován při svém absorpčním maximu. Následně byla hledána optimální vlnová délka pro všechny stanovované vitamíny. Průtoková rychlost byla 0,3-1 ml/min. Nástřik byl vždy 10 μ l.

1. Tessek SGX C18 (5 μ m), 150x3 mm

methanol : voda; v poměru 60:40 (v/v)

methanol : voda; v poměru 80:20 (v/v)

methanol : fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l) ; v poměru 60:40 (v/v)

methanol : fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l, pH 3,0 - upraveno pomocí 10 % H_3PO_4) ; v poměru 60:40 (v/v)

methanol : fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l, pH 3,0 - upraveno pomocí 10 % H_3PO_4) + sodná sůl kyseliny 1-butansulfonové 0,005 mol/l; v poměru 60:40 (v/v)

methanol : fosfátový pufr (K_2HPO_4 0,05 mol/l, pH 3,0 - upraveno 10 % H_3PO_4) + sodná sůl hexansulfonové kyseliny (SHS) 0,005 mol/l; v poměru 60:40 (v/v)

methanol : fosfátový pufr ($(NH_4)_2HPO_4$ 0,05 mol/l , pH 7,9); v poměru 60:40 (v/v)

methanol : fosfátový pufr ($(NH_4)_2HPO_4$ 0,05 mol/l, pH 3,0, upraveno pomocí 10 % H_3PO_4); v poměru 60:40 (v/v)

methanol : fosfátový pufr ($(NH_4)_2HPO_4$ 0,05 mol/l, pH 3,0, upraveno pomocí 10 % H_3PO_4) + SHS 0,005 mol/l; v poměru 60:40 (v/v)

2. Kolona NH_2 , Tessek Ltd. Praha, 150x3mm

methanol : voda; v poměru 60:40 (v/v)

methanol : voda; v poměru 70:30 (v/v)

methanol : fosfátový pufr ($(NH_4)_2HPO_4$ 0,05 mol/l, pH 3,0, upraveno pomocí 10 % H_3PO_4) ; v poměru 70:30 (v/v)

methanol : octanový pufr ($CH_3COO(NH_4)$ 0,05 mol/l); v poměru 70:30 (v/v)

methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05 mol/l); v poměru 60:40 (v/v)
methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05 mol/l, pH 3,75 upraveno 10 %
 CH_3COOH); v poměru 70:30 (v/v)
methanol : octanový pufr $\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05 mol/l, pH 3,75 upraveno 10 %
 CH_3COOH) + SHS 0,005 mol/l; v poměru 70:30 (v/v)

3. Discovery Cyano (5 μm), 150x4,6 mm

methanol : voda; v poměru 60:40 (v/v)
methanol : fofátový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l); v poměru 60:40 (v/v)
methanol : fofátový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l) + SHS 0,05 mmol/l; v poměru
60:40 (v/v)
methanol : fofátový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l, pH 3,0 upraveno 10 % H_3PO_4) +
SHS 0,005 mol/l; v poměru 60:40 (v/v)
methanol : fofátový pufr (KH_2PO_4 0,05 mol/l, pH 3,0 upraveno 10 % H_3PO_4) +
SHS 0,005 mol/l; v poměru 70:30 (v/v)
methanol : fosfátový pufr ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,05 mol/l , pH 7,9); v poměru 60:40
(v/v)
methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05mol/l) ; v poměru 60:40 (v/v)
methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05mol/l, pH 3,68 upraveno 10 %
 CH_3COOH) ; v poměru 60:40 (v/v), průtoková rychlost 0,3 ml/min
methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05mol/l, pH 3,68 upraveno 10 %
 CH_3COOH) ; v poměru 60:40 (v/v), průtoková rychlost 0,5 ml/min

4. Lichrosphere 100 RP C18 (5 μm), 250x4 mm

methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05mol/l, pH 6,9); v poměru 60:40
(v/v)
methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05mol/l, pH 5,8 upraveno 10 %
 CH_3COOH); v poměru 60:40 (v/v)
methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05mol/l, pH 4,9 upraveno 10 %
 CH_3COOH); v poměru 60:40 (v/v)
methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05mol/l, pH 3,9 upraveno 10 %
 CH_3COOH); v poměru 60:40 (v/v)
methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,05mol/l, pH 2,8 upraveno 10 %
 CH_3COOH); v poměru 60:40 (v/v)

methanol : octanový pufr ($\text{CH}_3\text{COO}(\text{NH}_4)$ 0,1mol/l, pH 3,45 upraveno 10 % CH_3COOH); v poměru 60:40 (v/v)

5. Separon SGX C 18 (7 μm), 250x3mm

methanol : fosfátový pufr $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,1 mol/l, pH 2,94 upraveno 10 % H_3PO_4); v poměru 60:40 (v/v)

methanol : fosfátový pufr $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,1 mol/l, pH 2,94 upraveno 10 % H_3PO_4) + 0,005 mol/l SHS; v poměru 60:40 (v/v)

6. Lichrosphere 100 RP C18 (5 μm), 250x4 mm

methanol : fosfátový pufr $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,1 mol/l, pH 2,94 upraveno 10 % H_3PO_4) + 0,005 mol/l SHS; v poměru 60:40 (v/v)

methanol : voda (pH 2,8 upraveno 10 % CH_3COOH) + 0,005 mol/l SHS; v poměru 60:40 (v/v)

methanol : voda (pH 2,8 upraveno 10 % CH_3COOH) + 0,005 mol/l SHS; v poměru 20:80 (v/v)

methanol : voda (pH 2,8 upraveno 10 % CH_3COOH) + 0,005 mol/l SHS + 0,1 % triethylamin (TEA); v poměru 20:80 (v/v), průtoková rychlost 1 ml/min

Příprava mobilní fáze

Ke stanovení vitamínů byla použita mobilní fáze ve složení methanol : voda (pH 2,8 upraveno 10 % CH_3COOH) + 0,005 mol/l SHS + 0,1 % triethylamin (TEA); v poměru 20:80 (v/v). Nejprve byl připraven vodný roztok sodné soli kyseliny hexansulfonové (0,005 mol/l). K tomu byl přidán vždy triethylamin, tvořící v objemu mobilní fáze 0,1 %. K celému objemu pak byla po kapkách přidávána 10 % kyselina octová za současného měření pH až do požadovaného pH 2,8.

Hledání vhodného vnitřního standardu

Bylo zkoušeno několik látek, jako potenciálních vnitřních standardů. Byly to: pilocarpin, prokaiamid, promethazin, chinidin, ethylparaben, fenacetin, acetanilid, sulpirid, ambroxol a salicylan sodný.

Vnitřní standard, jak již bylo řečeno v kapitole 2.4.2, by měla být látka s podobnou chemickou strukturou a podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, musí se eluovat

odděleně od ostatních píků, ale zároveň v rozumném čase. Dále musí být chemicky inertní.

