

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



Vývoj extrakce a HPLC stanovení vitamínů A a D
v léčivém přípravku Infadolan

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce : PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Tereza Košvancová

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

V Hradci Králové dne

.....

Tereza Košvancová

Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc, připomínky a cenné rady při vypracování diplomové práce a Mgr. Petře Koblkové za trpělivost, ochotu, pomoc a rady, kterými mě zásobovala při tvorbě této práce.

Také bych chtěla poděkovat své rodině a všem blízkým, kteří mi vytrvale pomáhali a podporovali mě v průběhu celého mého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Název diplomové práce:

Vývoj extrakce a HPLC stanovení vitamínů A a D v léčivém přípravku Infadolan

Tereza Košvancová

Školitel : PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Byly nalezeny vhodné chromatografické podmínky pro stanovení obsahu vitamínů A a D v masti Infadolan[®] za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Optimálních výsledků bylo dosaženo na analytické koloně Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm) s předkolonou (5 x 4,6 mm). Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril : methanol : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v) při průtokové rychlosti 2 ml/min, nastříkovaném objemu 20 μ l, izokratickém režimu a laboratorní teplotě. K detekci byl použit UV detektor s vlnovými délkami 265 a 290 nm. Vnitřním standardem se stal vitamín E acetát. Látky byly eluovány v pořadí: vitamín A acetát, vitamín D a vitamín E acetát.

Během hledání vhodných extrakčních činidel pro vývoj metody byla vyzkoušena extrakční schopnost mnoha základních analytických rozpouštědel. Látky s nejvhodnějšími vlastnostmi byly použity v pěti víceetapových extrakcích. Získané výsledky byly porovnány a navržen další postup.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Title of graduation theses:

Development of extraction and HPLC determination of vitamins A and D in pharmaceutical formulation Infadolan

Tereza Košvancová

Supervisor : PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

The High Performance Liquid Chromatography conditions for the determination of vitamins A and D in ointment Infadolan[®] were found.

The analytical column Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm) with guard column (5 x 4,6 mm) was used for achievement of optimal results. A mobile phase composed of acetonitrile : methanol : water in ratio 49 : 49 : 2 (v/v/v), the flow-rate 2 ml/min, the sample volume 20 µl, the isocratic mode and laboratory temperature were chosen. The UV detection was set at 265 and 290 nm. Vitamin E acetate was used as an internal standard. Substance were eluted in the following order: vitamin A acetate, vitamin D and vitamin E acetate.

During the search for suitable extraction agents for the development of an extraction method the ability of many basic analytical solvents was tested. Agents with the most suitable properties were used in five multi-stage extractions. Achieved results were compared and next procedure was proposed.

1. OBSAH

1.	OBSAH	6
2.	SEZNAM ZKRATEK	9
3.	CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE	10
4.	TEORETICKÁ ČÁST	11
4.1	Mast Infadolan®	11
4.1.1	Charakteristika masti Infadolan®	11
4.1.2	Vitamín A	12
4.1.3	Ergokalciferol	12
4.2	Výskyt vitamínů A,D a E a jejich možnosti stanovení	14
4.3	Chromatografie	16
4.3.1	Obecný princip chromatografie	16
4.3.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	18
4.3.2.1	Princip metody	18
4.3.2.2	Kvalitativní a kvantitativní stanovení	19
4.3.2.3	Vhodnost chromatografického systému	20
4.3.2.4	Kapalinový chromatograf	21
4.3.2.5	Chromatografické kolony	22
4.3.2.5.1	Kolony Chromolith®	23
4.3.2.5.2	Kolona Onyx Monolithic	24
4.3.2.5.3	Kolony Gemini	25
4.3.2.5.4	Kolona X-bridge Shield	25
4.3.2.5.5	Regenerace analytické kolony	26
4.3.2.6	Předkolona a pre-filtr	27
4.3.2.7	Detektory	27
4.3.2.7.1	UV-VIS spektrofotometrické detektory	28
4.3.2.7.2	Fluorescenční detektory	29
4.3.2.7.3	Elektrochemické detektory	29
4.3.2.7.4	Vodivostní detektory	30
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
5.1	Použité chemikálie	31
5.2	Použité přístroje a zařízení	32
5.2.1	Chromatografické kolony	32
5.2.2	Přístroje a zařízení	32

5.3	Příprava roztoků	33
5.3.1	Zásobní roztoky	33
5.3.2	Pracovní roztok standardů	33
5.4	Optimalizace chromatografické metody	34
5.4.1	Určení vlnové délky detekce.....	34
5.4.2	Výběr mobilní fáze a její průtokové rychlosti	34
5.4.3	Testování analytické kolony	35
5.5	Extrakce vitamínů ze vzorku	36
5.5.1	Jednostupňová extrakce	36
5.5.2	Vícestupňová extrakce.....	36
5.5.2.1	Vložené vymražování	36
5.5.2.2	Postupná extrakce hexanem a methanolem	36
5.5.2.3	Extrakce směsí hexanu a methanolu/chloroformu.....	36
5.5.2.4	Postupná extrakce hexanem a methanolem/acetonitrilem	37
5.5.2.5	Extrakce methanolem	37
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
6.1	Optimalizace chromatografické metody	38
6.1.1	Vlnová délka pro detekci	38
6.1.2	Stacionární fáze.....	38
6.1.2.1	Chromolith Flash RP-18e (25 x 4,6 mm)	39
6.1.2.2	Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm)	40
6.1.2.3	X-bridge Shield RP-18 (50 x 3 mm; 2,5 μm)	41
6.1.2.4	Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm)	42
6.1.2.5	Gemini 3μ C18 110A (50 x 3,0 mm; 3 μm)	43
6.1.2.6	Gemini 3μ C18 110A (30 x 2,0 mm; 3 μm)	44
6.1.3	Mobilní fáze a průtoková rychlost.....	45
6.1.4	Souhrn vybraných optimálních chromatografických podmínek.....	45
6.2	Extrakce vitamínů ze vzorku	46
6.2.1	Jednostupňová extrakce	46
6.2.1.1	15-ti minutová ultrazvuková láze	46
6.2.1.2	35-ti minutová ultrazvuková láze	48
6.2.2	Vícestupňová extrakce.....	49
6.2.2.1	Vložené vymražování	49
6.2.2.2	Postupná extrakce hexanem a methanolem	50
6.2.2.3	Extrakce směsí hexanu a methanolu/chloroformu.....	51
6.2.2.4	Postupná extrakce hexanem a methanolem/acetonitrilem	51
6.2.2.5	Extrakce methanolem	53
6.2.3	Souhrn výsledků extrakcí.....	54

7. SOUHRN	55
7.1 Optimalizace chromatografických podmínek.....	55
7.2 Extrakce vitamínů ze vzorku	57
7.2.1 Jednostupňová extrakce	57
7.2.2 Vícestupňová extrakce.....	57
8. ZÁVĚR	59
9. POUŽITÁ LITERATURA.....	60

2. SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
BEH	Etylenový hybridní most (Bridge Ethylen Hybrid)
CHCl ₃	Chloroform
ČL	Český lékopis
DAD	Detektor diodového pole (Diode-Array Detektor)
EtOH	Ethanol
H ₂ O	Voda
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spektrometry)
TFA	Kyselina trifluoroctová
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultrafialové spektrum (Ultra-Violet)
VIS	Viditelné spektrum (Visible)

3. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Jedním z nejdůležitějších cílů farmacie je zajistit pacientovi kvalitní, bezpečný a účinný lék v potřebném množství a v požadovaný čas. Hodnocení bezpečnosti a účinnosti léku případně léčivého přípravku je prováděno různými analytickými metodami, z nichž vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří k nejpoužívanějším.

Mast Infadolan® je volně prodejný léčivý přípravek pro zevní použití, vhodný k urychlení obnovy pokožky neinfikovaných drobných ranek, oděrek nebo popálenin od slunce. Obsahuje vitamín A a D jako své účinné složky v masťovém základu.

Cílem této diplomové práce je nalézt optimální chromatografické podmínky pro stanovení vitamínů obsažených ve výše zmíněné masti za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Druhým cílem je vyvinout vhodnou extrakční metodu, optimálně náročnou na čas, podmínky, množství extrakčních činidel a samotný postup.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 Mast Infadolan[®]

4.1.1 Charakteristika masti Infadolan[®]

Infadolan[®] se používá jako dermatologikum. Je to mast pro zevní použití vhodná k urychlení obnovy pokožky na postiženém místě. Používá se u dětí od novorozeneckého věku i u dospělých na neinfikované drobné ranky, oděrky, popáleniny 1. stupně, na suchou popraskanou pokožku. Na doporučení lékaře je možné tuto mast použít i při léčbě bércových vředů, proleženin a u pacientů s atopickou dermatidou.

Jde o přípravek s obsahem vitamínů A a D₂ v bezvodém masťovém základu. Oba vitamíny jsou rozpustné v tucích. Retinol usměrňuje růst a stavbu epitelových tkání, zabraňuje metaplazii a hyperkeratóze epidermis a epitelových buněk mazových žláz. Zvyšuje rezistenci kůže a sliznic proti infekci. Při lokálním podání se nevstřebává. Ergocalciferol spolu s retinolem stimuluje epitelizaci kůže.

Nežádoucí účinky přípravku jsou vzácné, ojediněle může dojít k přecitlivělosti na složku masti.

Přípravek je jednofázová světle žlutá mast máslovité konzistence. Je balen po 30 g a 100 g v aluminiové tubě s plastovým uzávěrem, uložen v papírové skládačce. Je volně prodejný [1].

Kompletní složení přípravku Infadolan[®] v 30 g: [1]

Retinoli acetat 48 000 m.j. (0,031995 g)

Ergocalciferolum 9000 m.j. (0,000225 g)

Bílý vosk

Tuk z ovčí vlny

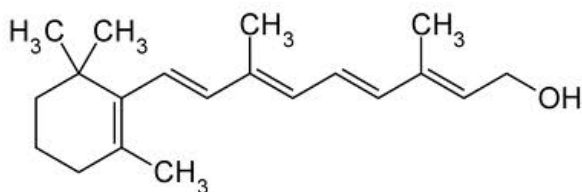
Bílá vazelína

4.1.2 Vitamín A

Vitamín A (retinol) patří do skupiny vitamínů rozpustných v tucích. Je to výchozí látka pro zrakový purpur, bez kterého by se ne vytvořil rodopsin – fotoreceptor. Potřebují ho také epitelální buňky pro normální růst a funkci. Současně je nezbytný pro tvorbu spermií a vajíček a pro vývoj plodu. Nedostatek vitamínu způsobuje poruchy vidění a poškozuje epitel tkání, kde probíhá dělení buněk. K časným příznakům tohoto nedostatku patří ztráta chuti, zastavení růstu, porucha obranyschopnosti a šeroslepost. Dále dochází k vysychání sliznic a poškození rohovky. Při hlubším nedostatku dochází k poruše tvorby kostí a poruchám v nervovém systému [2].

Syntetický ester vitamínu A (acetát) použitý pro přípravu zásobního roztoku v této diplomové práci má formu světle žlutých krystalů, je nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v ethanolu a mísitelný s organickými rozpouštědly. Je velmi citlivý na světlo teplo a vzdušnou oxidaci [15].

Chemická struktura vitamínu A je uvedena na Obr. 1.



Obr. 1 : Chemická struktura retinolu

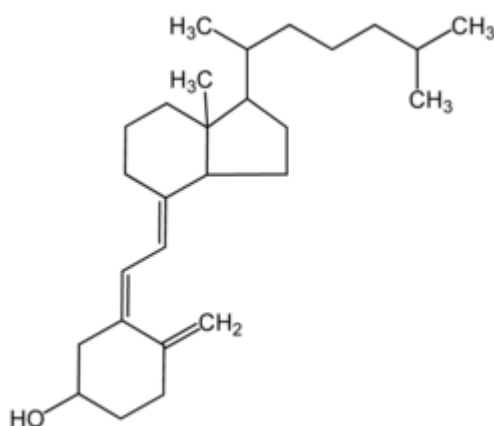
4.1.3 Ergokalciferol

Označení vitamín D zahrnuje několik typů vitamínů rozpustných v tucích. Pro člověka je nejdůležitější cholekalciferol (vitamín D₃), který je odvozen od cholesterolu. Ergokalciferol je vitamín D₂, který vzniká UV-ozářením ergosterolu obsaženého v kvasinkách a plísních [2].

Látky, které se vytváří z vitamínů D mají hormonální povahu, proto jsou vitamíny D považovány za takzvané prohormony.

Ergokalciferol se v játrech převede na svou aktivní formu, která zajišťuje vychytávání vápníku a fosforu z potravy, podporuje jejich vstřebávání ve střevě, a tím stavbu kostí. Jeho úkolem je také zpětné odbourání těchto minerálů v ledvinách. Dále reguluje látkovou výměnu minerálních solí. Využívá se při léčbě poruchy příštítných tělísek. V dostatečné míře pomáhá předcházet vzniku osteoporózy ve stáří. Působí proti ekzémům, kloubnímu revmatismu, podporuje zrak, pomáhá předcházet akné, stimuluje kožní epitel.

Ergokalciferol použitý pro přípravu zásobního roztoku vitamínu D je bílý krystalický prášek, nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v ethanolu a dobře rozpustný v mastných olejích. Na vzduchu se vlivem tepla a světla pomalu rozkládá [15]. Chemická struktura je uvedena na Obr. 2.



Obr. 2 : Chemická struktura ergokalciferolu

4.2 Výskyt vitamínů A, D a E a jejich možnosti stanovení

Stanovování vitamínů rozpustných v tucích je nedílnou součástí farmaceutického, potravinářského či kosmetického průmyslu. Množství vitamínů A, D nebo E se nejčastěji stanovuje v mléce a mléčných produktech [19, 24], v mateřském mléce [23], v mase a dalších živočišných produktech [18], v dětské výživě [20], v ovoci a zelenině [22] nebo v plazmě [21].

Analyzovaný vzorek je vzhledem ke složitosti své matrice často nejdříve saponifikován (zmýdelněn). Tato operace je prováděna nejčastěji přidáním ethanolu následovaného hydroxidem draselným, zvýšením teploty a konečně třepáním. HPLC analýza trvá většinou 13 až 18 minut. K UV-VIS detektoru je často připojena ještě MS detekce. Následující tabulka (Tab. 1) představuje různé varianty extrakcí vitamínů a chromatografických podmínek analýzy.

