



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



Diplomová práce

# **Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných aktivních látek v potravních doplňcích**

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

Hradec Králové 2012

**Bc. Kateřina Jägerová**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu diplomové práce panu Doc. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky při konzultacích v průběhu psaní této práce a v neposlední řadě za jeho vstřícnost a trpělivost.

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

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

Dne ..... v Hradci Králové

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Kateřina Jägerová

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

Název diplomové práce: Vývoj HPLC metody pro stanovení vybraných aktivních látek v potravních doplňcích

V této práci byla vyvinuta HPLC metoda pro současné stanovení rutinu, troxerutinu, diosminu a hesperidinu. Vypracovaná metoda byla aplikována na stanovení výše uvedených analytů ve farmaceutických přípravcích a potravních doplňcích, Cilkanol (Zentiva), Detralex (Les Laboratoires), Hemodin Prebio Forte (Valosun a. s.), MobiVen Micro (Vulm cz a. s.).

Pro analýzu byla použita kolona na Ascentis Express RP – Amide (10 cm x 3,0 mm, 2,7  $\mu$ m) Supelco Analytical, s využitím mobilní fáze o poměru acetonitril/voda 30/70 s přidavkem kyseliny octové na úpravu pH 3. Analýza látek probíhala při průtoku 1 ml/min, teplotě 50°C a tlaku 18,6 MPa.

Byla zvolena vlnová délka 283 nm pro hesperidin a 255 nm pro rutin, troxerutin a diosmin. Pro detekci byl použit DAD detektor.

Klíčová slova: HPLC, rutin, troxerutin, diosmin, hesperidin, flavonoidy, potravní doplňky

## **Abstract**

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Kateřina Jägerová

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

Title of Diploma Thesis: HPLC method development of active substances determination in nutraceuticals

A high performance liquid chromatography (HPLC) method with diode array detection (DAD) was used and validated for the simultaneous determination rutin, troxerutin, diosmin and hesperidin. The method was used for direct determination of this flavonoids in pharmaceutical preparations and nutraceuticals, Cilkanol (Zentiva), Detralex (Les Laboratoires), Hemodin Prebio Forte (Valosun a. s.), MobiVen Micro (Vulm cz a.s.). Using Ascentis Express RP – Amide (10 cm x 3.0 mm, 2.7  $\mu\text{m}$ ) Supelco Analytical column, the following conditions were chosen as optimal: mobile phase acetonitril/water 30/70 containing acetic acid for pH adjustment to value pH 3. Method development was performed within a temperature of 50°C and pressure of 18.6 MPa. The flavonoids were detected by diode array detector (DAD) at the wavelength of 283 nm and 255 nm.

Keywords: high performance liquid chromatography (HPLC), flavonoids, rutin, troxerutin, diosmin, hesperidin, nutraceuticals

# OBSAH

<b>1</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE</b> .....	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>13</b>
4.1	FLAVONOIDY .....	13
4.1.1	Rutin .....	14
4.1.1.1	Metody stanovení rutinu .....	15
4.1.2	Troxeutin .....	15
4.1.2.1	Metody stanovení troxeutinu .....	16
4.1.3	Hesperidin.....	16
4.1.3.1	Metody stanovení hesperidinu .....	17
4.1.4	Diosmin .....	18
4.1.4.1	Metody stanovení diosminu.....	19
4.2	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HIGH – PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, HPLC) .....	20
4.2.1	Instrumentace HPLC .....	20
4.2.2	Princip separace látek v kapalinové chromatografii .....	21
4.2.3	Validace analytické metody.....	22
4.2.3.1	Test vhodnosti chromatografického systému .....	22
4.2.3.2	Správnost metody (Accuracy) .....	23
4.2.3.3	Přesnost metody (Precision) .....	23
4.2.3.4	Opakovatelnost metody .....	23
4.2.3.5	Hodnocení linearity.....	23
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>24</b>
5.1	VALIDACE ANALYTICKÉ METODY .....	24
5.2	MATERIÁL, PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	24
5.2.1	Přístroje, podmínky separace.....	24
5.2.2	Standardy .....	25
5.2.3	Testované potravinové doplňky a farmaceutické přípravky .....	26
5.2.4	Chemikálie.....	26
5.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ .....	26
5.3.1	Příprava zásobního roztoku .....	26
5.3.2	Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu.....	27
5.3.3	Příprava pracovních roztoků pro kalibraci .....	27
5.3.4	Příprava vzorku z tablety .....	27
5.3.4.1	Cilkanol.....	27
5.3.4.2	Detralex.....	28
5.3.4.3	MobiVen Micro .....	28
5.3.4.4	Hemodin Prebio Forte.....	28
5.3.5	Správnost .....	29
5.3.5.1	Cilkanol.....	29
5.3.5.2	Detralex.....	29
5.3.5.3	MobiVen Micro .....	29