Zkoušené látky se ale buď za daných podmínek neeluovaly vůbec, nebyly za dané vlnové délky detekovatelné nebo se eluovaly v místě píků vitamínů. Proto nebylo možné metodu vnitřního standardu použít a byla zvolena metoda kalibrační přímky.

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Příprava roztoků pro vývoj metody

Všechny vitamíny byly rozpouštěny ve vodě. U každého byla použita koncentrace blízká předpokládané koncentraci v multivitaminových šumivých tabletách. Všechny byly na kolonu nastříkovány v objemu 10 µl. Thiamin byl použit ve formě své soli (Thiamin hydrochlorid) v koncentraci 0,014 mg/ml. Pyridoxin byl rovněž rozpouštěn ve formě své soli (Pyridoxin hydrochlorid) v koncentraci 0,02 mg/ml. Nikotinamid byl rozpouštěn v koncentraci 0,18 mg/ml. Vitamin C (kys. askorbová) byl rozpouštěn v koncentraci 0,6 mg/ml.

4.3.2 Příprava roztoků pro vytvoření kalibrační přímky

Standardní roztoky pro přípravu kalibrační přímky byly připravovány v pěti koncentracích pro každý vitamín, podle koncentrace deklarované na obalu multivitaminového preparátu (mg v tabletě), tj. thiamin 1,4 mg/tbl, pyridoxin 2,0 mg/tbl, nikotinamid 18,0 mg/tbl a kyselina askorbová 60,0 mg/tbl, viz. tab. č. 1.

Do pěti 100 ml odměrných baněk, označených čísly od 1 do 5 byly rozpuštěny navážky jednotlivých vitamínů (tab.č. 1). Navážky byly rozpuštěny ve vodě (pro dokonalé a rychlé rozpuštění byla použita ultrazvuková lázeň) a voda doplněna k rysce. Roztoky byly řádně promíchány. Z každé baňky byl odpipetován 1 ml do 10 ml odměrné baňky a vodou doplněny po rysku a řádně promíchány. Tyto roztoky s konečnými koncentracemi jednotlivých vitamínů (tab. č. 1) byly nastříkovány na kolonu každý třikrát.

Pro ověření kalibrační přímky bylo postupováno stejně o 7 dní později. Každý vzorek byl nastříknut pětikrát.

Tabulka č. 1: Koncentrace roztoků pro kalibrační přímku**A - Navážka [mg] do 100 ml odměrné baňky****B - Skutečná koncentrace v nástřiku [mg/ml]****C - Předpokládaná koncentrace v šumivém multivitamínu [mg/ml]**

	1		2		3		4		5		C
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
Thiamin	7	0,007	9	0,009	14	0,014	18	0,018	21	0,021	0,014
Pyridoxin	10	0,01	15	0,015	20	0,020	25	0,025	30	0,03	0,02
Nikotinamid	90	0,09	140	0,14	180	0,18	220	0,22	270	0,27	0,18
Vitamín C	300	0,3	450	0,45	600	0,6	750	0,75	900	0,9	0,6

4.3.3 Příprava roztoku multivitamínu

5 šumivých multivitaminových tablet bylo rozdrobněno a kvantitativně přeneseno do 500 ml odměrné baňky. Přidáním vody byly rozpuštěny. Roztok byl doplněn po rysku. Po důkladném promíchání byla část roztoku přefiltrována přes papírový filtr. Filtrát byl nástřikován na kolonu celkem šestkrát. Koncentrace jednotlivých vitamínů při nástřiku viz tab.č. 2 .

Tabulka č. 2: Předpokládané (deklarované) koncentrace při nástřiku multivitamínu

	Koncentrace [mg/ml]
Thiamin	0,014
Nikotinamid	0,18
Pyridoxin	0,02
Kys. askorbová	0,6

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimální chromatografické podmínky pro HPLC analýzu

Stacionární fáze

Při vývoji optimálních chromatografických podmínek pro hodnocení thiaminu, pyridoxinu, nikotinamidu a kys. askorbové v multivitaminových šumivých tabletách, byly vyzkoušeny různé stacionární fáze. Jako nejvhodnější byla zvolena chromatografická kolona 250 mm x 4 mm I.D. s náplní Lichrosphere 100 RP C18 (5 μ m) firmy Merck, Německo.

Při jejím použití bylo dosaženo optimálního rozdělení jednotlivých píků až na základní linii a také jejich optimálního tvaru na chromatogramu.

Mobilní fáze

Jako nejvhodnější mobilní fáze byla zvolena methanol : voda (pH 2,8 upraveno 10% CH₃COOH) + 0,005 mol/l sodné soli kyseliny hexansulfonové (SHS) + 0,1% triethylaminu (TEA); v poměru 20:80 (v/v). Při jejím použití docházelo k optimálnímu dělení píků jednotlivých vitamínů. Píky byly rozděleny až na základní linii a celkový čas analýzy nepřesáhl 13 minut.

Průtoková rychlost byla zvolena 1 ml/min. Při nižší rychlosti nebyly získány optimální tvary píků. Vyšší rychlost by mohla způsobit přetlakování chromatografického systému.

Detekce

Pro všechna měření byl užit spektrofotometrický detektor. Detekce byla prováděna v oblasti UV spektra. Podle zjištěných absorpčních spekter všech vitamínů byla zvolena jako optimální vlnová délka 270 nm.

5.2 Kalibrační přímky jednotlivých vitamínů

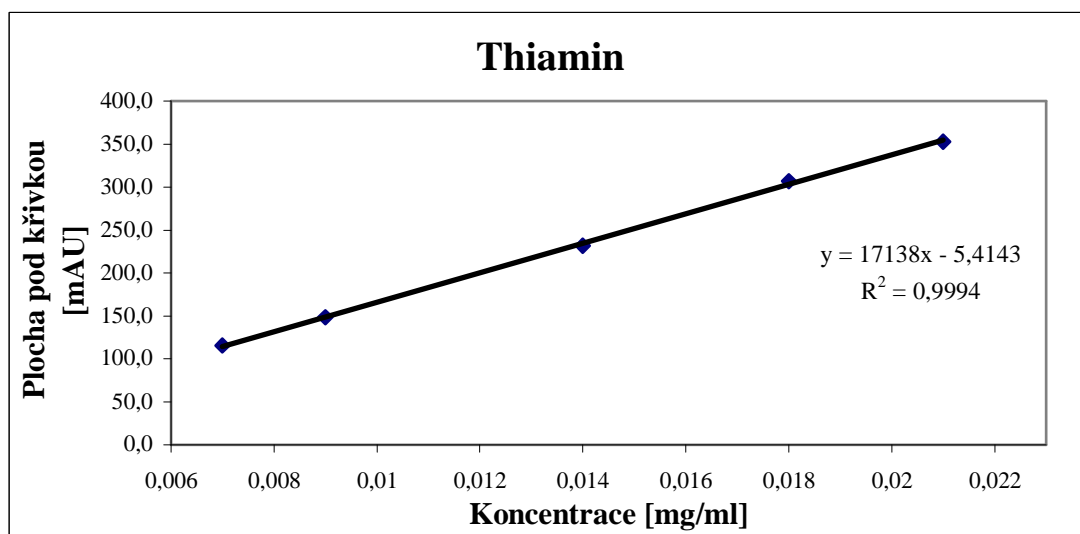
V následujících tabulkách jsou vždy uvedeny velikosti ploch pod křivkou [mAU] při tvorbě kalibračních přímek při nástřicích 1, 2, 3 event. i 4 a 5 u ověření. Každá podkapitola se věnuje vždy danému vitamínu. Vzorokly č. 1, 2, 3, 4 a 5 značí stoupající koncentraci, která je uvedena v druhém sloupci. Pod tabulkou je vždy graf v závislosti plochy pod křivkou na koncentraci v nástřiku [mg/ml].