Tab. 1 : Možnosti stanovení vitamínů A, D a E

Stanovené vitamíny	Extrakční činidla	Analytická kolona	Mobilní fáze	Chromatografické podmínky (průtok, režim, nástřik, λ, t)	Citace
A, E	-	Synergi C18 Hydro-RP (150 x 4,6mm; 4µm) předkolona (4 x 3mm)	A= MeOH : TFA (50 : 50) B= H ₂ O : TFA (50 : 50) A : B (80 : 20)	1 ml/min, izokratický režim, 5µm, 290 a 320nm, 30°C	[17]
A	saponifikace n-hexan	µPorasil (300 x 3,9mm; 10µm) předkolona (4 x 3mm)	n-hexan : THF: 2-propanol (98 : 1 : 1)	1 ml/min, izokratický režim, 75 µm, 265nm, 30°C	[18]
D	saponifikace methanol	Vydac TP 54 (250 x 4,6mm; 5 µm)	methanol : H ₂ O (93 : 7)	1 ml/min, izokratický režim, 75 µm, 265nm, 25°C	[18]
A, D, E	saponifikace diethylether	Spherisorb ODS-2 C18 (250 x 4,6mm; 5 µm)	methanol : H ₂ O (96 : 4)	1 ml/min, izokratický režim, 20 µm, 294 a 325nm, 25°C	[19]
A, D, E	saponifikace n-hexan	Nuclisol 100-5 (250 x 4,6mm; 5 µm)	hexan : dioxin : 2-propanol (96,7 : 3 : 0,3)	1,45 ml/min, izokratický režim, 40 µm, UV-DAD, 25°C	[20]
A, D, E	hexan, benzen	Alltech C18 RP (250 x 4,6mm; 5 µm)	MeOH : EtOH (85 : 25)	1 ml/min, izokratický režim, 20 µm, 245nm, 25°C	[21]
A, D, E	-	ProntoSIL C30 (250 x 4,6mm; 3 µm) předkolona (10 x 4mm)	A= MeOH B= isopropanol:hexan (50 : 50)	1 ml/min, gradientový režim, 20 µm, UV-DAD, 25°C	[22]
A, D, E	saponifikace hexan:diethylether (90:10)	Capcell Pak C18 UG 120 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	hexan : 2-propanol : MeOH (88 : 10 : 2)	0,4 ml/min, izokratický režim, 20 µm, 340nm, 35°C	[23]
A, D, E	saponifikace hexan, methanol	Hypersil C18 BDS (150 x 0,3mm; 3 µm)	A= MeOH : H ₂ O (99 : 1) B= MeOH : THF (70 : 30)	0,1 ml/min, gradientový režim, 5 µm, 264 a 325nm, 25°C	[24]

4.3 Chromatografie

4.3.1 Obecný princip chromatografie

Chromatografie je vysoce účinná separační metoda, která slouží k oddělení složek zkoušeného vzorku a současně k jejich kvalitativní a kvantitativní analýze.

V průběhu chromatografické analýzy se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, má schopnost různou měrou zachycovat jednotlivé složky vzorku. Mobilní fáze je pohyblivá a jejím tokem přes stacionární fázi jsou součásti vzorku unášeny soustavou. Konečná separace závisí na míře zadržení složek nepohyblivou fází [4].

Chromatografických metod je velké množství, proto je vhodné jejich rozdělení do skupin podle několika hledisek:

1. Podle skupenství mobilní fáze:

- a) Kapalinová chromatografie – mobilní fází je kapalina.
- b) Plynová chromatografie – mobilní fází je plyn.

2. Podle uspořádání stacionární fáze:

- a) Kolonová chromatografie – stacionární fáze je umístěna v trubici (koloně).
- b) Plošné techniky:

Papírová chromatografie – stacionární fází je chromatografický papír.

Tenkvrstevná chromatografie – stacionární fáze je umístěna na pevném plochém podkladu (např. skleněné desce, hliníkové fólii).

3. Podle povahy děje, který převládá při separaci

- a) Rozdělovací chromatografie – podstatou separačního procesu v kapalinové rozdělovací chromatografii je odlišná rozpustnost složek vzorku ve dvou vzájemně nemísitelných kapalinách, přičemž stacionární fáze je zakotvena na pevném nosiči.

V plynové rozdělovací chromatografii je podstatou separace rozdílná rozpustnost složek unášených nosným plynem, který představuje mobilní fázi, v kapalně stacionární fázi.

- b) Adsorpční chromatografie – podstatou separačního procesu je různá schopnost složek adsorbovat se na povrch stacionární fáze. Jako adsorbenty se nejčastěji používají zrnité materiály na bázi silikagelu, méně často na bázi oxidu hlinitého i jiných (aktivní uhlí, celulóza). Mobilní fázi u této chromatografie může být plyn nebo kapalina.
- c) Iontově-výměnná chromatografie – jedná se o kapalinovou chromatografii, při které je stacionární fázi měnič iontů s vhodnými funkčními skupinami kyselé (katexy) nebo zásadité (anexy) povahy. Podstatou separace je odlišná afinita separovaných látek k iontovýměnným skupinám fáze. Přitom se uplatňují elektrostatické přitažlivé síly. Rozdílná afinita je dána velikostí náboje a iontů.
- d) Gelová chromatografie – u této kapalinové chromatografie jsou látky separovány podle velikosti svých molekul. Analyzovaná látka je unášena mobilní fázi přes kolonu naplněnou porézním materiálem (gel), molekuly látky jsou zdržovány v důsledku své permeace do definovaných pórů stacionární fáze. Malé molekuly pronikají hlouběji, proto jsou zdržovány delší dobu. Větší molekuly pronikají jen do větších pórů a mají menší hodnoty retenčních objemů. Molekuly, které přesahují průměr pórů kolony prochází bez zdržení.
- e) Afinitní chromatografie – podstatou této separační metody je schopnost stacionární fáze vázat z analyzovaného vzorku určité složky, ke kterým má úzce selektivní vztah (afinitu).

4.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

4.3.2.1 Princip metody

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří k nejprogresivnějším analytickým metodikám, našla velké uplatnění ve všech oblastech analýzy látek.

Hlavními přednostmi této separační metody je možnost současného kvalitativního a kvantitativního hodnocení separovaných složek směsi, dále rychlost a citlivost stanovení v závislosti na použitém detektoru. Analýza potřebuje pouze minimální množství vzorku. Výhodná je taktéž možnost automatizace [5].

U této metody nastává dělení látek mezi stacionární fází nejčastěji zakotvenou na pevném nosiči uvnitř chromatografické kolony a mobilní fází, která je přes ni protlačována za vysokého tlaku. Při dělení látek ve vzorku lze využít všechny možné mechanismy separace – adsorpce, rozdělování na základě různé rozpustnosti, iontová výměna, molekulově síťový efekt gelu. Díky této možnosti lze nalézt účinný chromatografický systém k oddělení směsí prakticky všech organických látek rozpustných ve vodě, zředěných kyselinách nebo organických rozpouštědlech [4].

Z hlediska použitých fází se dá HPLC rozdělit na techniku s „normální“ fází a s reverzní neboli obrácenou fází. U chromatografie s normální fází se jako stacionární fáze používají látky s polární povahou (silikagel, aminopropyl, dioly, atd.) Jako mobilní fáze se využívají méně polární látky (hexan, ethylether, chloroform). Tato chromatografie je vhodná pro separaci polárních sloučenin. Používanější je metodika s reverzní fází, která využívá jako stacionární fáze nepolární látky navázané na nosič (často silikagel). Jako organické funkční skupiny jsou velmi často používány uhlíkaté řetězce C 8 a C 18. Mobilní fáze jsou polárnější, obvykle organická rozpouštědla (methanol, acetonitril,...) s přídavkem vody [9].

HPLC je také možno rozdělit podle typu použité eluce, která může probíhat izokraticky nebo gradientově. Izokratická eluce je charakteristická neměnným složením mobilní fáze po celou dobu analýzy. S přibývajícím množstvím různě polárních analyzovaných látek se úměrně prodlužuje i doba analýzy [10]. Pro zkrácení této doby je možno zvolit eluci gradientovou, při které je použito více mobilních fází se vzrůstající eluční silou. Postupnou změnou fází jsou z kolony v přijatelném čase

eluovány i látky s vysokou afinitou ke stacionární fázi, jejichž eluce by jinak trvala neúměrně déle [11].

4.3.2.2 Kvalitativní a kvantitativní stanovení

Základní kvalitativní charakteristikou je retenční (eluční) čas t_R , čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Nejčastějším důkazem totožnosti je shoda retenčních časů chromatografického píku léčiva v analyzovaném vzorku s retenčním časem píku standardu.

Kvantitativní charakteristikou látek v HPLC je plocha (eventuálně výška) chromatografického píku [5]. Nepřesné určení plochy/výšky píku je nejčastějším zdrojem chyb při zpracování chromatografických dat. Platí, že metoda, která byla použita pro vyhodnocení standardu musí být použita i pro vyhodnocení stanovované látky. Plochy resp. výšky píku lze nejpřesněji určit pomocí digitálních integrátorů nebo pomocí software pro vyhodnocení chromatografických dat. Nejčastějšími metodami vyhodnocování jsou metoda vnějšího standardu, metoda standardního přídatku, metoda vnitřního standardu a metoda vnitřní normalizace.

V této diplomové práci byla použita metoda vnitřního standardu. Přednost této techniky je v tom, že se celá analýza uskuteční v jediném nástřiku a dávkovaný objem vzorku není třeba přesně odměřovat. Princip metody je dán tím, že se naředí vzorek standardem, přičemž původní koncentrace standardu musí být známá. Postup vypadá takto: ke vzorku o určitém objemu V_i a neznámé koncentraci c_i přidáme předem definovaný objem standardu V_s o známé koncentraci c_s . Látky se musí dobře separovat a standard by se měl eluovat v blízkosti stanovované látky. Získaná směs se nadávkuje a vyhodnotí se plochy standardu A_s a stanovované látky A_i . Pak pro koncentraci vzorku platí:

$$c_i = R_{IS} \frac{V_s}{V_i} \cdot \frac{A_i}{A_s} \cdot c_s$$

kde R_{IS} je relativní odezva detektoru stanovované látky vůči vnitřnímu standardu [13].

4.3.2.3 Vhodnost chromatografického systému

Při výběru vhodných chromatografických podmínek pro hledanou metodu byly v chromatogramu sledovány především dvě kritéria: faktor symetrie píku a rozlišení píků.

Faktor symetrie píku (A_s) nebo také faktor chvostování píku se vypočítá ze vzorce:

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

kde $w_{0,05}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky, d je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky. Hodnota faktoru má být dle ČL 2009, doplňku 2010 mezi 0,8 a 1,5, přičemž hodnota 1,0 značí úplnou symetrii píku [15].

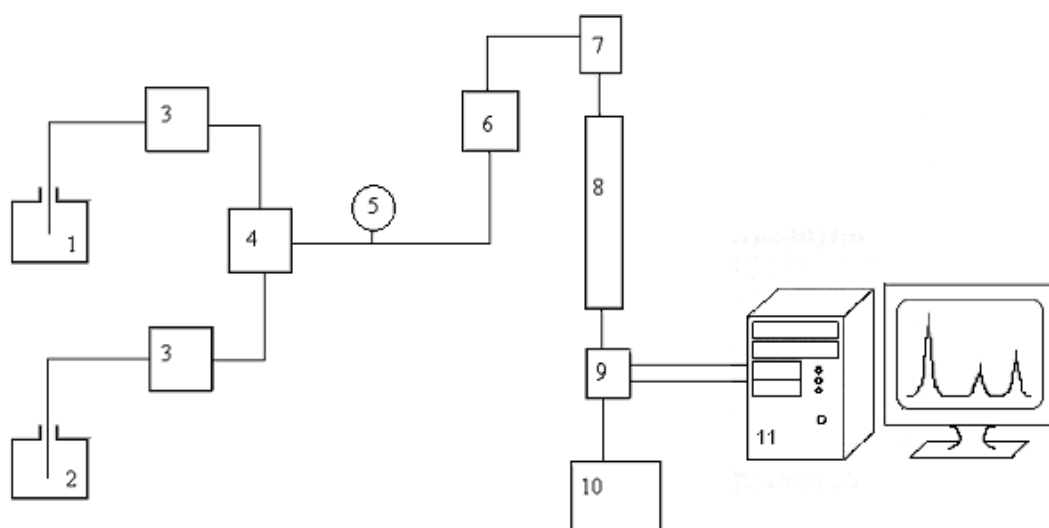
Rozlišení (R_s) mezi píky dvou složek se může vypočítat podle vzorce :

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

kde $t_{R2} > t_{R1}$ a jsou to retenční časy nebo vzdálenosti podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmicím spuštěným z vrcholů dvou sousedních píků, w_{h1} a w_{h2} jsou šířky píků v poloviční výšce. Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii [15].

4.3.2.4 Kapalinový chromatograf

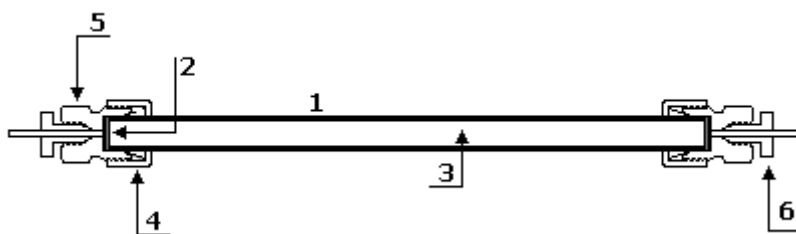
Základní části kapalinového chromatografu jsou uvedeny na schématu (Obr. 3). Ze zásobníků je mobilní fáze čerpána přes filtr vysokotlakým čerpadlem, které je schopné vyvíjet tlak až 40 MPa. Vysoký tlak je nezbytný vzhledem k náplni kolon a ke značné viskozitě kapalné mobilní fáze (v porovnání s plyny). Tato skutečnost klade vysoké nároky na kvalitu a výkonnost čerpadla, na těsnost a pevnost všech spojů i samotných kolon. Zabezpečení plynulosti toku MF je důležité pro detekci (zamezení "šumu" v odezvě detektoru). Tlak je kontrolován manometrem. Na vstupu kolony je umístěn dávkovač vzorku. K nástřiku vzorku se používá automatický dávkovač (autosampler). Vzorek je spolu s mobilní fází unášen přes kolonu, kde je separován. Separované části vzorku jsou detekovány, signál z detektoru je vyhodnocován počítačem s potřebným softwarem [4].



Obr. 3 : Schéma kapalinového chromatografu : 1,2 - zásobníky mobilní fáze; 3 - vysokotlaké čerpadlo; 4 - směšovač; 5 - manometr; 6 - dávkovací zařízení; 7 - předkolona; 8 - kolona; 9 - detektor; 10 - sběrač frakcí; 11 - počítač s chromatografickým softwarem [4]

4.3.2.5 Chromatografické kolony

Kolony pro vysokoučinnou kapalinovou chromatografii jsou především kovové, dlouhé 5 – 30 cm, s vnitřním průměrem 2 – 8 mm a konstruované tak, aby odolaly vysokým tlakům i chemickému působení mobilní fáze či separovaných látek. S rostoucí délkou analytické kolony se zvyšuje účinnost separace, ale i doba analýzy. Náplň kolony musí být rovnoměrná, proto se k analýze používají především kolony testované samotným výrobcem. Separace jsou založeny na povrchových interakcích sorbentu a analytu. Záleží při nich na typech interakčních míst [4].