5.3.5.4	Hemodin Prebio Forte.....	29
5.3.6	Přesnost.....	30
5.3.6.1	Cilkanol.....	30
5.3.6.2	Detralex.....	30
5.3.6.3	MobiVen Micro .....	30
5.3.6.4	Hemodin Prebio Forte.....	30
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>31</b>
6.1	OPTIMALIZACE METODY .....	31
6.1.1	Volba vlnové délky.....	31
6.1.1.1	Absorpční spektrum RUTIN.....	32
6.1.1.2	Absorpční spektrum TROXERUTIN .....	33
6.1.1.3	Absorpční spektrum HESPERIDIN.....	34
6.1.1.4	Absorpční spektrum DIOSMIN.....	35
6.1.1.5	Absorpční spektrum METHYLPARABEN.....	36
6.1.2	Volba vnitřního standardu .....	36
6.1.3	Volba kolony a mobilní fáze .....	36
6.1.4	Optimální podmínky pro HPLC analýzu.....	45
6.2	VALIDACE ANALYTICKÉ METODY .....	45
6.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému .....	45
6.2.1.1	Účinnost chromatografického systému-počet teoretických pater (N) .....	45
6.2.1.2	Asymetrie chromatografických píků (T) .....	46
6.2.1.3	Rozlišení chromatografických píků R .....	46
6.2.2	Linearita.....	48
6.2.2.1	Kalibrační závislost pro diosmin .....	48
6.2.2.2	Kalibrační závislost pro hesperidin.....	49
6.2.2.3	Kalibrační závislost pro rutin.....	50
6.2.2.4	Kalibrační závislost pro troxerutin .....	51
6.2.2.5	Kalibrační závislost pro methylparaben .....	52
6.2.3	Opakovatelnost .....	52
6.2.4	Přesnost.....	53
6.2.4.1	Hemodin Prebio Forte.....	53
6.2.4.2	Cilkanol.....	54
6.2.4.3	Detralex.....	55
6.2.4.4	MobiVen Micro .....	55
6.2.5	Správnost metody .....	56
6.2.5.1	Správnost Cilkanol.....	56
6.2.5.2	Správnost Detralex.....	57
6.2.5.3	Správnost Hemodin Prebio Forte.....	57
6.2.5.4	Správnost MobiVen Micro .....	58
6.3	STANOVENÍ OBSAHU ÚČINNÝCH LÁTEK V POTRAVNÍCH DOPLŇCÍCH A VE FARMACEUTICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH .....	59
6.3.1	Stanovení obsahu troxerutinu v přípravku Cilkanol.....	60
6.3.2	Stanovení obsahu hesperidinu a diosminu v přípravku Detralex .....	61
6.3.3	Stanovení obsahu hesperidinu a diosminu v přípravku MobiVen Micro ..	62
6.3.4	Stanovení obsahu rutinu, diosminu a hesperidinu v přípravku Hemodin Prebio Forte .....	63
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>64</b>

<b>8</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>66</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>68</b>
<b>10</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>69</b>



# 1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HPLC	– vysokoúčinná kapalinová chromatografie
$K_D$	– distribuční (rozdělovací) konstantou
$V_R$	– retenční objem
$t_R$	– retenční čas
$t'_R$	– redukovaný retenční čas
$F_m$	– objemová rychlost [ $\text{cm}^3/\text{s}$ ]
$t_M$	– mrtvý retenční čas
NP	– normal phase chromatography
RP	– reversed - phase chromatography
LDL	– low density lipoprotein
UV-VIS	– Ultrafialová/viditelná oblast spektra světla
DAD	– Diode array detector
Zn	– SOD – Superoxide dismutase
CAT	– katalasa
GPx	– Glutathionperoxidasa
NF	– $\kappa\text{B}$ p65 – Nukleární faktor – kappa B
iNOS	– inducible nitric oxide synthase
COX - 2	– cyklooxygenasa 2
ALT	– alaninaminotransferasa
AS	– aspartátaminotransferasa
MeCN	– acetonitril
DMSO	– dimethylsulfoxid
MeOH	– methanol
SD	– směrodatná odchylka
RSD	– relativní směrodatná odchylka
RUT	– rutin
HES	– hesperidin
DIO	– diosmin
TRO	– troxerutin
$w_{0,05}$	– šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky
N	– počet teoretických pater
MP	– methylparaben