V kapitole 5.2.9. je chromatogram všech čtyř vitamínů při měření kalibrační přímky.

5.2.1 Kalibrační přímka pro thiamin:

Tabulka č. 3: Hodnoty kalibrační přímky pro thiamin za daných koncentrací

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Průměr
1	0,007	115,4	115,1	115,4	115,3
2	0,009	148,7	148,2	148,8	148,6
3	0,014	243,4	226,6	225,7	231,9
4	0,018	307,8	306,1	306,2	306,7
5	0,021	352,9	352,8	353,2	353,0

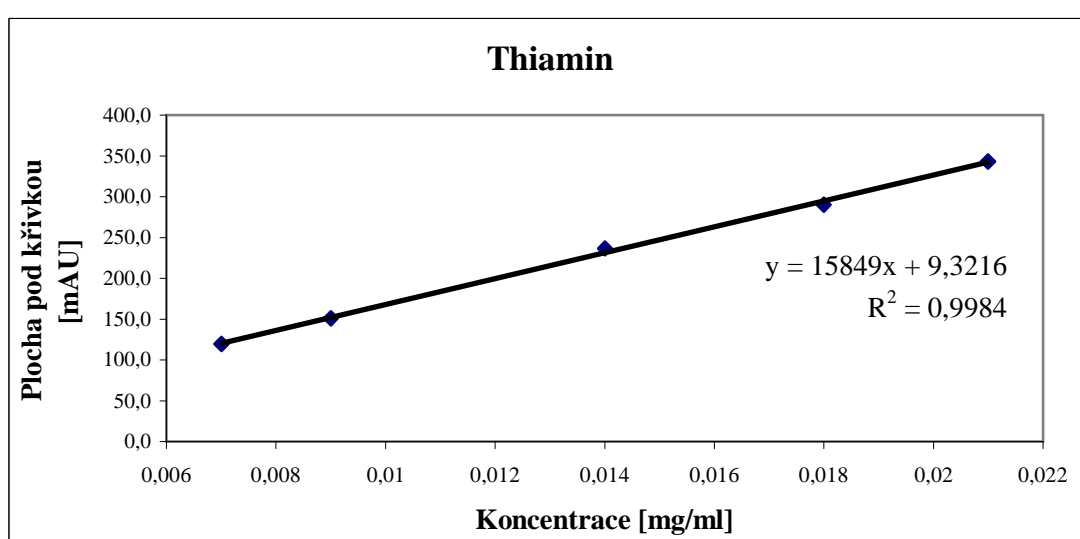


Obr. č. 11: Kalibrační přímka – thiamin

5.2.2 Ověření kalibrační přímky pro thiamin

Tabulka č. 4: Ověření kalibrační přímky pro thiamin

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Nástřik 4	Nástřik 5	Průměr
1	0,007	120,1	119,7	119,2	118,7	119,5	119,4
2	0,009	151,4	149,2	150,8	151,5	151,1	150,8
3	0,014	239,6	235,3	236,3	236,8	236,4	236,9
4	0,018	289,4	290,4	289,9	289,3	290,6	289,9
5	0,021	342,6	343,3	344,1	343,4	342,5	343,2

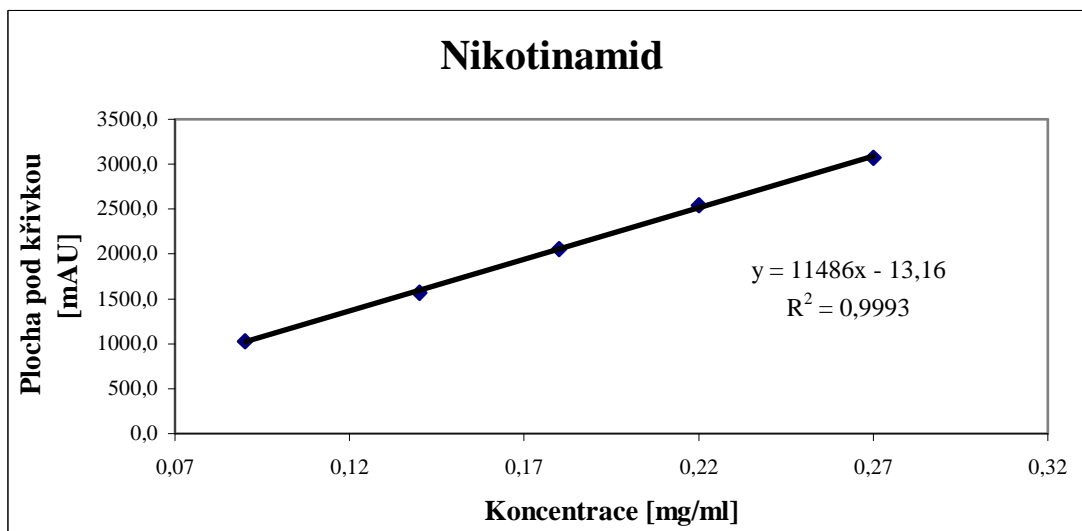


Obr. č. 12: Ověření kalibrační přímky – thiamin

5.2.3 Kalibrační přímka nikotinamidu:

Tabulka č. 5: Hodnoty kalibrační přímky pro nikotinamid

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Průměr
1	0,09	1029,8	1029,4	1029,2	1029,5
2	0,14	1575,0	1571,2	1564,9	1570,4
3	0,18	2154,3	2007,1	2005,5	2055,6
4	0,22	2548,8	2542,3	2539,0	2543,4
5	0,27	3073,6	3069,5	3075,7	3072,9