Obr. 4 : Schéma chromatografické kolony : 1 - kovový plášť; 2 - porézní kovová frit; 3 - stacionární fáze; 4 - ochranný převlečený kroužek; 5 - koncová hlavice; 6 - vstup pro kapiláru se šroubem [13]

V moderní kapalinové chromatografii je trendem miniaturizace kolon a vývoj nových sorbentů pro separaci. Používány jsou především malé rigidní porézní částice nebo monolity s velkou plochou povrchu. Zmenšováním velikosti částic a průměru kolony se snižuje spotřeba a objem odpadu rozpouštědel, stacionární fáze i vzorku.

Využití systémů s normálními fázemi bylo v průběhu vývoje chromatografie spíše potlačeno, především kvůli širší využitelnosti a větší robustnosti reverzních fází. Hlavním problémem těchto fází byla vysoká povrchová aktivita a kyselost silikagelu. Tato látka je rozpustná při pH vyšším než 8 – 9 a je hydrolyzována na povrchově vázaných skupinách při pH nižším než 3, což způsobovalo deaktivaci povrchu nebo ireverzibilní interakce se silně bazickými analyty. Navíc působením vyšších teplot je silikagel degradován [4].

Povrch silikagelu může být částečně chráněn navázáním určitých chemických skupin. Tímto způsobem fáze zůstává polární a zároveň jsou chráněny silanolové skupiny. Výhodou takových materiálů je snadnější ustálení rovnováhy na koloně [6].

Pokrokem v analýze bylo zavedení monolitických kolon do praxe. Na rozdíl od stacionárních fází, které se skládají z jednotlivých částic sorbentu o definované velikosti, monolitické kolony tvoří jediný kus pórovitého materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Klasické 3-5 μm částicové kolony vykazují dobrou separační účinnost, ale s klesající velikostí sorbentu stoupá zpětný tlak, takže maximální rychlost průtoku je omezená. Z tohoto důvodu je omezená také rychlost analýzy a délka kolony. Navíc při dalším zmenšování velikosti částic vysoký zpětný tlak kolony podstatně snižuje její životnost.

Největší výhodou monolitických kolon jsou jejich hydrodynamické vlastnosti. Mají dva typy pórů - velké póry (makropóry), zajišťující rychlý tok mobilní fáze skrz monolit a významně zrychlující přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází, a středně velké póry (mesopóry) poskytují monolitu dostatečně velký povrch pro vysokou separační kapacitu. Tato struktura umožňuje používání monolitů při značně vysokých rychlostech průtoku mobilních fází bez přílišného zvýšení tlaku a zároveň bez ztráty separační účinnosti, a to i pro separované makromolekuly [7].

4.3.2.5.1 *Kolony Chromolith®*

Vnitřním sorbentem těchto analytických kolon je tyčinka velmi čistého monolitického oxidu křemičitého se strukturou bimodálních pórů. Její makropóry podstatně snižují zpětný tlak kolony, čímž umožňují vyšší průtok a potřebné zkrácení trvání analýzy. Mesopóry pak tvoří velký aktivní povrch pro separaci. Kolony jsou také odolnější vůči ucpání i v případě biologických vzorků [8].

V průběhu testování vhodných chromatografických podmínek pro hledanou metodu byly zkoušeny dvě kolony patřící do této skupiny - Chromolith Flash RP-18e (25 x 4,6 mm) a Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm).

První jmenovaná kolona je typickým zástupcem monolitických kolon spadajících pod technologii Merck Chromolith®. Druhá zmíněná analytická kolona patří k inovacím této technologie. Vzhledem k menšímu vnitřnímu průměru analýza trvá

kratší dobu a má ještě nižší zpětný tlak, čímž se stává výkonnější než dříve zmíněná kolona. Separační účinnost kolony je však stejná [8].



Obr. 5 : Kolony Chromolith [8]

4.3.2.5.2 *Kolona Onyx Monolithic*

Kolona Onyx Monolithic od společnosti Phenomenex byla vyrobena na základě licence firmy Merck, takže její podstata je stejná jako u kolon Chromolith.

Během testování optimálních chromatografických podmínek byla zkoušena Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm), což je také monolitická HPLC kolona s velmi porézním silikagelem s bimodální strukturou póru. Makropóry o průměru přibližně 2 μm tvoří prostorovou síť, mezopóry vytváří vnitřní porézní strukturu pro separaci [9].



Obr. 6 : Kolona Onyx Monolithic [9]

4.3.2.5.3 *Kolony Gemini*

Hledání vhodného nosiče, který by spojoval dělicí účinnost silikagelu s chemickou inertností a stabilitou polymerů vedlo k mnoha různým řešením. Jedním z pokusů o takový nosič je Twin technologie společnosti Phenomenex, která se pokouší kombinovat vlastnosti silikagelu a polymerních nosičů jako jsou: flexibilita pH, reprodukovatelný výkon, prodloužená životnost kolon nebo stabilita při použití mobilních fází s vysokým obsahem vody.

Materiály na bázi silikagelu vynikají svou účinností, ale jsou schopny pracovat pouze v omezeném rozsahu pH. Naopak polymery jsou stabilní v širokém rozmezí pH na úkor účinnosti separace. Hybridní částice obsahují v celém svém objemu rovnoměrně rozložené částečně alkylované křemíkové atomy. Což je kompromisní řešení vedoucí ke zlepšení stability částic a relativně slušné účinnosti dělení, nižší ovšem než u čistého silikagelu.

V posledním stádiu výroby za použití Twin technologie projde částice silikagelu speciální chemickou procedurou. Jejím výsledkem je částice s povrchovým organokřemičitým krunýřem, která si zachovává svoji vnitřní silikagelovou strukturu, a tím i mechanickou pevnost, rigiditu a dobrou dělicí účinnost. Horní vrstva má za úkol chránit před chemickým napadením a tím stabilizovat celý povrch [9].



Obr. 7 : Kolona Gemini [9]

4.3.2.5.4 *Kolona X-bridge Shield*

Sorbent této kolony byl vytvořen BEH technologií (Bridge Ethylen Hybrid), jejímž hlavním principem je syntéza organicko-anorganického hybridního materiálu. Ten obsahuje organickou (organosiloxany) i anorganickou (silikagel) část, které spojují

ethylenové můstky. Díky těmto můstkům může být kolona použita v širokém rozpětí pH.

Shield v názvu kolony označuje zmenšení počtu silanolových skupin chemickou záměnou, aby se omezila výměna iontů mezi stacionární a mobilní fází tzv. krvácení kolony.



Obr. 8 : Kolony X-bridge Shield [14]

4.3.2.5.5 *Regenerace analytické kolony*

Při současných cenách je velmi důležité, aby kolona měla co nejdelší životnost. Podstatné je její uchovávání ve vhodných podmínkách případně její regenerace k prodloužení použitelnosti.

K prodloužení životnosti analytické kolony je nejlepším způsobem předcházet znečištění kolony kontaminanty. Proto je vhodné vždy používat rozpouštědla čistoty HPLC a věnovat zvýšenou pozornost přípravě mobilní fáze i vzorku.

Životnost kolony závisí na velkém množství aspektů, příčin k jejímu zmenšení je hned několik. Nejdříve je to typ a druh vzorku, který se silně adsorbuje na stacionární fázi, tím sníží její separační schopnost. Také mohou být ve vzorku velké částice, které neprojdou kolonou, a zvyšují tím zpětný tlak. Proto se často při analýze používá předkolona, která sice zvyšuje mrtvý objem, ale zabraňuje znehodnocení stacionární fáze. Dalšími příčinami zmenšení životnosti jsou slabá mechanická odolnost kolony vzniklá nešetrným zacházením a práce v extrémních oblastech pH.

Základním doporučením je proplachování kolony po skončení analýzy solventem (nejčastěji methanol nebo acetonitril) při polovičním průtoku mobilní fáze

než se obvykle používá. Takto se z kolony vytěsní látky a nečistoty, které se jinak neeluují nebo mají příliš velké kapacitní poměry.

K regeneraci kolony slouží různé "dekontaminační programy", které se volí vzhledem k předpokládaným kontaminantům. Jedním z nejjednodušších je použití vody, methanolu, tetrahydrofuranu, dichlormethanu a poté opět použití tetrahydrofuranu a methanolu. Použití vody v prvním kroku je nutné v případě zvolení pufru jako mobilní fáze. Methanol by mohl způsobit jeho vysrážení přímo v systému. Dichlormethan slouží k eluci lipidů a malých hydrofóbních molekul, následný tetrahydrofuran s methanolem slouží k převedení kolony opět do reverzního módu.

Vzhledem k vlastnostem stacionární fáze dochází k zadržování kontaminantů na počátku kolony. Posledním krokem proto může být otočení kolony proti obvyklému směru toku mobilní fáze a použití některého z dekontaminačních programů. Po ukončení regenerace kolony se kolona ponechá již v tomto módu [13].

4.3.2.6 Předkolona a pre-filtr

Použití předklony nebo předkolonového filtru zvyšuje mrtvý objem systému a může snižovat účinnost separace. Z těchto důvodů je nutné zvážit, zda jejich použití je nezbytné. Pre-filtr obsahuje kovovou fritu s určitou porozitou, která je vyměnitelná a v případě zanesení může zvyšovat zpětný tlak.

Předkolona má úlohu filtru a současně chrání kolonu před kontaminací. Při výběru správné předklony je důležité zvolit stejnou stacionární fázi a správné rozměry (větší délka více ovlivní separaci)[13].

4.3.2.7 Detektory

V kapalinové chromatografii existuje mnoho způsobů detekce látek. Hlavními požadavky na HPLC detektory jsou: vysoká citlivost, stabilita a reprodukovatelnost odezvy (bez šumu a driftu), lineární závislost na koncentraci v co největším rozsahu, okamžitá odezva a minimální objem detekční cely (aby nedocházelo k rozmývání chromatografických zón). Vnější vlivy jako jsou změna teploty, typu rozpouštědla případně průtokové rychlosti by měly detekci ovlivňovat co nejméně. Detektor by měl být nastavitelný tak, aby se odezva dala optimalizovat pro různé látky [4].

Detektory mohou být univerzální (detekce všech látek v eluátu) nebo selektivní (detekce pouze určitých předem zvolených látek). Mezi nejvíce používané patří UV-VIS detektor pro svoji univerzálnost a poměrně vysokou citlivost, DAD (diode-array detektor), fluorescenční detektor a stále více se rozšiřuje použití MS detektoru (hmotnostně spektrometrický detektor) i přes jeho poměrně vysokou cenu. MS, elektrochemický a fluorescenční detektor patří mezi nejselektivnější a nejcitlivější detektory. Detektory lze také kombinovat, což podporuje spolehlivost a poskytuje více informací z analýzy (UV – MS) [3].

4.3.2.7.1 *UV-VIS spektrofotometrické detektory*

Tyto detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek 190 – 400 nm (UV) a 400 – 800 nm (VIS). Paprsek prochází průtokovou celou detektoru a díky interakcím látek s elektromagnetickým zářením dochází ke změně jeho intenzity. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně, který vyjadřuje vzájemný vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy (l), koncentrací absorbující složky (c) a vlastní velikostí absorpce, vyjádřenou jako absorbance (A):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde ε je molární absorpční koeficient ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Absorbance závisí na vlnové délce a na přítomnosti funkčních skupin v detekované látce. Většina organických látek absorbuje v UV oblasti, protože obsahují konjugované dvojně vazby nebo nevazebné elektrony.

UV-VIS detektory lze rozdělit na čtyři typy:

1. Detektory s fixní vlnovou délkou - zdrojem záření je nízkotlaková rtuťová výbojka
2. Detektory s měnitelnou vlnovou délkou - vlnové délky musí být předem dané
3. Detektory s programovatelnou vlnovou délkou - vlnovou délku lze nastavovat v určitém rozmezí, nejčastěji od 190 do 700 nm, a lze ji měnit během analýzy
4. Detektory diodového pole (DAD, aj.) – záření z deuteriové nebo wolframové lampy prochází měrnou celou detektoru a poté se spektrálně rozkládá holografickou mřížkou, takže na fotodiody dopadá zářivý tok o určité vlnové délce zeslabený absorpcí v cele detektoru. Fotodiody jsou spojeny

s kondenzátory, které se předem nabíjí na určitou hodnotu. Fotoelektrický proud, který vzniká po dopadu záření na diodu, vybije kondenzátor úměrně intenzitě dopadajícího záření. V další fázi se kondenzátory nabíjí a měří se proud, který je potřebný na jejich dobití. Výsledkem měření detektoru je trojrozměrný záznam, ze kterého se chromatogram při příslušné vlnové délce extrahuje. Spektrální informace z DAD detektoru slouží zejména k posouzení čistoty píku analyzované látky [4].

4.3.2.7.2 *Fluorescenční detektory*

Fluorimetrické detektory jsou založeny na principu fluorescence a měření sekundárního záření (emisního), které látka vydá po absorpci primárního elektromagnetického záření (excitačního). Jejich použití je tedy vhodné pouze v případě analýzy látek, které přímo fluoreskují nebo vykazují fluorescenci po derivatizaci s vhodným činidlem.

Jen asi 10% organických látek vykazuje schopnost fluorescence, takže použití těchto detektorů je omezené. Přesto jsou vysoce citlivé a selektivní. Mají-li dvě látky shodné nebo velmi podobné absorpční spektrum, nemusí se shodovat jejich emisní spektra, což je podstatou vysoké selektivity této detekce [13].

4.3.2.7.3 *Elektrochemické detektory*

Elektrochemické detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce, probíhající na fázovém rozhraní elektroda - roztok (mobilní fáze). Množství aplikací pro elektrochemickou detekci není příliš velké, ale látky, na které se aplikuje elektrochemická detekce, reprezentují velké množství důležitých léčiv a přírodních produktů [13].

Tyto detektory měří určitou elektrickou veličinu (elektrodový potenciál, proud, kapacita) vyvolanou průchodem vzorku průtokovou celou detektorem. V té jsou umístěny elektrody s napětím nutným k průběhu elektrochemické reakce. Měřený elektrický signál je úměrný látkovému množství složky a u elektrochemických detektorů se tedy sleduje závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací vzorku [16].

4.3.2.7.4 *Vodivostní detektory*

Vodivostní detektory jsou univerzální detektory měřící elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami. Na ně je nutné vkládat střídavé napětí, aby se zabránilo polarizaci elektrod.

Konstrukčně je tento detektor velmi jednoduchý, takže je možné ho velmi dobře miniaturizovat na malé objemy. Klade ovšem velký důraz na mobilní fázi, která by měla být nevodivá, musí ale dostatečně rozpouštět analyzované vzorky. Vhodnou mobilní fází je redestilovaná voda, která může mít i menší příměs polárních organických rozpouštědel [13].