T	– Asymetrie chromatografických píků
R	– Rozlišení chromatografických píků
f	– menší část úsečky $w_{0,01}$ , která vznikne protnutím úsečky kolmicí spuštěnou z vrcholu píku
$w_{0,01}$	– šířka píku ve vzdálenosti 5 % výšky píku
$w_{0,5}$	– šířka píku v polovině jeho výše
v/v	– objemová procenta
n	– počet bodů
k	– směrnice
q	– absolutní člen
r	– korelační koeficient
s	– reziduální odchylka
h. v.	– hladina významnosti
RP	– Reverse phase, reverzní fáze
$R_i$	– recovery, výtěžnost
TBARS	– Thiobarbituric Acid Reactive Substances, látky reaktivní s kyselinou barbiturovou

## 2 ÚVOD

Flavonoidy, jinak nazývané bioflavonoidy či vitamín P, jsou velká skupina látek přesahující 4000 sekundárních metabolitů rostlin. Kromě různých druhů ovoce a zeleniny jsou flavonoidy obsaženy v semenech, ořeších, obilovinách, kořeni a různých léčivých rostlinách, stejně jako v nápojích jako je víno a čaj. Flavonoidy mají širokou škálu pozitivních vlastností pro lidský organismus zahrnující antialergickou, antivirovou, protizánětlivou a zejména antioxidační aktivitu.

U flavonoidů rutinu, troxerutinu, diosminu a hesperidinu je patrný příznivý vliv především na cévy, využívají se hlavně pro snížení kapilární fragility, zvýšení venózního tonu a pro zlepšení mikrocirkulace.

Kapalinová chromatografie je pro stanovení flavonoidů v současné době obecně preferovanou metodou. V teoretické části jsou uvedeny parametry stanovení jednotlivých látek nebo jejich současné stanovení v kombinaci s jinými látkami pomocí HPLC metody.

V této práci byla vyvinuta HPLC metoda pro současné stanovení látek rutinu, troxerutinu, diosminu a hesperidinu. Postup, optimalizace metody, výsledné optimální podmínky separace jsou uvedeny v experimentální části práce. Danou metodou bylo analyzováno množství jednotlivých stanovovaných látek a to rutinu, troxerutinu, diosminu a hesperidinu v přípravcích Cilkanol, Detralex, Hemodin Prebio Forte, MobiVen. Obsah jednotlivých látek stanovených metodou a deklarovaných látek je uveden v experimentální části spolu s validačními parametry.

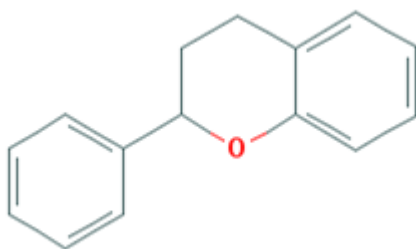
### **3 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE**

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat, vyvinout a validovat novou metodu HPLC separace biologicky aktivních flavonoidů a to rutinu, troxerutinu, diosminu a hesperidinu. Dalším cílem práce bylo aplikovat vyvinutou separační metodu na analýzu vybraných potravních doplňků a farmaceutických přípravků dostupných na trhu v ČR.

## 4 TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 Flavonoidy

Flavonoidy, jinak nazývané bioflavonoidy či vitamín P, jsou velká skupina látek přesahující 4000 sekundárních metabolitů rostlin. Kromě různých druhů ovoce a zeleniny jsou flavonoidy obsaženy v semenech, ořeších, obilovinách, kořeni a různých léčivých rostlinách, stejně jako v nápojích jako je víno (obzvláště červené víno) a čaj [1]. U rostlin se vyskytují ve formě aglykonů nebo glykosidů [2]. Jejich prekurzory jsou chalkony, které vznikají kondenzací *p* – kumaron – CoA a tří molekul malonyl – CoA. Základní skelet flavonoidů je tvořen dvěma benzenovými jádry spojenými heterocyklickým kruhem pyranem/pyronem. Fenylochroman (flavan) může být modifikován oxidací (přítomnost další dvojné vazby), redukcí karbonylu, ionizací heterocyklického kyslíku nebo izomerizací na 3 – fenylochroman [5].