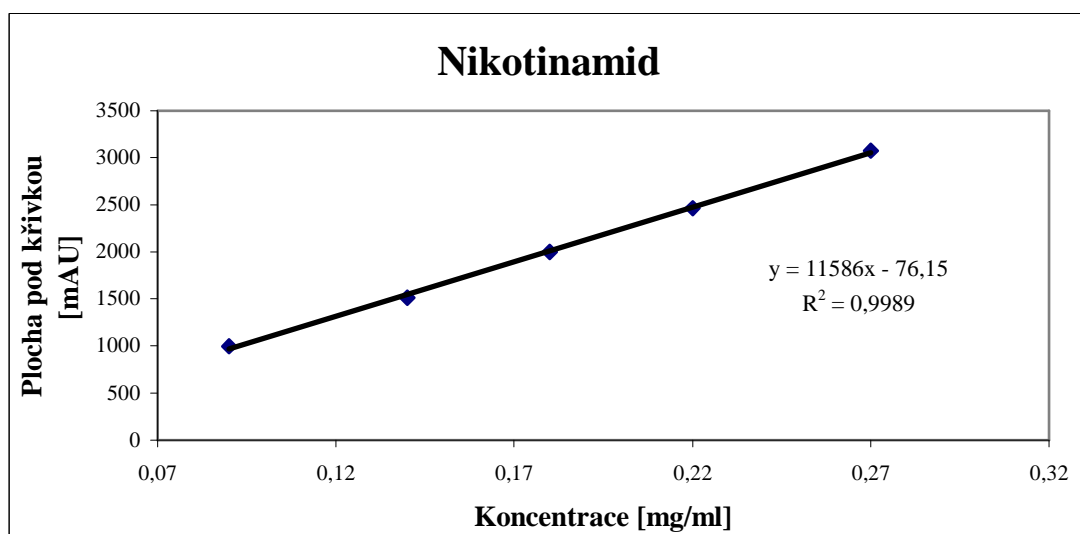


Obr. č. 13: Kalibrační přímka – nikotinamid

5.2.4 Ověření kalibrační přímky nikotinamidu

Tabulka č. 6: Ověření kalibrační přímky pro nikotinamid

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřík 1	Nástřík 2	Nástřík 3	Nástřík 4	Nástřík 5	Průměr
1	0,09	997,9	1000,5	998,5	997,6	1002,0	999,3
2	0,14	1510,3	1513,7	1512,0	1510,9	1509,8	1511,3
3	0,18	2025,7	2001,6	1990,1	1988,2	1987,4	1998,6
4	0,22	2463,9	2465,5	2457,3	2468,5	2465,8	2464,2
5	0,27	3065,3	3077,6	3082,0	3071,5	3069,8	3073,2

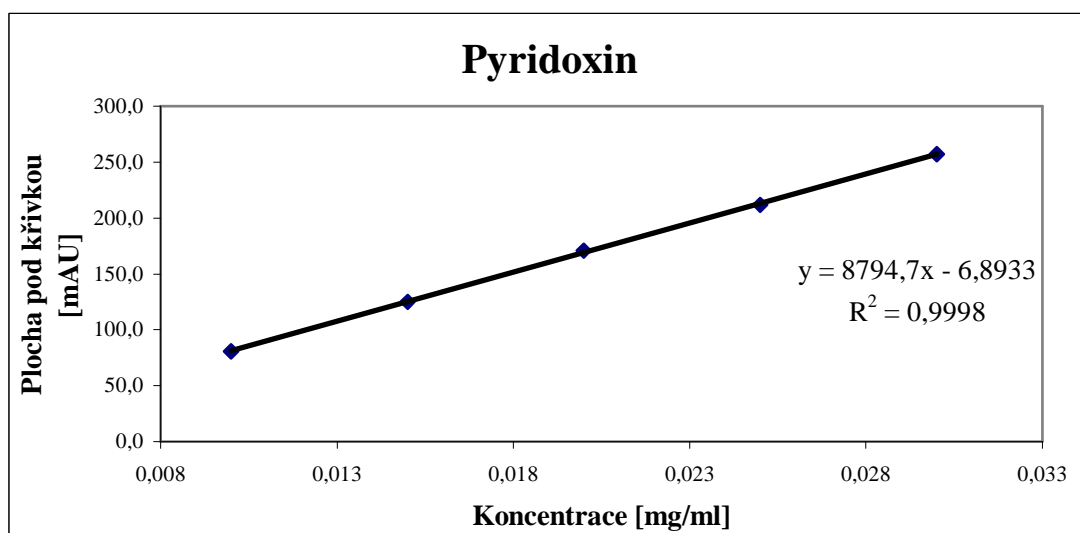


Obr. č. 14: Ověření kalibrační přímky – nikotinamid

5.2.5 Kalibrační přímka pyridoxinu:

Tabulka č. 7: Hodnoty kalibrační přímky pro pyridoxin

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Průměr
1	0,010	80,8	80,8	80,9	80,8
2	0,015	124,5	124,8	124,9	124,7
3	0,020	180,1	165,8	165,8	170,6
4	0,025	212,2	211,2	211,4	211,6
5	0,030	257,2	256,8	257,8	257,3

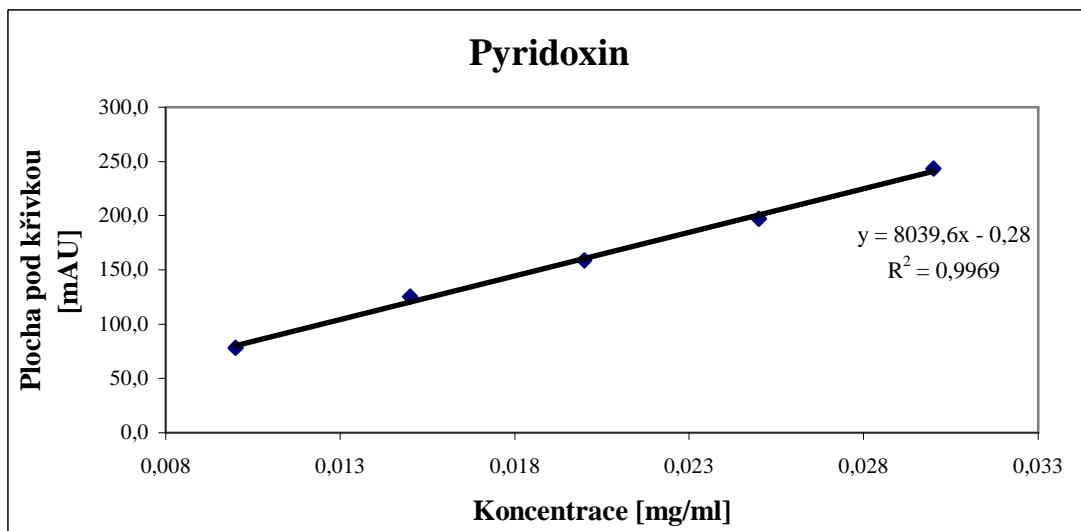


Obr. č. 15: Kalibrační přímka - pyridoxin

5.2.6 Ověření kalibrační přímky pyridoxinu

Tabulka č. 8: Ověření kalibrační přímky pro pyridoxin

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Nástřik 4	Nástřik 5	Průměr
1	0,010	78,5	78,4	78,2	77,9	77,8	78,2
2	0,015	125,6	125,5	125,0	125,1	125,3	125,3
3	0,020	160,5	158,3	158,5	158,3	158,1	158,7
4	0,025	197,1	197,2	197,3	197,2	196,8	197,1
5	0,030	242,9	243,5	243,4	243,1	243,3	243,2