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

Aceton, Penta (Chrudim, Česká republika)

Acetonitril, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Ergocalciferol > 98%, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika) = Vitamín D₂

Ethanol, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Hexan, Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)

Chloroform, Penta (Chrudim, Česká republika)

Infadolan® (č.šarže: 90579), Herbacos-Bofarma (Pardubice, Česká republika)

Isopropylalkohol, Penta (Chrudim, Česká republika)

Jodid draselný, Fluka - Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Methanol, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Placebo Infadolanu®, Herbacos-Bofarma (Pardubice, Česká republika)

Tetrahydrofuran, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Toluen, Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika)

Vitamín A acetát, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

Vitamín E acetát 96%, Sigma Aldrich (Praha, Česká republika)

ultračistá voda, čištěná systémem Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)

5.2 Použité přístroje a zařízení

5.2.1 Chromatografické kolony

Chromolith Flash RP-18e, 25 x 4,6 mm, předkolona (5 x 4,6 mm), Merck (Německo)

Chromolith Fast Gradient RP-18e, 50 x 2 mm, předkolona (5 x 4,6 mm), Merck (Německo)

Gemini 3 μ C18 110A, 50 x 3,0 mm; 3 μ m; Phenomenex (USA)

Gemini 3 μ C18 110A, 30 x 2,0 mm; 3 μ m; Phenomenex (USA)

Onyx Monolithic C18, 50 x 4,6 mm, předkolona (5 x 4,6 mm), Phenomenex (USA)

X-bridge Shield RP-18, 50 x 3 mm; 2,5 μ m; Waters (USA)

5.2.2 Přístroje a zařízení

Kapalinový chromatograf Waters (USA): Software Breeze (Waters, USA)

Waters 1525 Binary HPLC Pump

Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector

Waters 717 Plus Autosampler

Analytické váhy Sartorius 2004 MP, Německo

Centrifuga EBA 21, Hettich Zentrifugen, Německo

Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex RK52, Berlín, Německo

Vodní lázeň Memmert WB 14 (s integrovanou třepačkou), Německo

5.3 Příprava roztoků

5.3.1 Zásobní roztoky

Jako rozpouštědlo pro přípravu zásobního roztoku vitamínu A-acetátu byl použit methanol, ve kterém je látka dobře rozpustná. Pro zásobní roztok byla zvolena koncentrace 1 mM. Roztok byl z důvodu nestability látky uchovávan v mrazicím zařízení při teplotě -20 °C a chráněn proti světlu alobalem. Tímto způsobem byly zachovány vlastnosti roztoku po dobu přibližně jednoho měsíce, proto bylo nezbytné v průběhu optimalizace chromatografických podmínek dvakrát připravovat nový roztok.

Jako rozpouštědlo pro přípravu zásobního roztoku vitamínu D byl, vzhledem k rozpustnosti látky, použit rovněž methanol. Byla zvolena rovněž koncentrace 1 mM. Roztok byl uchovávan v chladicím zařízení při stálé teplotě 4 °C. Tyto podmínky byly dostatečné pro zachování vlastností roztoku, proto nebylo nutné ho znovu připravovat po celou dobu měření.

Rozpouštědlem pro zásobní roztok vitamínu E-acetátu byl zvolen hexan. V methanolu látka není rozpustná. Roztok byl uchovávan v chladicím zařízení při teplotě 4 °C. Koncentrace roztoku byla stanovena na 20 mM. Tento roztok si rovněž zachoval v daných podmínkách své vlastnosti po celou dobu měření, tudíž nebyla nezbytná jeho nová příprava.

5.3.2 Pracovní roztok standardů

Pracovní roztok byl opakovaně připraven do 10 ml odměrné baňky smísením 1 ml z každého zásobního roztoku a doplněním methanolem po rysku. Na začátku každého měření byla ověřena stálost jeho vlastností. V případě změny těchto vlastností především v důsledku časové degradace vitamínu A nebo z důvodu spotřebování roztoku, byl připraven nový.

5.4 Optimalizace chromatografické metody

Nejdříve bylo nutné nalézt vyhovující chromatografické podmínky pro vytvoření metody, jako jsou analytická kolona s vhodným sorbentem, složení mobilní fáze, průtoková rychlost, vlnová délka detekce. Do systému byl nastříkovan pracovní roztok standardů.

5.4.1 Určení vlnové délky detekce

Při hledání vlnové délky vhodné pro další měření se vycházelo z UV spekter stanovovaných vitamínů. Vybrané vlnové délky odpovídají absorpčním maximům těchto vitamínů.

5.4.2 Výběr mobilní fáze a její průtokové rychlosti

Při výběru vhodné mobilní fáze se vycházelo ze seznamu základních rozpouštědel nejvíce používaných v HPLC s ohledem na rozpustnost stanovovaných vitamínů. K testování byla vybrána v tabulce uvedená rozpouštědla a jejich směsi. V průběhu tohoto zkoušení docházelo také k hledání ideální průtokové rychlosti s přiměřeným tlakovým zatížením kolony a dostatečnou separací analyzovaných látek. Pro experimenty byly testovány základní průtokové rychlosti 0,5 ml/min, 1 ml/min, 2 ml/min, 3 ml/min, 4 ml/min.

Tab. 2 : Testované mobilní fáze

	Acetonitril	Methanol	Voda
Mobilní fáze I	100 %	0 %	0 %
Mobilní fáze II	0 %	100 %	0 %
Mobilní fáze III	50 %	50 %	0 %
Mobilní fáze IV	49 %	49 %	2 %

5.4.3 Testování analytické kolony

Celkem bylo vyzkoušeno 6 odlišných analytických kolon - Chromolith Flash RP-18e (25 x 4,6 mm); Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm); Gemini 3 μ C18 110A (50 x 3,0 mm; 3 μ m); Gemini 3 μ C18 110A (30 x 2,0 mm; 3 μ m); Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm); X-bridge Shield RP-18 (50 x 3 mm; 2,5 μ m).

První testovanou kolonou byla Chromolith Flash RP-18e (25 x 4,6 mm) s vnitřní náplní oktadecylsilikagelem. V celém systému byly postupně testovány všechny čtyři vybrané mobilní fáze. Během zkoušení každé fáze byla zvyšována její průtoková rychlost v uvedeném rozmezí testovaných průtoků po každém nástřiku pracovního roztoku standardů o objemu 20,0 μ l.

Následující zkoušenou kolonou byla Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm). Postup testování odpovídal předchozí koloně. Jen u výše uvedené mobilní fáze IV byly proměřeny pouze průtokové rychlosti 0,5 ml/min, 1 ml/min a 2 ml/min.

V průběhu testování třetí kolony X-bridge Shield RP-18 (50 x 3 mm; 2,5 μ m) byl postup vzhledem k částicovému typu kolony značně transformován. Nejprve byla testována mobilní fáze IV, následně III a I. Místo mobilní fáze II byla připravena nová - acetonitril : methanol : voda v poměru 48 : 48 : 4 (v/v/v). U všech uvedených mobilních fází byly zkoušeny pouze průtoky 0,2 a 0,5 ml/min.

Metodika měření na další koloně Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm) byla totožná s první testovanou kolonou.

U předposlední zkoušené částicové kolony Gemini 3 μ C18 110A (50 x 3,0 mm; 3 μ m) byly proměřeny všechny zvolené mobilní fáze v průtocích 0,2 ml/min, 0,5 ml/min a 1 ml/min.

Poslední testovanou kolonou byla částicová Gemini 3 μ C18 110A (30 x 2,0 mm; 3 μ m). U mobilních fází I a IV byly zkoušeny průtoky 0,2 ml/min, 0,5 ml/min a 1 ml/min, u mobilních fází II a III průtoky 0,2 ml/min a 0,5 ml/min. Byla měřena i nová fáze, zkoušená již u kolony X-bridge Shield RP-18, v průtokových rychlostech 0,5 a 1 ml/min.

5.5 Extrakce vitamínů ze vzorku

5.5.1 Jednostupňová extrakce

Do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml bylo odváženo pokaždé asi 0,5 g vzorku a přidáno 10 ml rozpouštědla. Použity byly acetonitril, methanol, hexan, chloroform, aceton, ethanol, tetrahydrofuran, toluen a směs methanol : hexan v poměru 6 : 4 (v/v). Zkumavky byly umístěny na 15 nebo 35 minut do ultrazvukové lázně a nakonec 5 minut centrifugovány. Čirý supernatant byl poté autosamplerem dávkován na kolonu.

5.5.2 Vícestupňová extrakce

Základní krok této přípravy se nelišil od předchozího typu, následně byl redukován počet zkoušených rozpouštědel a přidány další metody extrakce.

5.5.2.1 Vložené vymražování

Nejprve byla vyzkoušena tři rozpouštědla (aceton, ethanol a isopropylalkohol) podle pravidel podobných jednostupňové extrakci. Krokem navíc bylo umístění zkumavek po ultrazvukové lázni ještě na 15 minut do mrazícího zařízení. Následně proběhla opět centrifugace po dobu 5 minut.

5.5.2.2 Postupná extrakce hexanem a methanolem

Dále bylo ke dvěma vzorkům přidáno jednotlivě 10 ml hexanu, zkumavky byly v ultrazvuku po dobu 20 min, poté bylo do každé připipetováno 10 ml methanolu. Následně byl jeden vzorek 15 minut třepán, druhý umístěn znovu na 15 minut do ultrazvukové lázně. Nakonec byly oba vzorky 5 minut mrazeny.

5.5.2.3 Extrakce směsí hexanu a methanolu/chloroformu

Následující metodika se lišila v přidavku methanolu spolu s hexanem, tedy v prvním kroku rozpouštění vzorků. Tato metoda byla ještě modifikována přidavkem 10 ml chloroformu namísto 10 ml methanolu. Testovány tedy byly čtyři vzorky.

5.5.2.4 Postupná extrakce hexanem a methanolem/acetonitrilem

Dále bylo vyzkoušeno přidání 10 ml hexanu jednotlivě do 4 zkumavek, ty byly poté umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně. Vzorky se následně rozdělily do dvou skupin, k jedné bylo připipetováno 10 ml methanolu, k druhé 10 ml acetonitrilu. Z každé skupiny byla jedna zkumavka vrácena do lázně na 5 minut, zbývající byly umístěny do třepačky na stejnou dobu. Nakonec byly všechny zkumavky umístěny na 15 minut do mrazícího zařízení.

5.5.2.5 Extrakce methanolem

Při poslední testované metodě bylo připraveno 6 zkumavek, v každé 0,3 g vzorku Infadolanu. Do každé bylo přidáno 10 ml methanolu, na 40 minut vloženy do ultrazvukové lázně, 60 minut mraženy a nakonec 15 minut centrifugovány. K Infadolanu bylo přidáno definované množství vitamínu E-acetátu jako vnitřního standardu.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Optimalizace chromatografických podmínek

6.1.1 Vlnová délka pro detekci

Při hledání vhodné vlnové délky se vycházelo z absorpčních spekter vitamínů. Na základě poloh maxim těchto spekter byly jako nejvýhodnější určeny hodnoty $\lambda_1 = 265$ nm odpovídající spektru vitamínu D a $\lambda_2 = 290$ nm odpovídající spektrům vitamínů A a E. Měřeno bylo především při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu vitamínu A, protože obsah vitamínu D v přípravku je velmi nízký. Bylo by tedy nutné metodu pro stanovení vitamínu D upravovat.

6.1.2 Stacionární fáze

Tab. 3 : Přehled zkoušených kolon

Název kolony	Vnitřní sorbent	Délka kolony	Vnitřní průměr	Výrobce kolony
Chromolith Flash RP-18e	oktadecylsilikagel	25 mm	4,6 mm	Merck
Chromolith Fast Gradient RP-18e	oktadecylsilikagel	50 mm	2,0 mm	Merck
X-bridge Shield RP-18	oktadecylsilikagel	50 mm	3,0 mm	Waters
Onyx Monolithic C18	oktadecylsilikagel	50 mm	4,6 mm	Phenomenex
Gemini 3 μ C18 110A	Částice silikagelu o velikosti 3 μ m modifikované technologií Twin	50 mm	3,0 mm	Phenomenex
Gemini 3 μ C18 110A	Částice silikagelu o velikosti 3 μ m modifikované technologií Twin	30 mm	2,0 mm	Phenomenex

6.1.2.1 Chromolith Flash RP-18e (25 x 4,6 mm)

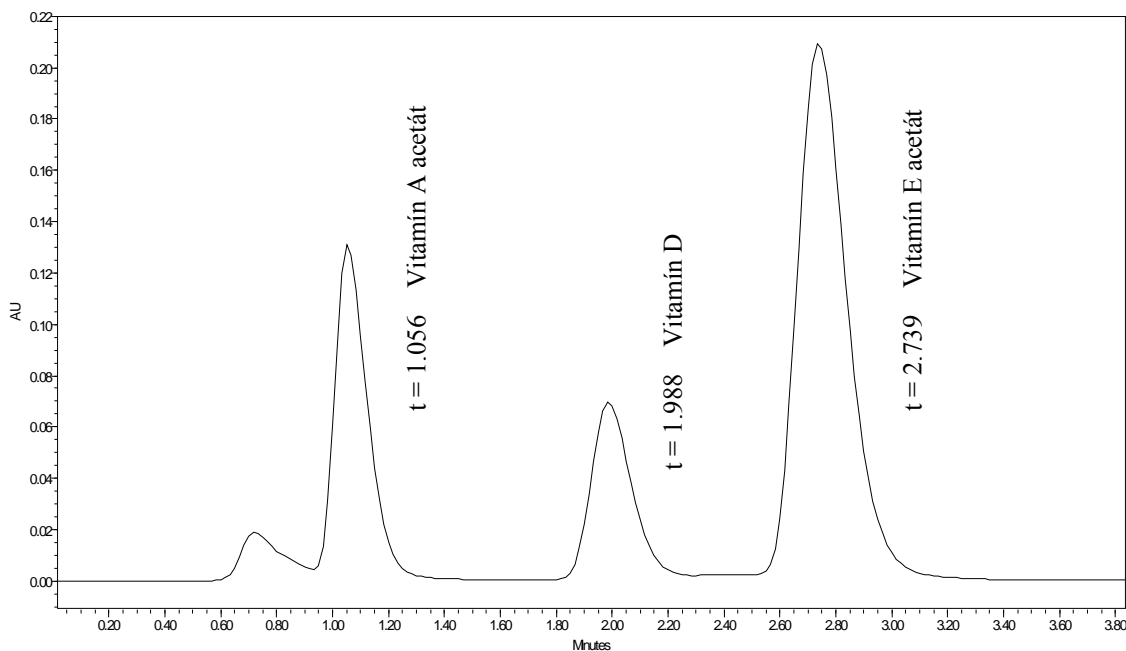
U první zkušební analytické kolony, jak už bylo dříve uvedeno, byly proměřeny čtyři základní mobilní fáze. Na kolonu byl, stejně jako u všech ostatních, nastříkovan pracovní roztok standardů.

Při testování acetonitrilu (MF I) nedošlo k plné separaci píku vitamínu A a píku tzv. mrtvého objemu. Ten byl změřen pomocí jodidu draselného. Taktéž vitamíny D a E se eluovaly těsně za sebou, čímž docházelo k překrývání jejich chromatografických píků. Zvyšování průtokové rychlosti negativně ovlivňovalo rozlišení píků.

Při zkoušení MF II se retenční časy všech třech vitamínů velmi podobaly, proto nedošlo k úplné separaci píků. Proměření průtokových rychlostí nevedlo ke zlepšení rozlišení v chromatogramu.