Obrázek 1 – Vzorec 2 – Fenylochromanu [20]

Mnoho studií naznačuje, že flavonoidy mají vlastnosti zahrnující antialergickou, antivirovou, protizánětlivou a vasodilatační aktivitu. Největší zájem je věnován jejich antioxidační aktivitě [1]. Antioxidační aktivita flavonoidů zahrnuje více mechanismů, mezi které patří potlačení formování reaktivních kyslíkových radikálů, vylučování reaktivních kyslíkových radikálů, dále regulace a ochrana antioxidačního obranného systému [1]. Potlačení formování reaktivních kyslíkových radikálů může probíhat buď inhibicí enzymů nebo chelatací iontů přechodných kovů. Ionty přechodných kovů, obzvláště volné železo a měď, potenciálně přispívají k tvorbě vysoce reaktivních hydroxylových radikálů. Měď navíc zprostředkovává LDL oxidaci. V poslední době se velké množství studií věnuje potenciálním protirakovinným účinkům flavonoidů. Tyto efekty jsou v mnoha případech přisuzovány možným biochemickým mechanismům zahrnující apoptózu, zástavu růstu u jednoho nebo více bodů buněčného cyklu nebo inhibici syntézy DNA. Další možný efekt flavonoidů spočívá ve změně signálu

transdukce drah změnou exprese klíčových enzymů jako je cyklooxygenasa a proteinová kinasa [9].

#### 4.1.1 Rutin

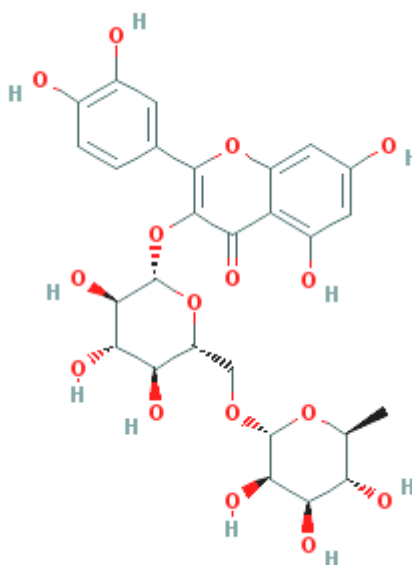
Sumární vzorec  $C_{27}H_{30}O_{16}$

Registrační číslo CAS 153 – 18 – 4

Molární hmotnost 610,52 g/mol [16]

Vzhled: světle žlutý prášek

$pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$  = 7,1; 9,15; 11,65 [33]



Obrázek 2 – Vzorec rutinu [16]

Rutin je žlutá nebo žlutozelená látka krystalů jehlovitého tvaru, která je obsažena v širokém množství rostlin, zvláště v pohance, citrusovém ovoci, černém čaji a v jablečných slupkách. Jedná se o glykosid obsahující aglykon querceptin a disacharid rutinosu. Za normálních okolností je metabolizován na querceptin [9]. Ukazuje se, že rutin má širokou škálu farmakologických účinků zahrnující antialergické, protizánětlivé, protivirové, antiproliferativní a protirakovinné vlastnosti [2]. Rutin se používá k léčbě zvýšené lomivosti a propustnosti krevních vlásečnic způsobených chorobami jako je chorobná krvácivost na podkladě cévním, změna na sítnici při cukrovce nebo při nedostatku vitamínu C. Za velmi důležitou se považuje jeho antioxidační schopnost, tj. schopnost působit proti volným radikálům [4].

#### 4.1.1.1 Metody stanovení rutinu

1) RP – HPLC/UV – VIS

Xtimate™ C 18 kolona, (250 mm x 4,6 mm, 5 μm), izokratická eluce, mobilní fáze 0,1 % vodný roztok kyseliny fosforečné a methanolu 50:50 (v/v) [12].

2) RP – HPLC/UV – VIS

Spheriosorb ODS – 2 (Alltech), (150 x 4,6 mm, 5 μm), gradientová eluce,

Solvent A 0,5 % vodný roztok kyseliny fosforečné

Solvent B 0,5 % roztok kyseliny fosforečné a acetonitrilu

Touto metodou byl současně stanovován rutin a protodioscin [11].

3) RP-HPLC/UV

Zorbax Extend C 18 (Agilent, USA), (150 mm x 46 mm, 5 μm), izokratická eluce

Methanol/voda 1:1 (v/v) s přidavkem kyseliny fosforečné na úpravu pH 2,8 [29].

4) RP - HPLC/DAD

HIQ SIL C18 V (KYA TECH Corporation, Japan), (4,6 mm x 250 mm, 5 μm),

izokratická eluce

Methanol/acetonitril/voda (40:15:45 v/v/v) obsahující 1,0 % kyseliny octové [30].