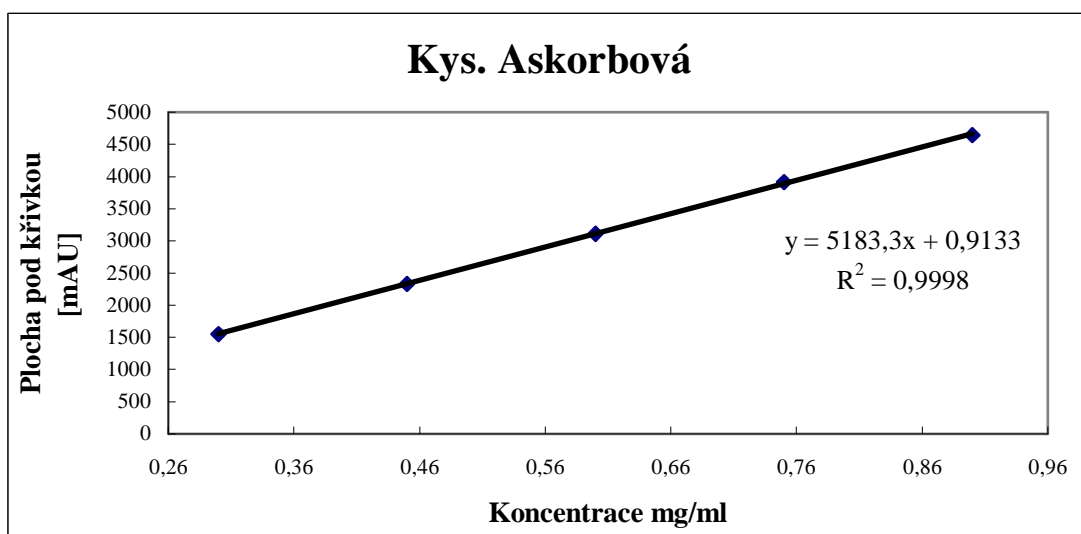


Obr. č. 16: Ověření kalibrační přímky – pyridoxin

5.2.7 Kalibrační přímka kys. askorbové:

Tabulka č. 9: Hodnoty kalibrační přímky pro kyselinu askorbovou

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Průměr
1	0,3	1564,0	1550,1	1546,5	1553,5
2	0,45	2330,8	2324,1	2325,0	2326,6
3	0,6	3272,7	3034,2	3028,3	3111,7
4	0,75	3920,0	3911,5	3917,5	3916,3
5	0,9	4646,8	4650,8	4640,8	4646,1

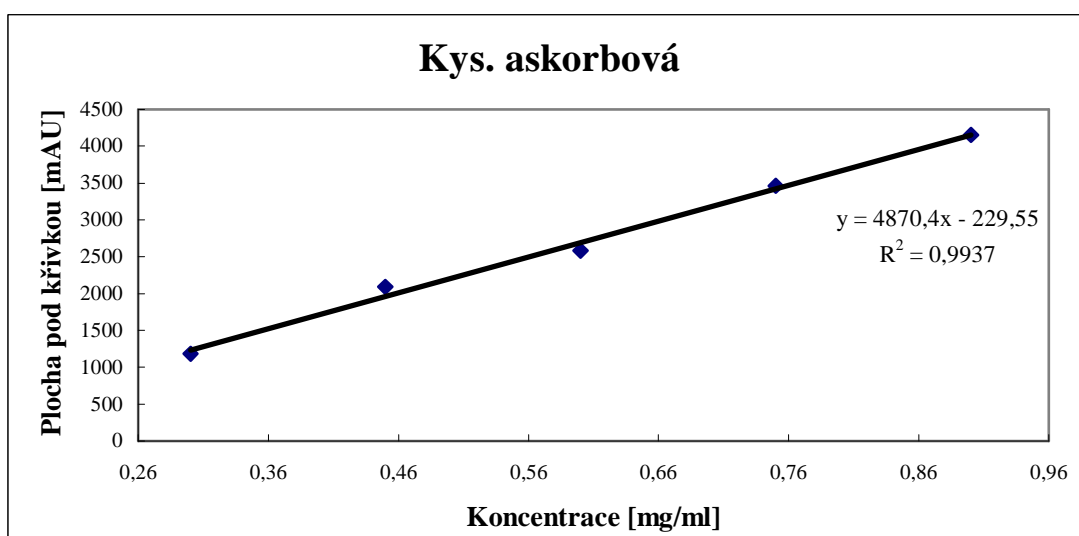


Obr. č. 17: Kalibrační přímka – kys. askorbová

5.2.8 Ověření kalibrační přímky kys. askorbové

Tabulka č. 10: Ověření kalibrační přímky pro kys. askorbovou

Vzorek č.	Koncentrace [mg/ml]	Nástřik 1	Nástřik 2	Nástřik 3	Nástřik 4	Nástřik 5	Průměr
1	0,30	1197,4	1195,6	1185,1	1170,7	1159,4	1181,6
2	0,45	2107,8	2103,9	2089,7	2083,3	2077,0	2092,3
3	0,60	2644,6	2591,2	2568,1	2553,5	2538,6	2579,2
4	0,75	3470,0	3465,0	3458,6	3455,3	3447,9	3459,3
5	0,90	4163,0	4169,6	4160,6	4137,5	4124,0	4150,9