Během testování MF III se vitamín A eluoval v retenčním čase blízkém času mrtvého objemu, čímž se mobilní fáze u této kolony stala nevhodnou pro hledanou metodu. Ani snižování průtokové rychlosti nevedlo k lepšímu výsledku.

Podobný výsledek jako u předchozího testování mělo i zkoušení MF IV. Přesto se dané chromatografické podmínky ukázaly jako nejlepší pro tuto kolonu (Obr. 9).



Obr. 9 : Chromatogram separace vitamínů A, D a E na koloně Chromolith Flash RP-18e (25 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 1 ml/min; nástřik o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290 nm; koncentrace vitamínů : $c_A = 100 \mu\text{M}$, $c_D = 100\mu\text{M}$, $c_E = 2\text{mM}$.

6.1.2.2 Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm)

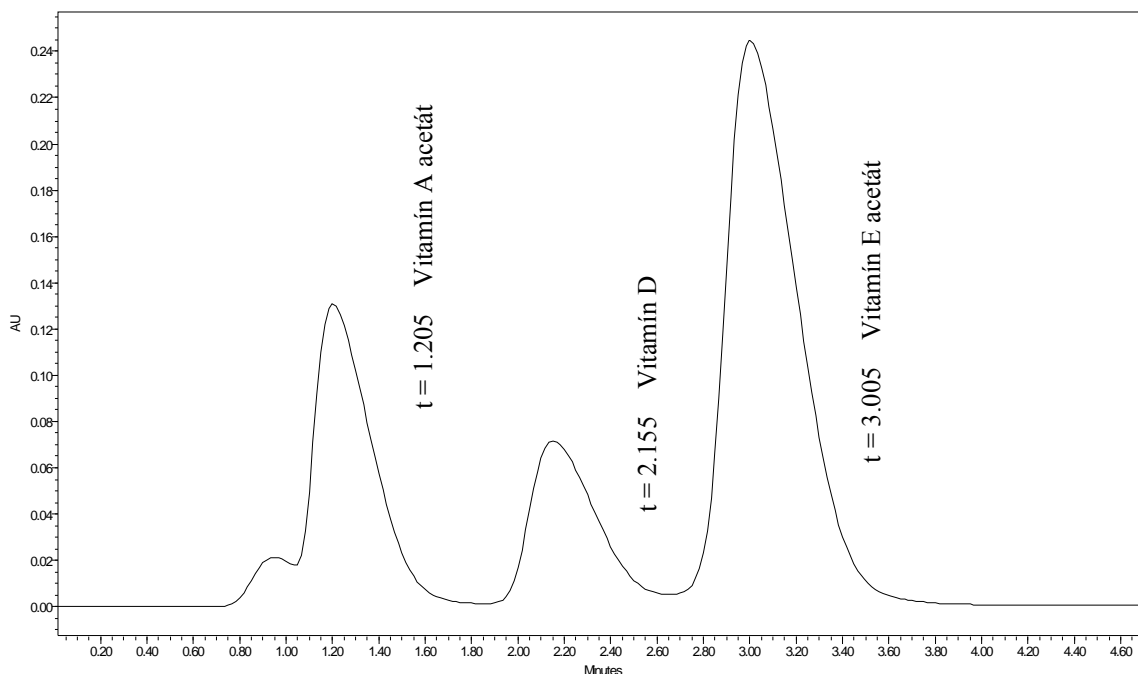
U následující testované analytické kolony byly také proměřeny základní mobilní fáze. Ani podmínky na této koloně se neukázaly jako vyhovující pro hledanou metodu.

U první zkoušené mobilní fáze - acetonitrilu - docházelo ke špatnému oddělování píku mrtvého objemu a píku vitamínu A. Také retenční časy vitamínů D a E byly velice podobné, proto separace v chromatogramu nebyla dostatečná. Navíc píky byly mírně chvostující, což se projevilo především při zvyšování rychlosti průtoku.

Při testování methanolu docházelo k velmi špatnému rozdělení složek nastříkovaného pracovního roztoku. Při měření vyšších průtokových rychlostí se na chromatogramu objevoval trojitý pík.

Výsledkem testování mobilní fáze III byly, podobně jako u acetonitrilu, chromatogramy s nedokonalou separací píku vitamínu A od píku mrtvého objemu, stejně jako vitamínů D a E. Chvostování se projevovalo u nižších rychlostí průtoku.

Optimálního výsledku bylo i v tomto případě dosaženo s mobilní fází IV. Jak už bylo dříve uvedeno, nebyly proměřeny všechny průtokové rychlosti, z důvodu eluce vitamínu A v retenčním čase blízkém času mrtvého objemu (Obr. 10).



Obr. 10 : Chromatogram separace vitamínů A, D a E na analytické koloně Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 0,5 ml/min; nástřik o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290 nm; koncentrace vitamínů : $c_A = 100 \mu\text{M}$, $c_D = 100 \mu\text{M}$, $c_E = 2\text{mM}$.

6.1.2.3 X-bridge Shield RP-18 (50 x 3 mm; 2,5 μ m)

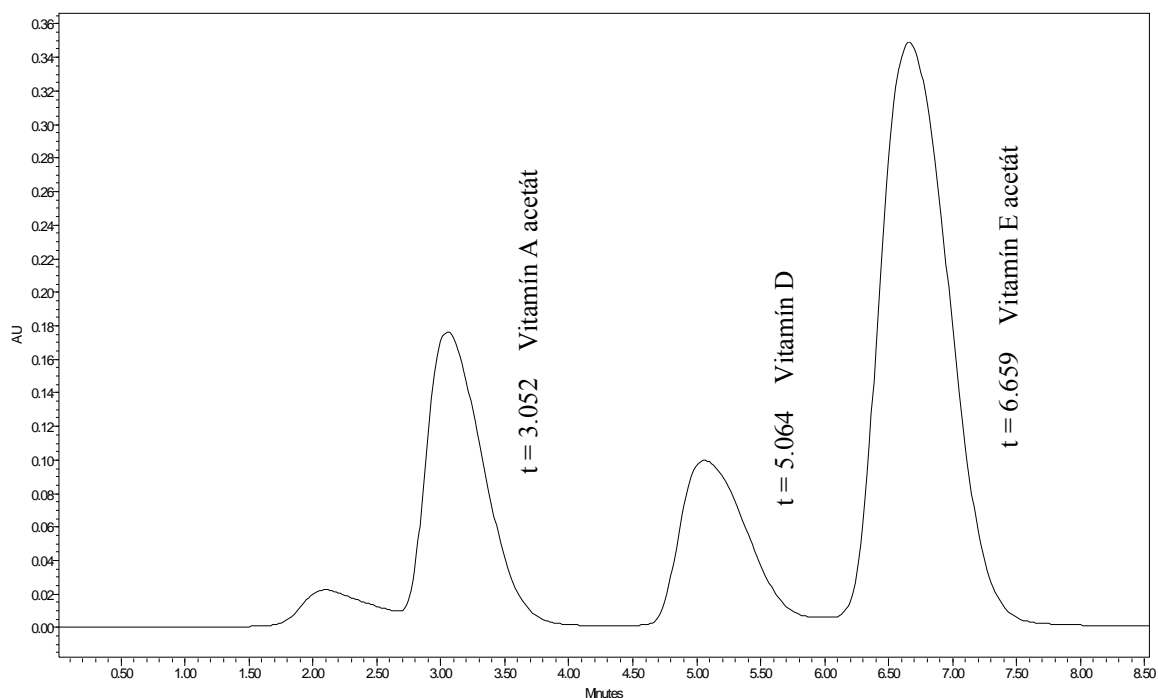
Částicový charakter této kolony vzhledem k tlaku na koloně nedovoloval proměření plánovaného rozsahu průtokových rychlostí. Také, jak bylo dříve zmíněno, byla vyměněna mobilní fáze II za novou mobilní fázi acetonitril : methanol : voda v poměru 48 : 48 : 4 (v/v/v).

U mobilní fáze IV docházelo ke špatné separaci píků vitamínu D a E. Také oddělení píků vitamínu A a mrtvého objemu bylo nedostatečné.

U mobilní fáze II docházelo k podobnému problému, navíc retenční časy vitamínů D a E byly téměř totožné a především u vyšší průtokové rychlosti nebylo možné je od sebe rozeznat.

Také v průběhu testování mobilní fáze I bylo možné sledovat stejný jev, který se projevoval i v nižších rychlostech průtoku.

Nejlepšího výsledku u této kolony bylo dosaženo s nově navrženou mobilní fází. Přesto však metoda nevyhovovala ideálním chromatografickým podmínkám metody z důvodu mírného chvostování píků (Obr. 11).



Obr. 11 : Chromatogram separace vitamínů A, D a E na koloně X-bridge Shield RP-18 (50 x 3 mm; 2,5 μ m); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 48 : 48 : 4 (v/v/v); průtok 0,2 ml/min; nástřik o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290 nm; koncentrace vitamínů : $c_A = 100 \mu\text{M}$, $c_D = 100\mu\text{M}$, $c_E = 2\text{mM}$.

6.1.2.4 Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm)

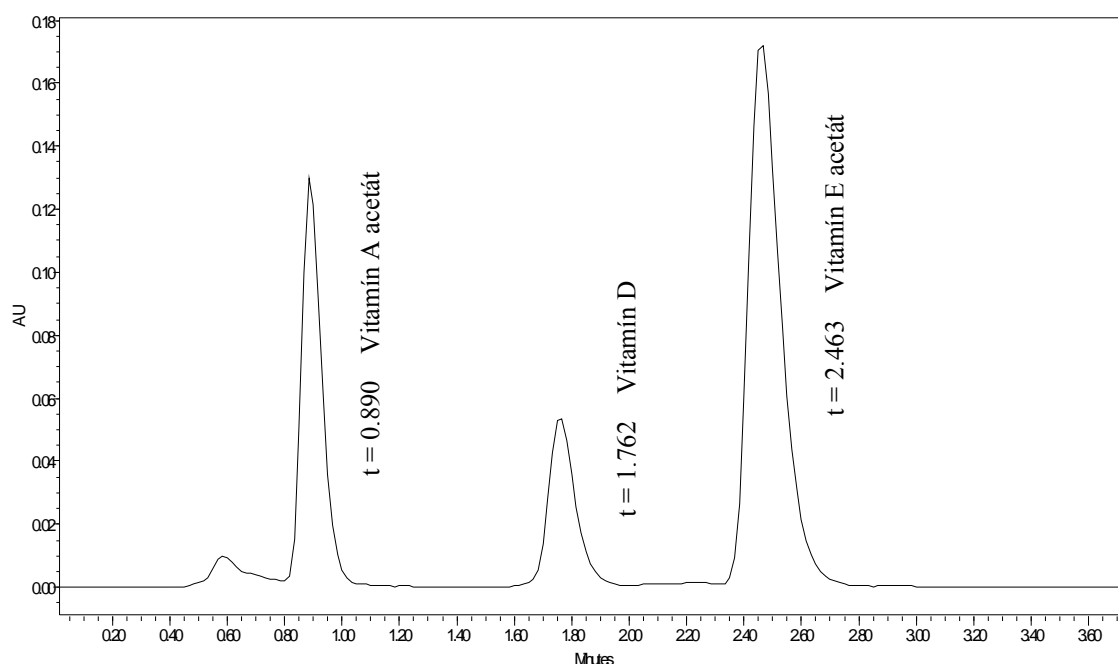
Tato kolona s vnitřním sorbentem oktadecylsilikagelem byla nakonec vybrána jako ideální pro separaci uvedených vitamínů.

První zkoušenou byla opět mobilní fáze I, u které se vitamíny D a E eluovaly ve stejném retenčním čase, takže je od sebe nebylo možné rozeznat. Snižování průtokové rychlosti nevedlo ke zlepšení separace.

Při testování methanolu byla separace vitamínů dobrá, jen se při zvyšování průtokové rychlosti zhoršovala symetrie chromatografických píků.

Podobného výsledku bylo dosaženo také se třetí zkoušenou mobilní fází - směs methanolu a acetonitrilu. I u ní docházelo ke zhoršení symetrie píků při proměrování větších průtokových rychlostí.

Optimálního výsledku bylo dosaženo s mobilní fází IV. Její separační schopnost odpovídala požadavkům a vitamíny se eluovaly ve vhodném retenčním čase (Obr. 12).



Obr. 12 : Chromatogram separace vitamínů A, D a E na koloně Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 48 : 48 : 4 (v/v/v); průtok 2 ml/min; nástřik o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290 nm; koncentrace vitamínů : $c_A = 100 \mu\text{M}$, $c_D = 100 \mu\text{M}$, $c_E = 2 \text{mM}$.

6.1.2.5 Gemini 3 μ C18 110A (50 x 3,0 mm; 3 μ m)

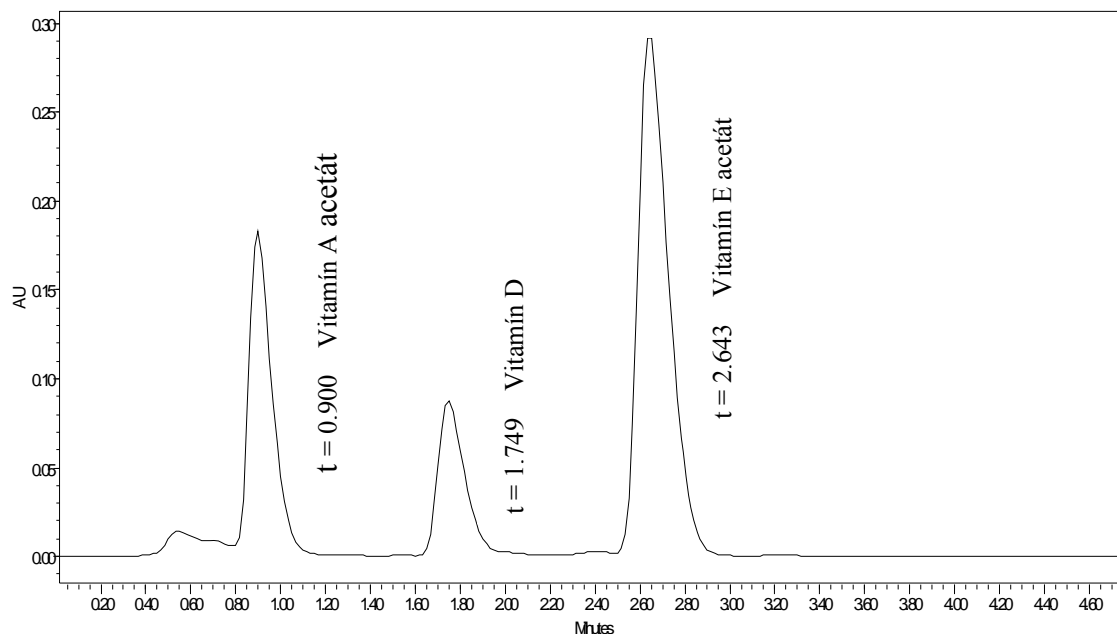
Vzhledem k částicovému charakteru kolony byly proměřovány menší průtokové rychlosti, než tomu bylo u monolitických kolon.