#### 4.1.2 Troxerutin

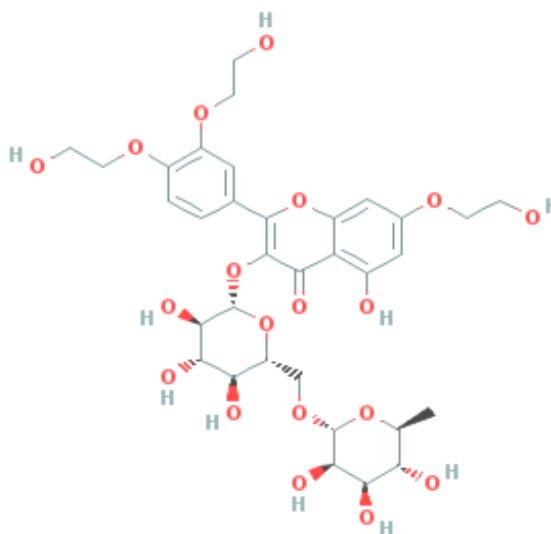
Sumární vzorec C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>O<sub>19</sub>

Registrační číslo CAS 56764 – 99 – 9

Molární hmotnost 742,67518 g/mol [17]

Vzhled: žlutý prášek

pKa = 6,59 [48]



Obrázek 3 – Vzorec troxerutinu [17]

Troxeutin je derivát rutinu, přítomný v kávě, obilovinách a v mnoha druzích ovoce a zeleniny. Je známý jako radikálový scavenger s antioxidačním efektem [23]. Troxeutin má mnoho pozitivních účinků na lidský organismus, mezi které patří redukce kapilární fragility, působení proti vzniku edémů a to jak redukcí kapilární permeability, tak i snížením kapilární filtrace elektrolytů a vody. Další vlastností troxeutinu je pozitivní efekt na reologii krve. Byla pozorována redukce agregace trombocytů i erytrocytů a lepší deformovatelnost erytrocytů. [23]. Nedávné studie se snažily prokázat antioxidační a protizánětlivé účinky troxeutinu při ochraně jater. Efekt troxeutinu na lipoperoxidaci, antioxidační enzymatickou aktivitu a expresi zánětlivých mediátorů byl vyšetřován u myši, kterým byla podávána D-galaktosa. Výsledky ukazují, že troxeutin ve velké míře zmírňuje D- galaktosou navozené TBARS a zároveň zvyšuje aktivitu Cu, Zn – SOD, CAT a GPx antioxidačních enzymů jater. Navíc troxeutin snižuje expresi NF –  $\kappa$ B p65, iNOS a COX – 2 indukované D – galaktosou, a tím snižuje zánětlivý proces. Bylo pozorováno potlačení změny stavby jater a zvýšení sérové ALT a AST. Protektivní účinek troxeutinu spočívá v tom, že svým působením snižuje lipoperoxidaci, obnovuje aktivitu antioxidačních enzymů a potlačuje zánětlivou odpověď [2]. Troxeutin je nejčastěji využíván na léčbu křečových žil nebo hemoroidů. Používá se také pro snížení výskytu nočních křečí nohou a dalších cirkulačních problémů [9].

#### 4.1.2.1 Metody stanovení troxeutinu

##### 1) RP-HPLC/UV-VIS

VP - OSD Shimadzu (Kyoto, Japan), (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), izokratická eluce

Mobilní fáze byla připravena jako směs vody, methanolu a kyseliny octové v poměru (57:43:1), pH = 3.

Současně bylo stanovováno 6 látek [9].

#### 4.1.3 Hesperidin

Sumární vzorec  $C_{28}H_{34}O_{15}$

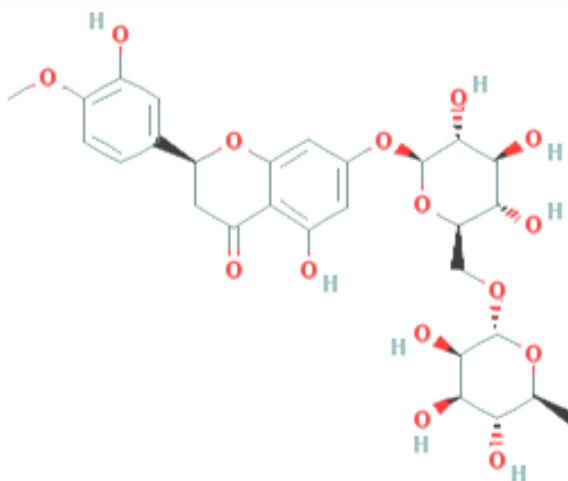
Registrační číslo CAS 520 – 26 – 3

Molární hmotnost 610,56 g/mol [18]

Vzhled: světle žlutý prášek

$pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$  = 9,56; 10,17; 12,36 [34]