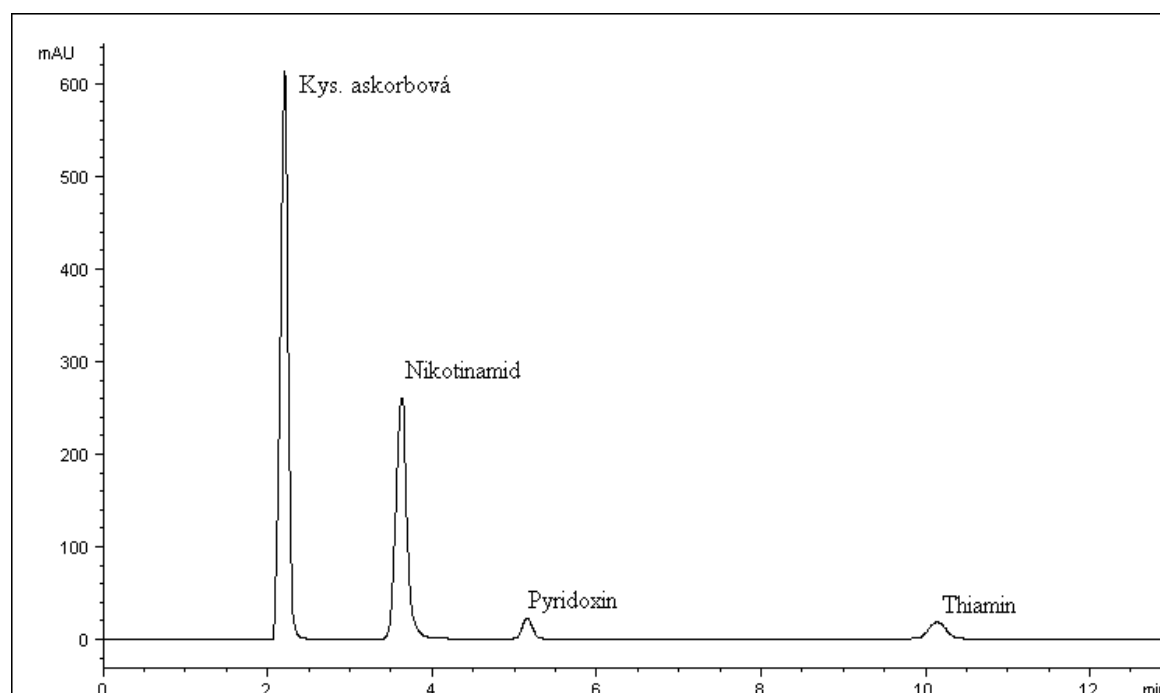


Obr. č. 18: Ověření kalibrační přímky – kys. askorbová

5.2.9 Příklad chromatogramu standardů vitamínů

Na obrázku číslo 19 je ukázka chromatogramu jednoho z nástřiků kalibrační přímkou standardů vitamínů. Koncentrace jednotlivých vitamínů byly:

kys. askorbová	0,6 mg/ml
nikotinamid	0,18 mg/ml
pyridoxin	0,02 mg/ml
thiamin	0,014 mg/ml



Obr. č. 19: Chromatogram nástřiku standardů vitamínů pro kalibrační přímkou

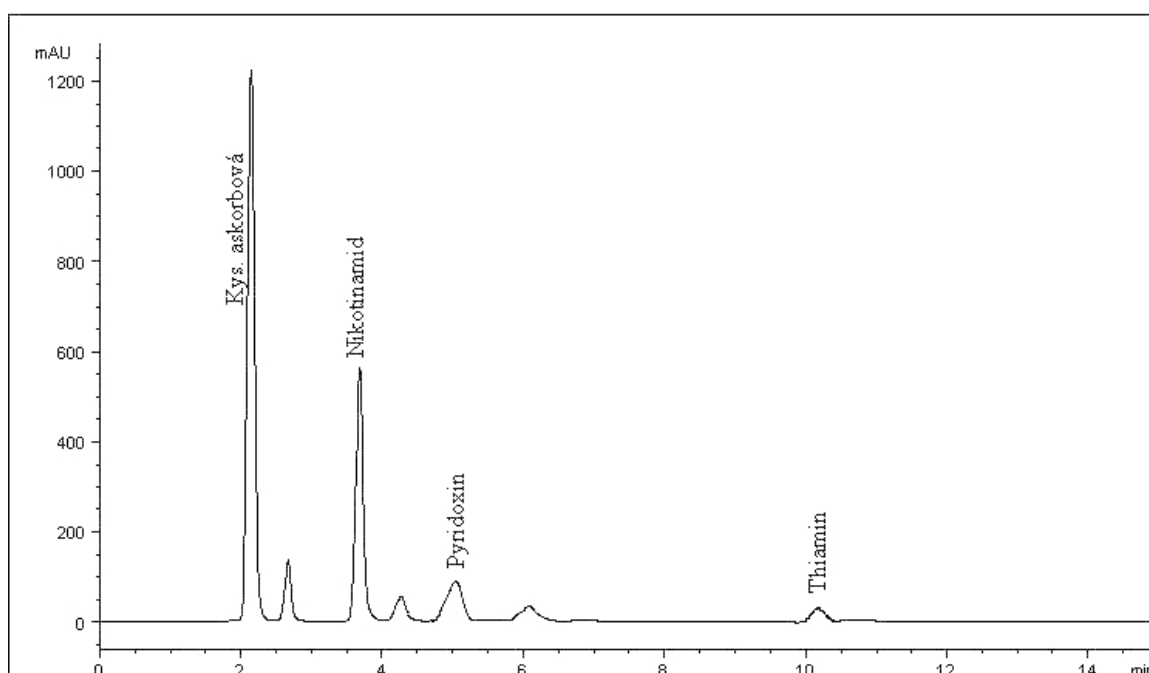
5.3 Výsledky HPLC analýzy multivitamínu

5.3.1 Tabulka výsledků jednotlivých měření multivitamínu

V následující tabulce jsou uvedeny zjištěné hodnoty ploch pod křivkou. Vzorek multivitamínu byl nastříknut šestkrát. Jednotlivé získané hodnoty ploch byly zprůměrovány a průměry hodnot jednotlivých vitamínů byly využity pro výpočet koncentrace v nástřiku, viz kap. 5.3.2.

Tabulka č. 11: Zjištěné plochy pod křivkou jednotlivých vitamínů v multivitaminovém preparátu

	Nástřík 1	Nástřík 2	Nástřík 3	Nástřík 4	Nástřík 5	Nástřík 6	Průměr
Thiamin:	75,1	79,2	80,0	78,3	79,5	78,4	78,3
Nikotinamid	2370,0	2352,1	2357,7	2353,5	2348,9	2347,3	2354,9
Pyridoxin	754,4	751,0	763,8	757,0	751,5	748,5	754,4
Kys. Askorbová	4664,0	4590,2	4566,1	4523,8	4505,4	4474,4	4554,0



Obr. č. 20: Chromatogram multivitaminového preparátu

5.3.2 Výpočet koncentrace vitamínů v analyzovaném preparátu

Podle rovnic kalibračních přímek byly vypočteny koncentrace jednotlivých vitamínů v nástřiku. V rovnicích přímek parametr y vyjadřuje plochu pod křivkou píku konkrétního vitamínu a za něj byl dosazen průměr hodnot ploch, získaný ze 6 nástřiků (viz tab. č. 11). Parametr x vyjadřuje koncentraci vitamínu v nástřiku.

Tabulka č. 12: Výpočet koncentrací jednotlivých vitamínů podle rovnic kalibračních přímk.