Při proměřování mobilní fáze I docházelo k dobré separaci vitamínů, ovšem získané píky na chromatogramu měly asymetrický charakter, který se více projevoval se vzrůstající průtokovou rychlostí.

Během testování methanolu (MF II) se vitamíny eluovaly v dostatečné vzdálenosti od sebe, stejně jako v předchozím případě. Chromatografické píky ale mírně chvostovaly.

U mobilní fáze III si retenční časy mrtvého objemu a vitamínu A byly velice podobné, vitamín A se tudíž eluoval tak blízko, že nedocházelo k dostatečné separaci obou píků.

Nejlepší podmínky pro tuto kolonu byly nalezeny při testování mobilní fáze IV. Separační schopnost za těchto podmínek odpovídala požadavkům. U menších průtokových rychlostí docházelo k rozmývání píků. Tento jev se při vyšších rychlostech průtoku přestal objevovat (Obr. 13).



Obr. 13 : Chromatogram separace vitamínů A, D a E na koloně Gemini 3 μ C18 110A (50 x 3,0 mm; 3 μ m); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 1 ml/min; nástřik o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290 nm; koncentrace vitamínů : $c_A = 100 \mu$ M, $c_D = 100 \mu$ M, $c_E = 2$ mM.

6.1.2.6 Gemini 3 μ C18 110A (30 x 2,0 mm; 3 μ m)

Stejně jako u předchozí částicové kolony, byly i u této vzhledem k tlaku na koloně proměřeny pouze dříve uvedené nižší průtoky. Také byla testována nová mobilní fáze, zkoušená již u kolony X-bridge Shield RP-18.

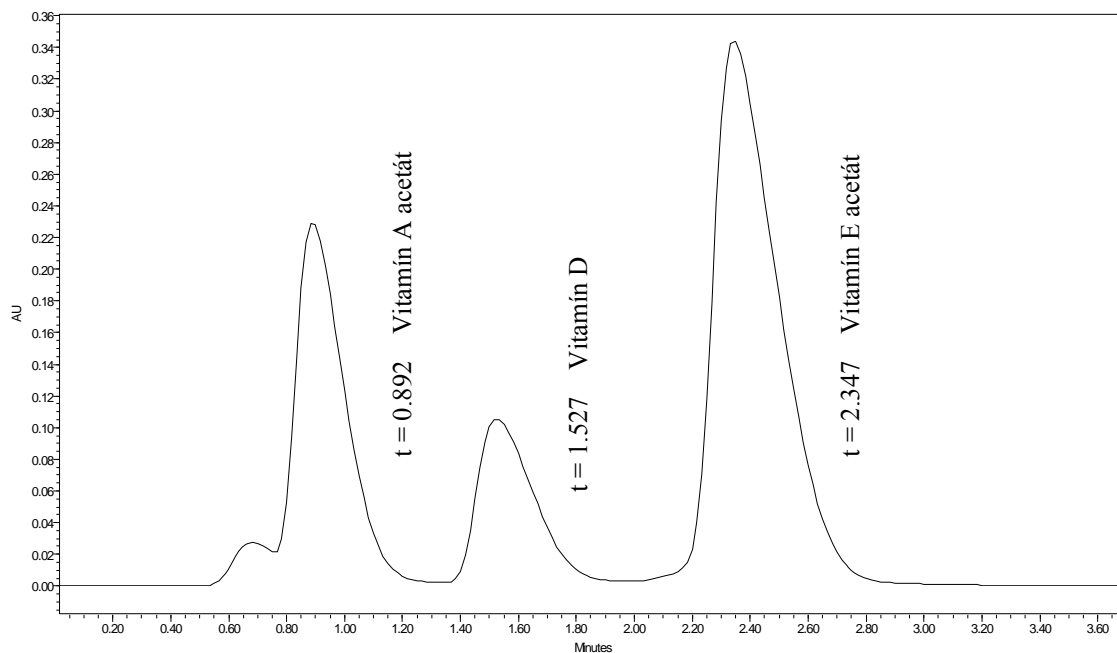
Při testování mobilní fáze I se retenční čas vitamínu A blížil času mrtvého objemu, takže nedošlo k separaci jejich chromatografických píků. Dále pak docházelo k rozmývání píků, především u nižších průtokových rychlostí, a jejich chvostování.

Během zkoušení methanolu se v chromatogramu objevil čtverný pík. Retenční časy mrtvého objemu, vitamínu A a vitamínu D byly téměř stejné, proto je především u vyšší průtokové rychlosti nebylo možné zcela rozeznat.

Podobný jev se objevil i během testování MF III. Vitamíny se eluovaly ve větším intervalu než v předchozím testu, přesto však separace nebyla dostatečná.

U mobilní fáze IV docházelo k rozmývání všech píků, hlavně u nižších průtoků. Retenční čas vitamínu A se blížil času mrtvého objemu, proto nedošlo k jejich separaci.

Nová mobilní fáze, směs ACN : MeOH : H₂O v poměru 48 : 48 : 4 (v/v/v), se ukázala jako optimální pro tuto kolonu. Přesto neměla dostatečnou separační schopnost mrtvého objemu a vitamínu A. Při testování docházelo k chvostování píků (Obr. 14).



Obr. 14 : Chromatogram separace vitamínů A, D a E na koloně Gemini 3 μ C18 110A (30 x 2,0 mm; 3 μ m); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 48 : 48 : 4 (v/v/v); průtok 0,5 ml/min; nástřik o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290 nm; koncentrace vitamínů : $c_A = 100 \mu\text{M}$, $c_D = 100\mu\text{M}$, $c_E = 2\text{mM}$.

6.1.3 Mobilní fáze a průtoková rychlost

Testováním mobilních fází u různých kolon a porovnáváním výsledných chromatogramů byla vybrána jako ideální mobilní fáze IV, tedy směs ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v).

Jako optimální průtoková rychlost v průběhu zkoušení mobilních fází, hlavně pro tuto vybranou, se ukázala rychlost 2 ml/min, která splňuje požadavky jak na separační schopnost, tak i na délku trvání analýzy.

6.1.4 Souhrn vybraných optimálních chromatografických podmínek

Vlnová délka detekce:

290 nm

Analytická kolona:

Onyx Monolithic C18, 50 x 4,6 mm, předkolona (5 x 4,6 mm), Phenomenex (USA)

Mobilní fáze:

mobilní fáze IV - ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v)

Průtoková rychlost mobilní fáze:

2 ml/min

Dávkovaný objem:

20 µl

Režim:

izokratický

Teplota:

laboratorní

6.2 Extrakce vitamínů ze vzorku

6.2.1 Jednostupňová extrakce

Jak už bylo dříve uvedeno, do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml s odváženými asi 0,5 g vzorku bylo přidáno 10 ml zkoušených rozpouštědel. Použita byla tato rozpouštědla: acetonitril, methanol, hexan, chloroform, aceton, ethanol, tetrahydrofuran, toluen a směs methanol : hexan v poměru 6 : 4 (v/v). Zkumavky byly poté umístěny na 15 nebo 35 minut do ultrazvukové lázně a nakonec 5 minut centrifugovány. Tam, kde to bylo možné, byl vypočítán obsah vitamínu A ve vzorku. U vybraných vzorků byla vypočítána i výtěžnost metody.

Výpočet obsahu: Byly analyzovány vzorky Infadolanu, které byly připraveny postupem uvedeným u jednotlivých rozpouštědel. Plochy píků ve standardu upravené poměrem plochy vnitřního standardu odpovídají hodnotě 100% a naměřené hodnoty ze vzorku se dopočítávají podle vzorce: $\text{Obsah (\%)} = 100 \cdot A_i/A_o$, kde A_i je plocha píku získaná analýzou vzorku, A_o je plocha píku získaná analýzou standardu.

Výpočet výtěžnosti R: Byly analyzovány modelové vzorky (placebo s přidavkem pracovního roztoku standardů o koncentraci c_o), které byly připraveny stejným postupem jako vzorky Infadolanu, u kterých jsou uvedeny. $R (\%) = 100 \cdot c_i/c_o$, kde c_i je koncentrace stanovená HPLC a c_o je koncentrace vložená.

6.2.1.1 15-ti minutová ultrazvuková lázeň

Dle výše uvedeného byly zkumavky se vzorky a použitými rozpouštědly umístěny na 15 minut do ultrazvukové lázně a poté 5 minut centrifugovány. Nebyla vyzkoušena rozpouštědla aceton a ethanol.

Při použití acetonitrilu jako rozpouštědla byl ve výsledném supernatantu obsah vitamínu A stanoven na 19,81%. Při centrifugaci došlo k malému rozpuštění masťového základu.

U rozpouštědla MeOH byl vypočítán výsledný obsah 26,14% (Obr. 15).

Při testování rozpouštědla hexanu se výsledný obsah vitamínu A dostal na 72,72%. Hexan však částečně rozpouštěl i masťový základ vzorku.

U rozpouštědla chloroformu byl konečný obsah vitamínu A stanoven na 103,46%. Problémem bylo částečné odpařování chloroformu především ve fázi centrifugace, které mělo za následek zakoncentrování vzorku.

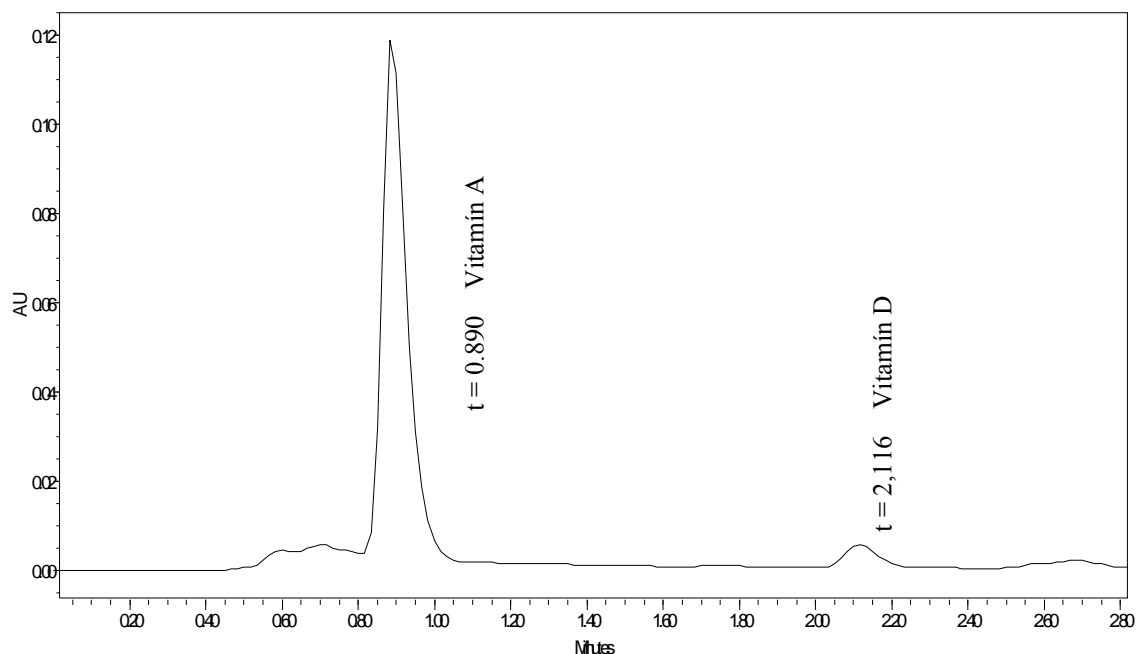
Při zkoušení toluenu jako rozpouštědla pro tuto metodu byl výsledný obsah 49,87%. Došlo k rozpuštění velké části masťového základu.

Během testování rozpouštědla tetrahydrofuran (THF) docházelo k částečnému rozpuštění masťového základu, který se pak vysrážel ve vialce autosampleru. Kvůli hrozícímu poškození stacionární fáze nemohla být provedena analýza vzorku.

U směsi rozpouštědel methanol : hexan v poměru 6 : 4 (v/v) výsledný obsah vitamínu A dosáhl 78,42%.

Tab. 4 : Souhrn výsledků metody - 15-ti minutová ultrazvuková lázeň

Rozpouštědlo	ACN	MeOH	hexan	CHCl ₃	toluen	THF	směs
Obsah vit. A	19,81%	26,14%	72,72%	103,46%	49,87%	tvorba ↓	78,42%



Obr. 15 : Extrakce methanolem pomocí 15-ti minutové ultrazvukové lázně na koloně Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 2 ml/min; nástřik o objemu 20,0 µl; UV detekce při 290 nm.

6.2.1.2 35-ti minutová ultrazvuková lázeň

Prodloužení doby ultrazvukové lázně mělo za cíl zvýšit obsah vitamínu A ve výluhu, a tím zlepšit výtěžnost metody. Nebyla použita rozpouštědla toluen, tetrahydrofuran a směs.

Prvním zkoušeným rozpouštědlem byl opět acetonitril, konečný obsah se zvýšil na 67,22%. Docházelo však k částečnému rozpouštění masťového základu.

Dalším rozpouštědlem byl methanol, obsah se zvýšil na 73,19% (Obr. 16).

V pořadí třetím testovaným rozpouštědlem se stal hexan, u kterého se obsah navýšil na 134,07%. Částečným odpařením hexanu při centrifugaci patrně došlo k zakoncentrování vzorku.

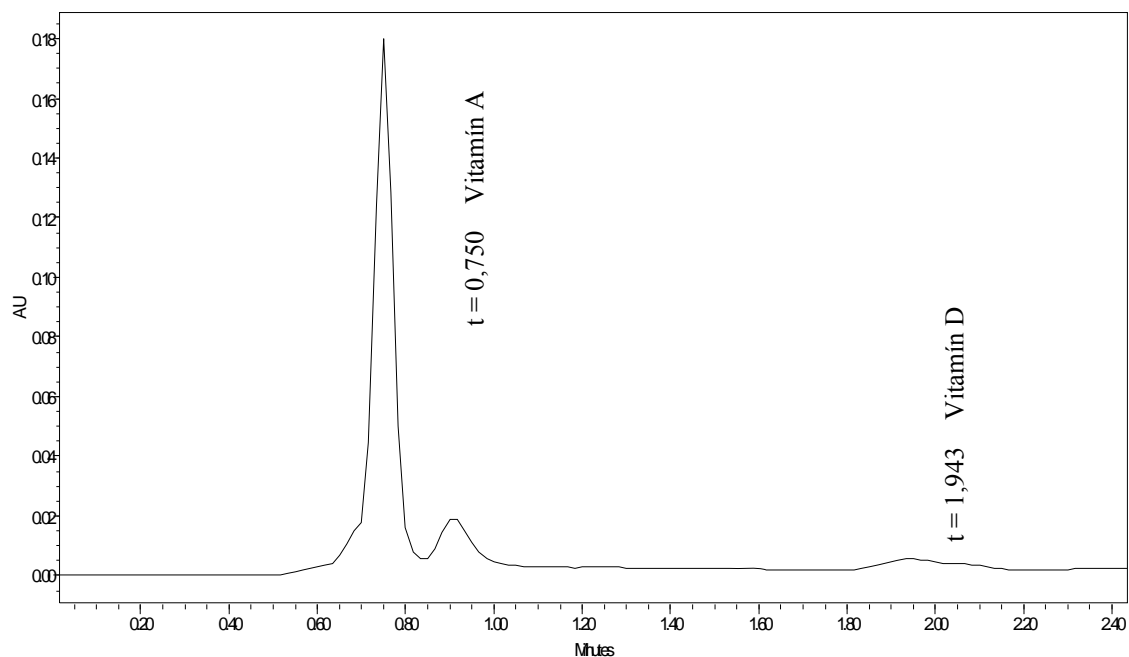
Při zkoušení chloroformu se obsah vitamínu A vyšplhal na 107,26%. U této zkoušky docházelo ke značnému odpaření rozpouštědla, čímž se chloroform stal pro metodu nevhodným.