Obrázek 4 – Vzorec hesperidinu [18]

Hesperidin je žlutá látka málo rozpustná ve vodě. Byl izolován z citrusů. Jeho aglykon se nazývá hesperetin [6]. Hesperidin má široké spektrum farmakologických účinků, může zlepšovat venózní tonus, zvyšovat mikrocirkulaci, asistuje při hojení venózních vředů. Jeho hlavní využití je při léčbě chronické venózní insuficience, hemoroidů a jako prevence postoperačního tromboembolismu. U studií, ve kterých byl hesperidin testován u kryš, byly prokázány další pozitivní účinky této látky, a to redukce výskytu rakoviny střeva, snížení hladiny cholesterolu a triacylglyceridů a podstatná inhibice aterosklerózy [21]. Mnohé další studie svědčí o příznivém efektu hesperidinu na vaskulární systém vlivem snížení poškození DNA oxidačním stresem. Hesperidin může být prevencí vzniku oxidačních změn u mononukleárních buněk v cirkulující krvi. Dále geny modulované hesperidinem jsou zahrnuty do procesu, který reguluje endotelové interakce (adheze, infiltrace) [8].

#### 4.1.3.1 Metody stanovení hesperidinu

##### 1) RP - HPLC/DAD

C 18 XBridge kolona (Waters), (150 x 4,6 mm, 3 $\mu$ m) gradientová eluce, mobilní fáze 4 % vodný roztok kyseliny octové a acetonitrilu. Současně byly analyzovány tyto látky: rutin, neohesperidin, hesperidin a hesperetin [13].

##### 2) RP - HPLC/DAD

C 18 SunFire kolona (Waters), (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), gradientová eluce  
 solvent A 1 % roztok kyseliny octové  
 solvent B acetonitril s 1 % kyselinou octovou  
 Současně byly analyzovány 3 látky [10].

3) RP – HPLC/UV

Dikma Diamonsil C 18 kolona (Dikma Technologies), (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) gradientová eluce

solvent A voda

solvent B acetonitril

Současně bylo analyzováno 5 látek [15].

4) RP - HPLC/DAD

LUNA C 18 kolona (Phenomenex), (4,6 mm x 250 mm, 5 μm), gradientová eluce

Solvent A methanol

Solvent B 0,1 % vodný roztok kyseliny trifluoroctové

Současně bylo analyzováno 6 látek [27].

5) RP - HPLC/UV

C 8 Capital (Broxburn, UK), (28 x 4,6 μm, 5 μm), izokratická eluce

Voda/acetonitril/kyselina octová (78:19:3 v/v)

Současně byly analyzovány tyto látky hesperidin, diosmin, eriocitrin [28].

#### 4.1.4 Diosmin

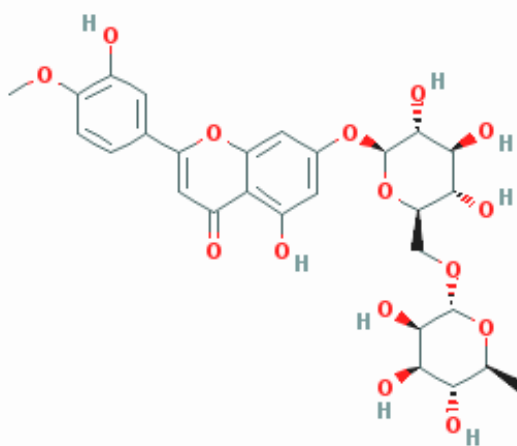
Sumární vzorec  $C_{28}H_{32}O_{15}$

Registrační číslo CAS 520 – 27 – 4

Molární hmotnost 608,545 g/mol [19]

Vzhled: žluto – hnědý prášek

$pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$  = 9,39; 10,07; 12,36 [34]



Obrázek 5 – Vzorec diosminu [19]

Diosmin je přírodní flavonoidní glykosid. Je snadno získatelný dehydrogenací odpovídajícího flavonového glykosidu hesperidinu, který je obsažen v citrusovém ovoci. Diosmin snižuje hladinu lipidů v krvi a má antikarcinogenní účinky. Zvyšuje venózní tonus a mikrocirkulaci a chrání kapiláry, a to především redukcí systémového oxidačního stresu. Diosmin je rychle transformovaný intestinální flórou na jeho aglykon diosmetin [7].

#### 4.1.4.1 Metody stanovení diosminu

1) RP - HPLC/UV

Beta Basic - 18 kolona (Thermo Hypersil, U. K.), (250 mm x 4,6 mm, 5 µm),  
gradientová eluce

Solvent A 5 % roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu

Solvent B 5 % vodný roztok kyseliny mravenčí

Současně bylo analyzováno 12 látek [14].