Vitamín	Stanovené množství [mg/ml]	Deklarované množství [mg/ml]
<i>Thiamin</i>	$y = 17138x - 5,4143$ $x = \mathbf{0,0049}$	0,014
<i>Nikotinamid</i>	$y = 11486x - 13,16$ $x = \mathbf{0,206}$	0,18
<i>Pyridoxin</i>	$y = 8794,7x - 6,8933$ $x = \mathbf{0,087}$	0,02
<i>Kyselina askorbová</i>	$y = 5183,3x + 0,9133$ $x = \mathbf{0,878}$	0,6

Z uvedených výsledků je patrné, že hodnoty koncentrací vitamínů v analyzovaném multivitaminovém preparátu se případ od případu liší od udávaných hodnot. Tyto odchylky velmi pravděpodobně nejsou způsobeny chybně naměřenými kalibračními přímkami, protože u použitých přímk vždy byla dosažena hodnota korelačního koeficientu v rozmezí $R^2 = 0,9993 - 0,9998$. Navíc bylo během měření zjištěno, že roztoky vitamínů jsou stabilní minimálně sedm dní, s výjimkou kyseliny askorbové, která se rozkládá již po dvou dnech. Proto byly vzorky vždy analyzovány v krátké době po přípravě.

Zjištěná koncentrace thiaminu je přibližně třikrát menší než udávaná hodnota.

Ostatní vitamíny vždy přesahují deklarované množství. Zjištěná koncentrace nikotinamidu je nejbližší deklarované hodnotě (odchylka je 14 %).

Zjištěná koncentrace pyridoxinu je v kontrastu s thiaminem třikrát větší než uváděná hodnota.

Zjištěná koncentrace kys. askorbové je téměř o 50% větší než uváděná hodnota.

Ze zjištěných hodnot je vidět, že udávané hodnoty koncentrací neodpovídají skutečnosti. V důsledku toho jsou některé vitamíny poddávkové (thiamin), jiné naopak doporučené denní dávky překračují (pyridoxin, kys. askorbová, nikotinamid). Nicméně metoda nebyla ještě validována, takže definitivní závěry bude možné udělat až po provedené validaci

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit vhodné chromatografické podmínky pro simultánní stanovení vitamínů B₁ (thiamin), B₃ (nikotinamid), B₆ (pyridoxin) a vitamínu C (kys. askorbová) pomocí HPLC v multivitaminových šumivých tabletách. A dále zjistit, jak se deklarované množství vitamínů liší od stanoveného.

Z mnoha testovaných kombinací chromatografických kolon a mobilních fází byly vybrány jako optimální tyto:

Chromatografická kolona 250 mm x 4 mm I.D. s náplní Lichrosphere 100 RP C18 (5 µm) firmy Merck, Německo.

Mobilní fáze: methanol : voda (pH 2,8 upraveno 10% CH₃COOH) + 0,005 mol/l sodné soli kyseliny hexansulfonové (SHS) + 0,1% triethylaminu (TEA); v poměru 20:80 (v/v).

Detekce byla provedena spektrofotometricky, vlnová délka 270 nm.

Tyto podmínky umožnily snadné stanovení koncentrace thiaminu, nikotinamidu, pyridoxinu a kys. askorbové ve vybraném šumivém multivitaminovém přípravku. Bylo zjištěno, že stanovené množství vitamínů v tomto přípravku se liší od množství deklarovaného výrobcem. Z časových důvodů již nebylo možno výsledky ověřit. Ověření výsledků bude provedeno při následné validaci metody.

7 SOUHRN

Analytické hodnocení léčiv s využitím chromatografických metod VI.

Diplomová práce

Kristýna Boudová

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Byla vypracována metoda pro simultánní stanovení vitamínů B₁ (thiamin), B₃ (nikotinamid), B₆ (pyridoxin) a vitamínu C (kys. askorbová) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v multivitaminových tabletách a dále použita pro stanovení těchto vitamínů v multivitaminovém šumivém přípravku, používaném jako potravinový doplněk. Získané výsledky byly porovnány s hodnotami deklarovanými výrobcem. Nejlepších výsledků bylo dosaženo použitím chromatografické kolony s náplní Lichrosphere 100 RP C18, 250 mm x 4 mm I.D. (5 µm) firmy Merck, Německo s mobilní fází methanol : voda (pH 2,8 upraveno 10% CH₃COOH) + 0,005 mol/l sodné soli kyseliny hexansulfonové + 0,1% triethylaminu) v poměru 20:80 (v/v). K detekci byl použit spektrofotometrický detektor s vlnovou délkou 270 nm. Průtoková rychlost byla 1 ml/min, čas analýzy nepřesahoval 13 minut. Látky byly eluovány v pořadí kys. askorbová, nikotinamid, pyridoxin, thiamin. Metoda bude následně validována.

8 SUMMARY

Analytical evaluation of drugs using chromatographic methods VI.

Diploma thesis

Kristýna Boudová

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,
Department of pharmaceutical chemistry and drug analysis.

There was worked out the method for simultaneous determination of vitamins B₁ (thiamine), B₃ (nicotinamide), B₆ (pyridoxine) a vitamin C (ascorbic acid) using high performance liquid chromatography in multivitamin tablets in this work. This method was used for determination of these vitamins in effervescent multivitamin substance used as food supplement. Acquired results were compared with value declared by the producer. Best results were reached by using chromatographic column Lichrosphere 100 RP C18, 250 mm x 4 mm I.D. (5 µm) Merck, Germany with mobile phase methanol : water (pH adjusted to 2,8 by acetic acid 10%) 0,005 mol/l sodium hexanesulfonic acid + 0,1% triethylamine) in proportion 20:80 (v/v). There was used spectrophotometric detector with wavelength 270 nm for detection. Flow rate was 1 ml/min, time of analysis didn't exceed 13 minutes. Substances were eluted in order: ascorbic acid, nicotinamide, pyridoxine and thiamine. The method will be validated.

9 LITERATURA

- 1) F. Renger, J. Kalous, Analytická chemie I., Univerzita Pardubice, Pardubice 1998
- 2) F. Vlášil, Úvod do dělicích metod. In: J. Zýka a kol., Analytická příručka Díl I., Nakladatelství technické vědecké literatury, Praha 1988
- 3) R. Karlíček a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2005
- 4) J. Klimeš a kol., Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2006
- 5) P. Klouda, Moderní analytické metody, Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003
- 6) O. Mikeš, Základní typy chromatografie. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- 7) Z. Holzbecher, J. Churáček, Analytická chemie, Nakladatelství technické literatury, Praha 1987
- 8) R. Komers, M. Krejčí, Plynová chromatografie. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- 9) J. Gasparič, J. Churáček, Papírová a tenkovrstvá chromatografie organických sloučenin, SNTL, Praha 1981
- 10) O. Motl, L. Novotný, Chromatografie na tenké vrstvě. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- 11) A. V. Kiselev, J. I. Jašin, Adsorpční plynová a kapalinová chromatografie, Nakladatelství technické literatury, Praha 1988
- 12) O. Motl, L. Novotný, Adsorpční a rozdělovací kolonová chromatografie, In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- 13) M. Hejtmánek, Kapalinová chromatografie. In: J. Zýka a kol., Analytická příručka Díl I., Nakladatelství technické vědecké literatury, Praha 1988
- 14) V. Tomášek, Gelová chromatografie. In: J. Zýka a kol., Analytická příručka Díl I., Nakladatelství technické vědecké literatury, Praha 1988
- 15) R. H. Reiner, A. Walch: Chromatografia 4, 578, 1971
- 16) C. R. Lowe, P. D. G. Dean: Affinity chromatography. Wiley - Interscience, New York 1974; český překlad Afinitní chromatografie, SNTL, Praha 1979
- 17) J. Turková, Afinitní chromatografie. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980