Během testování acetonu a ethanolu jako rozpouštědel opět docházelo k částečnému rozpouštění masťového základu, který se také vysrážel ve vialce. Z důvodu nebezpečí poškození stacionární fáze nemohla být analýza provedena.

U methanolu, hexanu a chloroformu byla také počítána výtěžnost této metody. U MeOH byla získána hodnota $R_A = 84,06\%$ pro vitamín A a $R_D = 107,26\%$ pro vitamín D. Při zkoušení hexanu se rozpouštěl i masťový základ, který by zanesl kolonu, takže analýza placebo Infadolanu nebyla možná. U chloroformu byly získány hodnoty $R_A = 71,75\%$ a $R_D = 100,85\%$.

Tab. 5 : Souhrn výsledků metody - 35-ti minutová ultrazvuková lázeň

Rozpouštědlo	ACN	MeOH	hexan	CHCl ₃	aceton	EtOH
Obsah vit. A	67,22%	73,19%	134,07%	107,26%	tvorba ↓	tvorba ↓
Výtěžnost R _A	-	84,06%	tvorba ↓	71,75%	-	-
Výtěžnost R _D	-	107,26%	tvorba ↓	100,85%	-	-



Obr. 16 : Extrakce methanolem pomocí 35-ti minutové ultrazvukové lázně na koloně Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 2 ml/min; nástřík o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290 nm.

6.2.2 Vícetupňová extrakce

6.2.2.1 Vložené vymražování

Tato metoda se od jednostupňové extrakce liší, jak už název napovídá, přidáním 15-ti minutového mražení mezi ultrazvukovou lázeň trvající 15 minut a centrifugací dlouhou 5 minut. Tato inovace měla docílit předčasného vysrážení mast'ového základu, který se rozpouštěl během extrakce, následně by poškodil stacionární fázi, a tím znemožňoval analýzu. Použita byla rozpouštědla aceton, ethanol a isopropylalkohol.

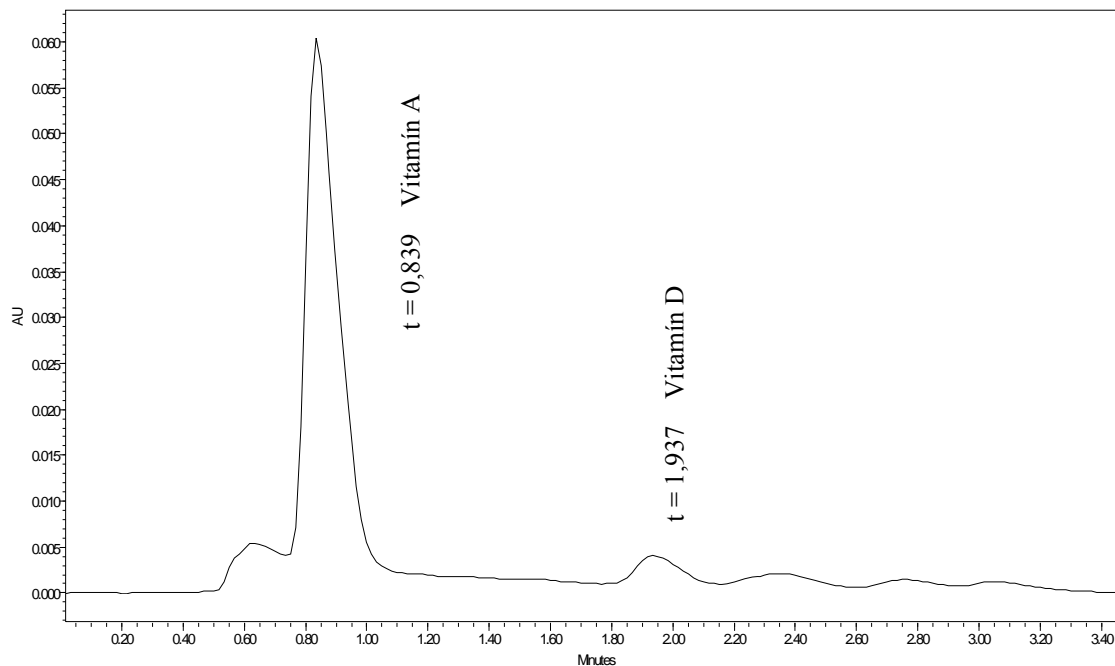
U rozpouštědla acetonu činil obsah vitamínu A 53,29%.

Při testování ethanolu metoda dosáhla nejhoršího výsledku. Obsah vitamínu A dosáhl pouze 12,07%.

Dosud nezkoušeným rozpouštědlem byl isopropylalkohol. Obsah vitamínu A činil 35,55% (Obr. 17).

Tab. 6 : Souhrn výsledků metody - Vložené vymražování

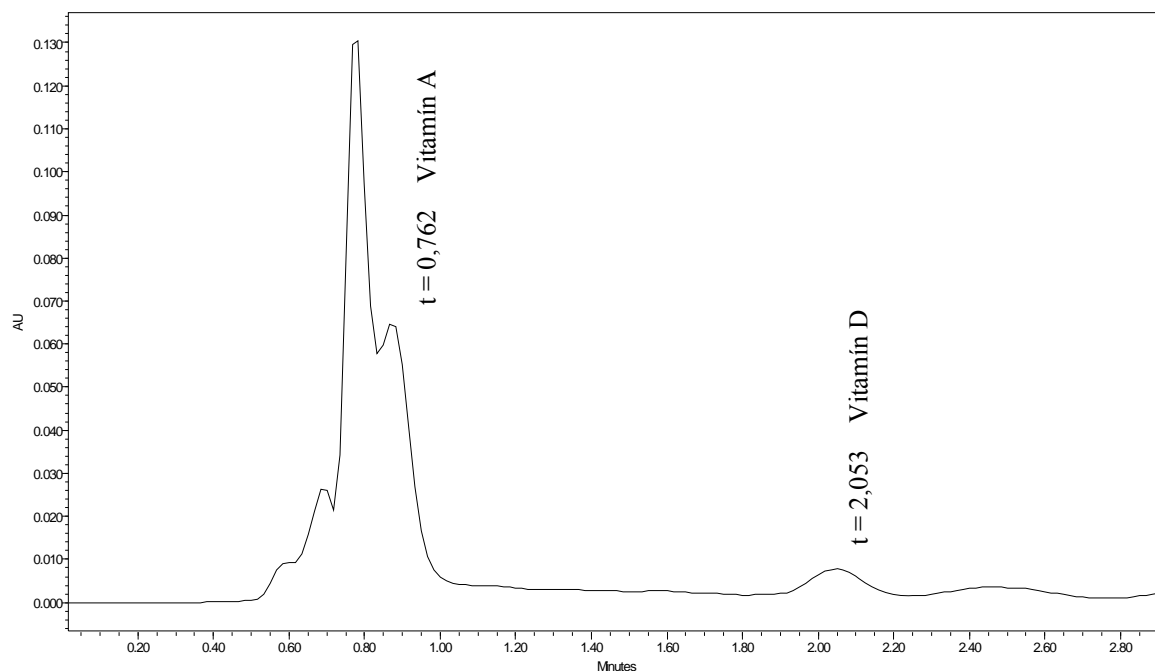
Rozpouštědlo	aceton	ethanol	isopropylalkohol
Obsah vit. A	53,29%	12,07%	35,55%



Obr. 17 : Extrakce isopropylalkoholem pomocí vloženého vymražování na koloně Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 2 ml/min; nástřik o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290 nm.

6.2.2.2 Postupná extrakce hexanem a methanolem

Na chromatogramech výluhu se v případě použití ultrazvukové lázně i třpačky objevovaly rozložené trojité píky vitamínu A, a to i při opakovaném testování. Z tohoto důvodu byla metoda shledána nevhodnou.



Obr. 18 : Postupná extrakce hexanem a methanolem na koloně Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 2 ml/min; nástřik o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290 nm.

6.2.2.3 Extrakce směsí hexanu a methanolu/chloroformu

Ve směsi hexan : chloroform v poměru 1 : 1 (v/v) se velká část mast'ového základu rozpustila, a to jak při použití třepačky, tak při použití ultrazvukové lázně. Tato skutečnost znemožnila analyzovat vzniklý supernatant.

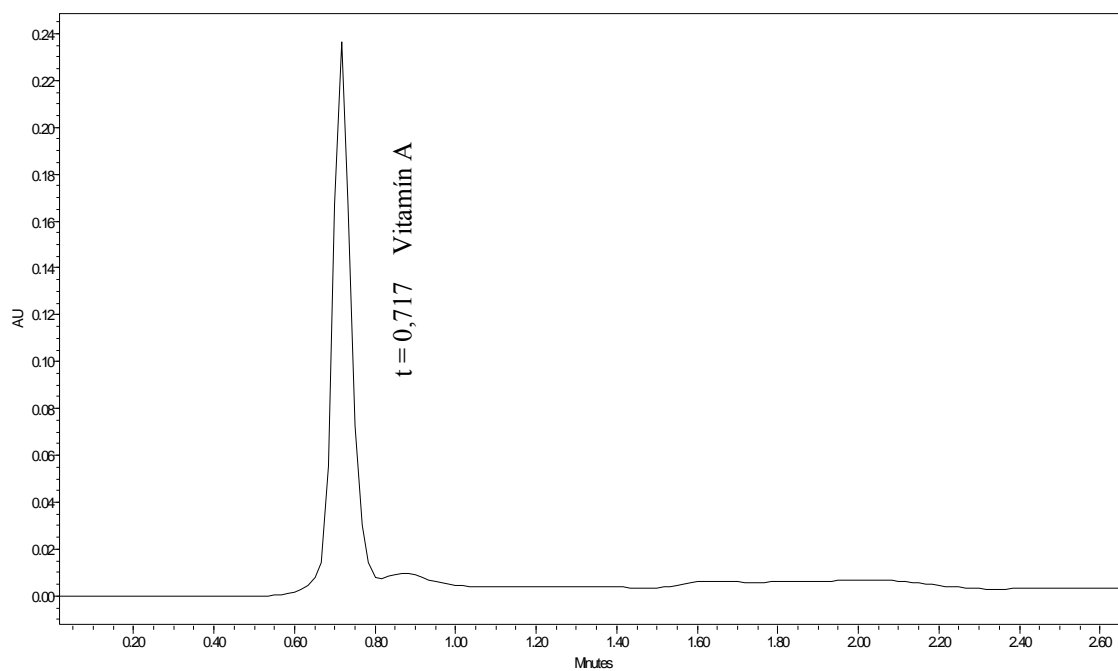
Se stejným výsledkem skončila i extrakce směsí hexanu a methanolu. Základ se vysrážel ve vialce a hrozilo nebezpečí ucpání kolony. Vzorky tudíž nebyly analyzovány.

6.2.2.4 Postupná extrakce hexanem a methanolem/acetonitrilem

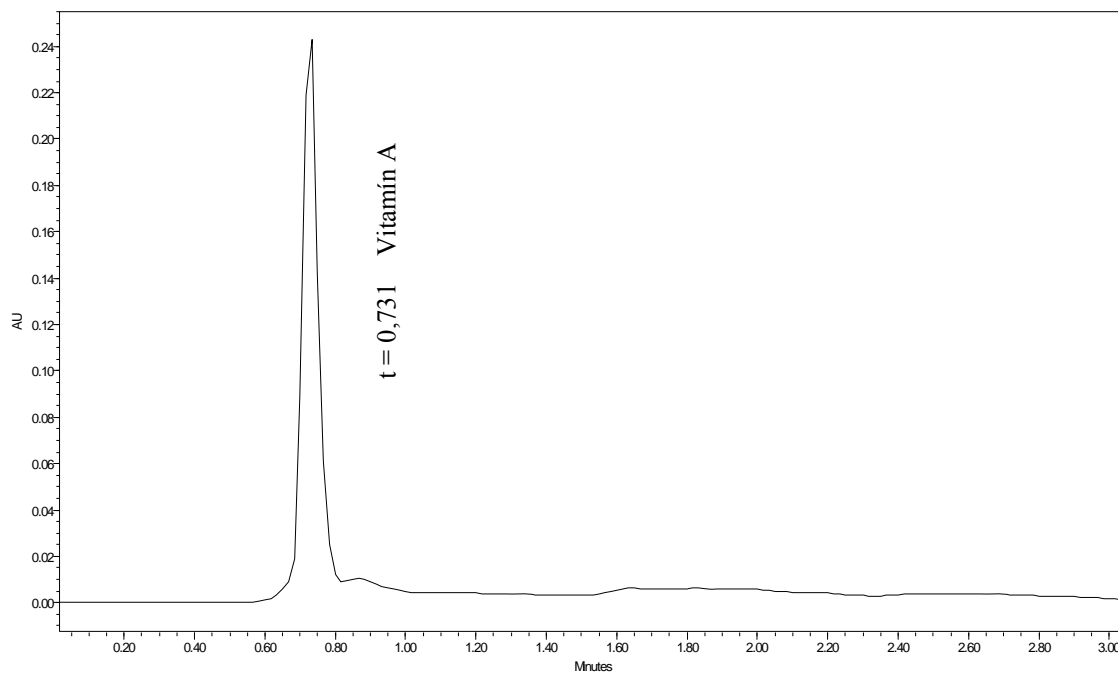
V chromatogramu supernatantu vzniklého rozpouštěním směsí hexanu a methanolu se objevoval trojitý pík, čímž se tato metoda stala nepoužitelnou.

Směs rozpouštědel tvořená hexanem a acetonitrilem měla lepší výsledek, obsah vitamínu A při použití dvojitě ultrazvukové lázně dosáhl 72,38% (Obr. 19). Při použití ultrazvuku a třepačky obsah činil 88,46% (Obr. 20).

U obou těchto možností byla zjišťována i výtěžnost. První typ, tedy dvojitá lázeň měla výtěžnost $R_A = 75,04\%$ pro vitamín A a $R_D = 102,28\%$ pro vitamín D. U druhého typu metody s ultrazvukem a třepačkou činila $R_A = 91,96\%$ a $R_D = 100,92\%$.



Obr. 19 : Extrakce směsí hexanu a ACN při použití ultrazvukové lázně na Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 2 ml/min; nástřik o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290nm.