2) RP – HPLC/UV – VIS

C 18 Lichrosphere 100 kolona (Merck), (250 mm x 4,6 mm, 5 µm),  
gradientová eluce

Solvent A 0,5 % vodný roztok kyseliny fosforečné

Solvent B acetonitril

Solvent C tetrahydrofuran

Současně bylo analyzováno 8 látek [24].

3) RP – HPLC/UV – VIS

Macherey Nagel Nucleosil C 8 kolona (Rigas Labs, Thessaloniki, Greece), (250  
x 4,6 mm, 5 µm), izokratická eluce

Tetrahydrofuran/voda/kyselina octová (21:77:2, v/v/v)

Současně byly stanoveny tyto látky diosmin, hesperidin, naringin [25].

4) RP - HPLC/UV

LiChrosorb RP – 18 kolona (Kontron Analytical), (25 cm x 4,6 mm, 10 µm)  
izokratická eluce

Methanol – voda (60:40 v/v)

Současně byly stanoveny tyto látky diosmin a hesperidin [26].

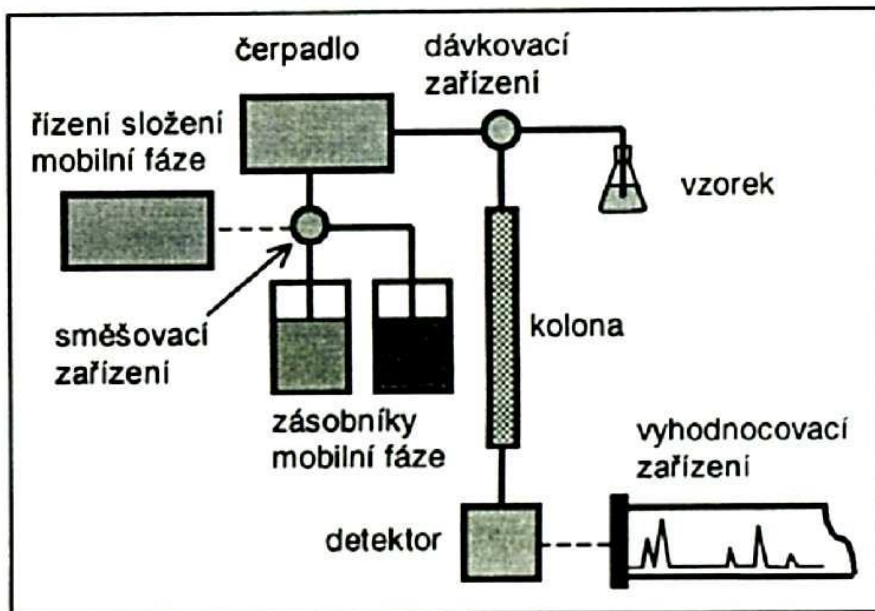
## **4.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High – performance liquid chromatography, HPLC)**

HPLC se vyvinula z plynové chromatografie na počátku 70. let. Vysokých účinností dosahuje použitím stacionárních fází, které obsahují malé částice pravidelného tvaru a jednotné velikosti, jež homogenně vyplňují kolonu. Tím se dosahuje účinností řádově desítek tisíc pater na metr délky kolony. Průtok mobilní fáze je zajištěn vysokým tlakem (jednotky až desítky MPa). Proto také bývá tato metoda někdy nazývána vysokotlaká kapalinová chromatografie (high – pressure liquid chromatography). Dávkuje se malá množství vzorku (řádově mikrolitry). K detekci jsou nutné citlivé detektory, které umožňují kontinuální monitorování látek na výstupu z kolony. Signál detektoru se zpracovává počítačem. Z výše uvedeného je zřejmé, že HPLC vyžaduje poměrně náročnou instrumentaci. Mezi výhody HPLC patří zejména široká oblast použitelnosti: lze analyzovat ionty, látky polární i nepolární, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární. Přibližně 80 % veškerých známých látek je možné analyzovat metodou HPLC [31]. V kapalinové chromatografii se pro separaci využívá adsorpce, rozdělování mezi dvě fáze na základě rozpustnosti (sem patří separace na chemicky vázaných fázích), iontová výměna, biospecifické interakce (molekulové rozpoznávání) a síťový efekt. V reálném chromatografickém systému se obvykle uplatňuje více typů interakcí současně, ale jeden z nich převládá [31]. Adsorpční chromatografie s polárními absorbenty jako stacionárními fázemi historicky předchází chromatografii s nepolárními stacionárními fázemi. Aby se tyto dva základní typy kapalinové chromatografie odlišily, začalo se klasické adsorpční chromatografii s polární stacionární a nepolární mobilní fází často říkat chromatografie s normálními fázemi (normal phase chromatography, NP) a obrácenému typu s nepolární stacionární a polární mobilní fází chromatografie s obrácenými fázemi či běžněji reverzní chromatografie (reversed – phase chromatography, RP). V dnešní analytické praxi je ovšem reverzní chromatografie mnohem běžnější, protože je aplikovatelná na podstatně širší okruh analytů a typů vzorků [31].