-
- 18) J. Klíma, J. Graffnetterová, Využití kapalinové a plynové chromatografie v klinické farmakologii. In: Pokroky ve farmacii 7, Avicenum, Praha 1987
- 19) B. Meloun, Automatizace a mechanizace kolonových operací v kapalinové chromatografii. In: Mikeš O. a kol.: Laboratorní chromatografické metody, Nakladatelství technické literatury, Praha 1980
- 20) J. Churáček, P. Jandera, Úvod do vysokoúčinné kapalinové chromatografie, SNTL, Praha 1984
- 21) V. Polová, Rigorózní práce, Hradec Králové, 2005
- 22) P. Jandera, Pokroky ve vývoji kolon pro HPLC – současný stav a perspektivy, Vitamin 2003, Pardubice, Česká republika
- 23) F. Švec, Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií, Chem. listy 103, 266-270, 2009
- 24) J. Klimeš a kol. , Kontrola léčiv II., Karolinum, Praha 2007
- 25) S. Silbernagl, Atlas fyziologie člověka, Grada, Praha 2004
- 26) N. Gaier, Vitaminy a látky užívané lokálně In: D. Lincová, H. Farghali a kol., Základní a aplikovaná farmakologie, Grada, Praha 2007
- 27) M. Ledvina, A. Stoklasová, J. Cerman, Biochemie pro studující medicíny II.díl, Karolinum, Praha 2006
- 28) K. Waisser, K. Palát, Jr.: Bioorganická chemie, Karolinum, Praha 2001
- 29) Český lékopis 2009(ČL 2009), Grada, Praha 2009
- 30) L. Ducháček, J. Lamka, Veterinární vademecum pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2006
- 31) J. Lamka, L. Ducháček, Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Karolinum, Praha 2006
- 32) C. K. Markopoulou, K. A. Kagkadis, J. E. Koundourellis, An optimized method for the simultaneous determination of vitamins B1, B6, B12, in multivitamin tablets by high performance liquid chromatography, J. Pharm. Biomed. Anal. 30, 1403-1410, 2002
- 33) B. Klejdus, J. Petřlová, D. Potěšil, V. Adam, R. Mikelová, J. Vacek, R. Kizek, V. Kubáň, Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection, Anal. Chem. Acta 520, 57-67, 2004
- 34) U. Höller, Ch. Brodhag, A. Knöbel, P. Hofmann, V. Spitzer, Automated determination of selected water-soluble vitamins in tablets using a bench-top robotic

-
- system coupled to reversed-phase (RP-18) HPLC with UV detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31, 151-158, 2002
- 35) V. M. Staroverov, V. I. Deineka, A. M. Grigor'ev, E. F. Prokhoda, M. V. Pokrovskii, V. V. Ivanov, HPLC analysis of water-soluble vitamins in the multivitamin syrup Oligovit, *Pharm. Chem.* 38, 54-56, 2004
- 36) L. A. Kozhanova, G. A. Fedorova, G. I. Baram, Determination of Water- and Fat-Soluble Vitamins in Multivitamin Preparations by High-Performance Liquid Chromatography, *J. Anal. Chem.* 57, 40-45, 2002
- 37) I. Almagro, M. P. San Andres, S. Vera, Determination of water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by reversed-phase high-performance liquid chromatography with a mobile phase containing sodium dodecylsulphate and n-propanol, *Chromatographia* 55, 185-188, 2002
- 38) Ke-Li, Simultaneous determination of nicotinamide, pyridoxine hydrochloride, thiamine mononitrate and riboflavin in multivitamin with minerals tablets by reversed-phase ion-pair high performance liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr.* 16, 504-507, 2002
- 39) R. Amidžić, J. Brboric, O. Čudina, S. Vladimirov, J. RP-HPLC determination of vitamins B₁, B₃, B₆, folic acid and B₁₂ in multivitamin tablets, *Serb. Chem. Soc.* 70, 1229-1235, 2005
- 40) L. Monteferrer-Pons, M. E. Capella-Peiró, M. Gill-Agustí, J. Esteve-Romero, Micellar liquid chromatography determination of B vitamins with direct injection and ultraviolet absorbance detection, *J. Chromatogr. A* 984, 223-231, 2003.
- 41) A. R. Ghorbani, F. Momenbeik, J. H. Khorasani, M. K. Amini, Simultaneous micellar liquid chromatographic analysis of seven water-soluble vitamins: optimization using super-modified simplex, *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 439-444, 2004
- 42) M. M. Delgado-Zamarreño, I. González-Maza, A. Sánchez-Pérez, R. Carabias-Martinez, Separation and simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins by electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A* 953, 257-262, 2002
- 43) F. R. P. Rocha, O. F. Filho, B. F. Reis, A multicommutated flow system for sequential spectrophotometric determination of hydrosoluble vitamins in pharmaceutical preparations, *Talanta* 59, 191-200, 2003

-
- 44) H. Zhu, H. Chen, Y. Zhou, A multicommutated flow system for sequential spectrophotometric determination of hydrosoluble vitamins in pharmaceutical preparations, *Anal. Sci.* 19, 289-294, 2003
- 45) J. G. Portela, A. C. S. Costa, L. S. G. Teixeira, Determination of Vitamin B6 in pharmaceutical formulations by flow injection-solid phase spectrophotometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34, 543-549, 2004
- 46) P. L. López-de-Alba, L. L.-Martínez, V. Cerdá, J. Amador-Hernández, Simultaneous Determination and Classification of Riboflavin, Thiamine, Nicotinamide and Pyridoxine in Pharmaceutical Formulations, by UV-Visible Spectrophotometry and Multivariate Analysis, *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 715-722, 2006
- 47) L. G. Shaidarova, L. N. Davletshina and G. K. Budnikov, Flow-Injection Determination of Water-Soluble Vitamins B1, B2, and B6 from the Electrocatalytic Response of a Graphite Electrode Modified with a Ruthenium(III) Hexacyanoruthenate(II) Film, *J. Anal. Chem.* 61, 502-509, 2006