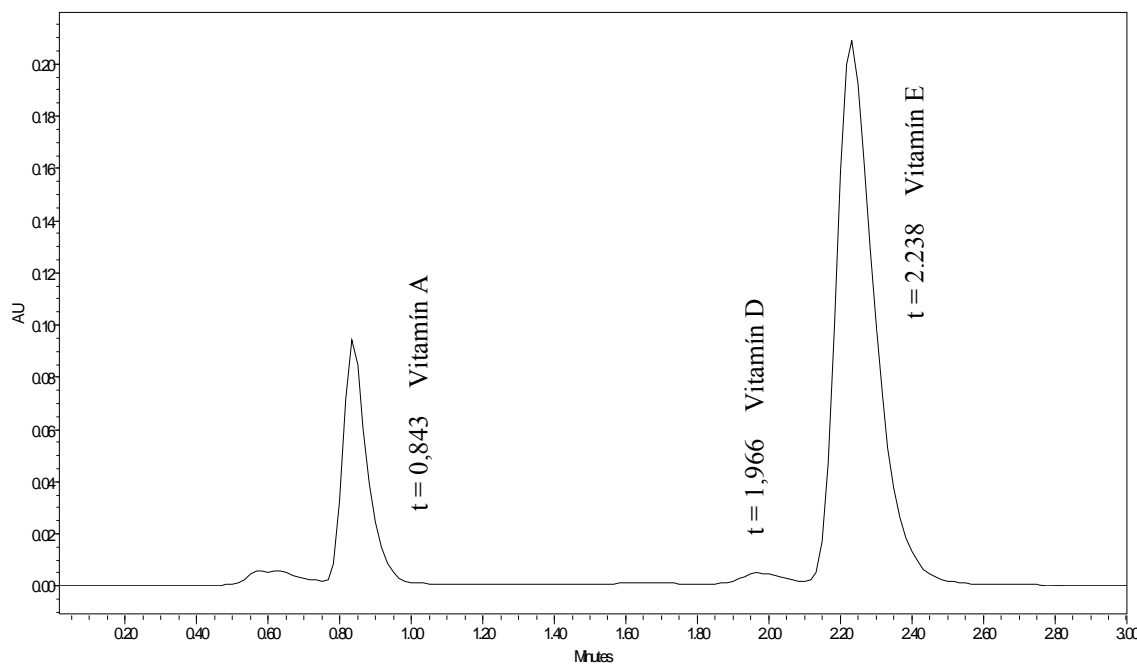


Obr. 20 : Extrakce směsí hexanu a ACN při použití třepačky na Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 2 ml/min; nástřik o objemu 20,0 μ l; UV detekce při 290nm.

6.2.2.5 Extrakce methanolem

Poslední zkoušená metoda měla otestovat použití methanolu jako nevhodnějšího rozpouštědla z předchozích zkoušek (Obr. 21).

Výsledný obsah vitamínu A činil 101,46% v prvním případě, 82,51% ve druhém, 77,52% v následujícím a 129,59% ve čtvrtém. Ze získaných hodnot bylo patrné, že metoda není opakovatelná (odchylka obsahů může činit maximálně 5%), proto nebyly zjištěny obsahy v posledních dvou vzorcích.



Obr. 21 : Extrakce methanolem na koloně Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm); mobilní fáze ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 2 ml/min; nástřik o objemu 20,0 µl; UV detekce při 290 nm.

6.2.3 Souhrn výsledků extrakcí

I přes velké množství zkoušených extrakcí se nepodařilo najít metodu, u které by výsledný obsah obou vitamínů přesáhl 95%. Důvodem je přílišná složitost matrice vzorku, kterou tvoří hned několik přírodních mast'ových základů. Většina zvolených rozpouštědel vykazovala vyhovující vlastnosti pro extrakci z jednotlivých mast'ových základů. Nebyla však vhodná pro analýzu reálných vzorků, především z důvodu rozpouštění některé části mast'ové matrice.

7. SOUHRN

7.1 **Optimalizace chromatografických podmínek**

Vycházením z absorpčních spekter vitamínů byla nalezena vhodná vlnová délka pro hledanou metodu. Zvolená vlnová délka je 290 nm, což odpovídá maximu absorpčního spektra vitamínu A.

Bylo testováno šest analytických kolon, u každé byly prozkoušeny čtyři mobilní fáze a různé průtoky.

U první analytické kolony, kterou byla Chromolith Flash RP-18e (25 x 4,6 mm) byly proměřeny dříve uvedené základní mobilní fáze. Optimálními podmínkami pro tuto kolonu se ukázaly : mobilní fáze IV, kterou je ACN : MeOH : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v); průtok 1 ml/min a nástřik o objemu 20,0 μ l. Kvůli vitamínu A, který se v těchto podmínkách eluoval v retenčním čase blízkém času mrtvého objemu, se tato kolona stala nevhodnou pro hledanou metodu.

Během testování druhé kolony, kterou se stala Chromolith Fast Gradient RP-18e (50 x 2 mm) byly prozkoušeny tytéž parametry jako u předchozí kolony. Optimálního výsledku bylo dosaženo se stejnou mobilní fází a nástřikem, rychlost průtoku však v tomto případě činila 0,5 ml/min. Ze stejného důvodu jako u první kolony byla shledána tato kolona nevyhovující.

Třetí zkoušenou byla částicová kolona X-bridge Shield RP-18 (50 x 3 mm; 2,5 μ m). Vzhledem k typu kolony byl postup změněn. Byly proměřovány pouze nižší průtoky a testována nová mobilní fáze - acetonitril : methanol : voda v poměru 48 : 48 : 4 (v/v/v). Tato fáze v průtoku 0,2 ml/min byla nakonec pro kolonu optimální, ale z důvodu mírného chvostování chromatografických píků nevyhovovala ideálním podmínkám pro hledanou metodu.

Další testovanou kolonou se stala Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm), která byla nakonec vybrána jako ideální pro hledanou metodu spolu s mobilní fází IV, průtokem 2 ml/min a nástřikem o objemu 20,0 μ l.

Předposlední zkoušenou kolonou byla Gemini 3 μ C18 110A (50 x 3,0 mm; 3 μ m). Také u ní byl, stejně jako u předchozí částicové kolony pozměněn postup. Jako

optimální podmínky byly stanoveny mobilní fáze IV a průtok 1 ml/min. Problémem se stalo rozmývání chromatografických píků v nižších průtokových rychlostech, což neodpovídalo požadavkům na ideální podmínky metody.

Poslední testovanou byla kolona Gemini 3 μ C18 110A (30 x 2,0 mm; 3 μ m). Zkoušení bylo opět pozměněno z důvodu typu této kolony. Optimálními podmínkami se ukázaly nová mobilní fáze a průtok 0,5 ml/min. Přesto kolona neměla dostatečnou separační schopnost pro vitamín A a mrtvý objem. Chromatografické píky také mírně chvostovaly.

7.2 Extrakce vitamínů ze vzorku

7.2.1 Jednostupňová extrakce

Podle dříve uvedené metody byla testována extrakční schopnost některých rozpouštědel. Tam, kde to bylo možné, byl vypočítán obsah extrahovaného vitamínu A ze vzorku, u vybraných rozpouštědel byla vypočítána i výtěžnost metody.

Jednostupňová extrakce byla rozdělena na dvě části podle délky ultrazvukové lázně. Metodou 15-ti minutové lázně bylo testováno celkem sedm rozpouštědel: acetonitril, methanol, hexan, chloroform, tetrahydrofuran, toluen a směs methanol : hexan v poměru 6 : 4 (v/v). Nejlepšího výsledku dosáhla směs rozpouštědel, obsah vitamínu A dosáhl 78,42%. Během extrakce toluenem docházelo k částečnému odpaření tohoto rozpouštědla, čímž se výsledek stal zkresleným. Ostatní rozpouštědla kromě methanolu rozpouštěla i mast'ový základ vzorku, což u tetrahydrofuranu vyvrcholilo tím, že se tento základ vysrážel ve vialce. Tato analýza nemohla být provedena.

Metodou 35-ti minutové lázně bylo zkoušeno celkově šest rozpouštědel: acetonitril, methanol, hexan, chloroform, aceton a ethanol. U všech s výjimkou methanolu docházelo opět k částečnému rozpouštění mast'ového základu. Ten se vysrážel ve vialce při extrakci acetonem a ethanolom, kvůli čemuž nemohla být analýza dokončena. Během analýzy s použitím hexanu a chloroformu docházelo k odpařování rozpouštědla, což vedlo k zakoncentrování vzorku. Přesto u nich a u methanolu byla počítána i výtěžnost metody. Nebyla dosažena očekávaná hodnota výtěžnosti, proto byly zkoušeny další možnosti, u kterých byla použita rozpouštědla s vhodným potenciálem.

7.2.2 Vícetupňová extrakce

Předchozími dvěma metodami bylo zjištěno, že většina zvolených extrakčních činidel rozpouští některou ze součástí mast'ového základu, který se postupem času vysráží ve vialce. Čímž vzniká riziko znehodnocení stacionární fáze a znemožnění analýzy. Vícetupňové extrakční metody měly zajistit předčasné vysrážení tohoto základu, který by se poté dal odstranit.

Metodou vloženého vymrazování trvajícího 15 minut byl testován aceton, ethanol a isopropylalkohol. Analýzou bylo zjištěno, že jsou to rozpouštědla nevhodná pro hledanou metodu z důvodu malé extrakční schopnosti.

Druhou metodou byla postupná extrakce hexanem a methanolem. Ukázala se naprosto nevhodnou kvůli nedostatečné separaci píků na chromatogramu, a to jak při použití dvojité ultrazvukové lázně, tak při použití ultrazvuku a třepačky.

Extrakce směsí hexanu a chloroformu v poměru 1 : 1 (v/v) i směsí hexanu a methanolu ve stejném poměru měla tentýž výsledek, který spočíval v rozpuštění značné části masťového základu, čímž hrozilo nebezpečí znehodnocení stacionární fáze. Z tohoto důvodu nebyly vzorky analyzovány.

Modifikací již zkoušené druhé metody se stala postupná extrakce hexanem a methanolem/acetonitrilem. Výsledkem obou analýz směsí s methanolem byla nedostatečná separace extrahovaných složek. U směsí s acetonitrilem byl vypočten obsah vitamínu i výtěžnost metody. Obsah vitamínu A u dvojité ultrazvukové lázně byl 72,38%, výtěžnost činila $R_A = 75,04\%$ pro vitamín A a $R_D = 102,28\%$ pro vitamín D. Obsah vitamínu A u lázně spolu s třepačkou dosáhl 88,46%. Výtěžnost byla vypočítána na $R_A = 91,96\%$ a $R_D = 100,92\%$.

Poslední metoda testovala extrakční schopnosti methanolu jako nejvhodnějšího rozpouštědla. Některé z vypočítaných obsahů vitamínu A odpovídaly hledaným hodnotám, ale výsledky vykazovaly velmi nízkou opakovatelnost.

8. ZÁVĚR

Byly nalezeny vhodné chromatografické podmínky pro stanovení obsahu vitamínů A a D pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Jako ideální vlnová délka pro UV detekci stanovovaných látek byla zvolena hodnota $\lambda = 290$ nm. Nejvhodnější kolonou z celkově šesti testovaných se stala analytická kolona Onyx Monolithic C18 (50 x 4,6 mm) s předkolonou (5 x 4,6 mm), která měla nejlepší separační vlastnosti. Optimální mobilní fáze byla směs acetonitril : methanol : voda v poměru 49 : 49 : 2 (v/v/v). Jako optimální rychlost průtoku mobilní fáze byla zvolena hodnota 2 ml/min.

I přes velké množství testovaných možností nebyla nalezena optimální metoda extrakce vitamínů A a D z Infadolanu. Dalším postupem by mohlo být vyzkoušení saponifikace masti a následná extrakce vitamínů methanolem.

9. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Škop B. et al.: Informační systém humánních, homeopatických a veterinárních léčivých přípravků registrovaných v České republice a na Slovensku (AISLP), Mikro-verze AISLP ČR verze 2010.1 pro MS Windows.
- [2] Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: Farmakologie a toxikologie, Grada Publishing, Praha 2004.
- [3] Klouda P.: Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [4] Karlíček R. a kol.: Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, Praha 1998.
- [5] Klimeš J. a kol.: Kontrola léčiv I., Karolinum, Praha 2002.
- [6] Jandera P.: *Pokroky ve vývoji kolon pro HPLC – současný stav a perspektivy*, www.vitamins.cz/archiv/2003/doc/w/HPLC_01.doc (leden 2011)
- [7] Švec F.: *Monolithic Stationary Phases. Place of Birth: Prague*, Chem. Listy 98(5) (2004) 232-238.
- [8] <http://www.merck-chemicals.cz> (leden 2011)
- [9] <http://www.chromservis.cz> (leden 2011)
- [10] Churáček J. a kol.: Analytická separace látek, SNR, Praha 1990.
- [11] Štulík K. a kol.: Analytické separační metody, Karolinum, Praha 2005.
- [12] Jandera P., Churáček J.: Gradient Elution in Column Liquid Chromatography, Elsevier, Amsterdam 1985.
- [13] <http://www.hplc.cz> (leden 2011)
- [14] <http://www.waters.com> (leden 2011)
- [15] Český lékopis 2009, doplněk 2010, Grada Publishing, Praha 2010.

- [16] <http://www.chromatography-online.org> (leden 2011)
- [17] Gabbanini S., Matera M., Beltramini C., Minghetti A., Valgimigli L.: *Analysis of in vitro release through reconstructed human epidermis and synthetic membranes of multi-vitamins from cosmetic formulations*, J. Pharm. Biomed. Anal. 52(4) (2010) 461-467.
- [18] Salo-Väänänen P., Ollilainen V., Mattila P., Lehikoinen K., Salmela-Mölsä E., Piironen V.: *Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction*, Food Chem. 71 (4) (2000) 535-543
- [19] Escrivá A., Esteve M.J., Farré R., Frígola A.: *Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 947(2) (2002) 313-318.
- [20] Heudi O., Trisconi M.J., Blake Ch.J.: *Simultaneous quantification of Vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography–mass spektrometry*, J. Chromatogr. A 1022(1-2) (2004) 115–123.
- [21] Sau Man Po E., Ho J.W., Gong B.Y.: *Simultaneous chromatographic analysis of eight fat-soluble vitamins in plasma*, J. Biochem. Biophys. Methods 34(2) (1997) 99-106.
- [22] Gentili A., Caretti F.: *Evaluation of a method based on liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry for a rapid and comprehensive characterization of the fat-soluble vitamin and carotenoid profile of selected plant foods*, J. Chromatogr. A 1218(5) (2011) 684–697.
- [23] Kamaoa M., Tsugawa N., Suhara Y., Wada A., Mori T., Murata K., Nishino R., Ukita T., Uenishi K., Tanaka K., Okano T.: *Quantification of fat-soluble vitamins in human breast milk by liquid chromatography–tandem mass spektrometry*, J. Chromatogr. B 859(2) (2007) 192–200.
- [24] Gomis D.B., Fernández M.P., Gutiérrez Alvarez M.D.: *Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography*, J. Chromatogr. A 891(1) (2000) 109-114.