### **4.2.1 Instrumentace HPLC**

Blokové schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na Obrázek 6. Odplyněná mobilní fáze se přivádí ze zásobníku mobilní fáze přes filtr do čerpadla. Z čerpadla se vede mobilní fáze do dávkovacího zařízení, téměř výhradně se používají dávkovací ventily se smyčkou. Kolony jsou obvykle vyrobeny z nerezové oceli, avšak mohou být i

skleněné či plastové. Z kolony je eluát veden do detektoru. Signál detektoru se vyhodnocuje počítačem nebo jiným vyhodnocovacím zařízením (zapisovač, integrátor). Mezi běžné detektory používané v HPLC patří detektory spektrofotometrické, fluorimetrické, elektrochemické, hmotnostní a refraktometrické [31].



Obrázek 6 – Schéma kapalinového chromatografu [31]

#### 4.2.2 Princip separace látek v kapalinové chromatografii

V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Stacionární fáze je nepohyblivá, mobilní fáze je pohyblivá. Vzorek je umístěn na začátek stacionární fáze. Pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek touto soustavou unášen. Složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované [22]. Molekula a složky stráví v koloně určitou dobu, která se nazývá retenční čas  $t_R$ . Tato doba se dělí na čas, který molekula setrvává v mobilní fázi – mrtvý retenční čas  $t_M$ , a na čas strávený ve stacionární fázi – redukovaný retenční čas  $t'_R$ . Tyto časy splňují retenční rovnici:

[22]

Další charakteristickou veličinou pro každou separovanou látkou je retenční objem  $V_R$ . Je to objem proteklý kolonou od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky.

Mezi retenčním časem a retenčním objemem existuje vztah:

kde je  $F_m$  objemová rychlost [ $\text{cm}^3/\text{s}$ ] [32].

Záznam závislosti koncentrace solutů na objemu proteklé mobilní fáze nebo na čase se označuje jako chromatogram [31]. Během separace se v koloně neustále vytváří a porušuje fázová rovnováha mezi mobilní a stacionární fází. Děj probíhá nepřetržitě. Složka má při ustanovení rovnováhy ve stacionární fázi koncentraci  $c_s$  a v mobilní fázi  $c_m$ . Poměr mezi těmito koncentracemi je v ideálním případě konstantní a nazývá se distribuční konstanta  $K_D$ , protože charakterizuje distribuci – rozdělení složky mezi obě fáze:

—

[22]

### **4.2.3 Validace analytické metody**

Validaci můžeme definovat jako procedura, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií. Validace je zjednodušeně řečeno ověření platnosti zvoleného analytického postupu (metody) [42].

#### **4.2.3.1 Test vhodnosti chromatografického systému**

##### **4.2.3.1.1 Účinnost chromatografického systému - počet teoretických pater $N$**

Účinnost kolony charakterizuje její schopnost separovat složky směsi. Čím je kolona účinnější, tím lépe dokáže od sebe složky směsi oddělit. Účinnost kolony roste s počtem teoretických pater kolony [22].

##### **4.2.3.1.2 Asymetrie chromatografických píků $T$**

Asymetrie píku je obecně veličina kvality chromatografické kolony. Asymetrie píku je nežádoucí, souvisí s účinností kolony a má negativní vliv na integraci píku zvláště, když je nízký poměr signál – šum. Asymetrie píků lze vyjádřit pomocí tailing faktoru  $T$  [47].

##### **4.2.3.1.3 Rozlišení chromatografických píků $R$**

Rozlišení je vyjádření míry kvality separace dvou sousedních elučnicích křivek. Obecně platí, že rozlišení dvou sousedních píků by nemělo pro spolehlivou kvantifikaci látek dosahovat hodnoty menší než 1,5 [46].

#### **4.2.3.2 Správnost metody (Accuracy)**

Správnost metody je definovaná jako stupeň, do jakého stanovená hodnota analytu ve vzorku odpovídá přijaté referenční hodnotě. Správnost lze vyjádřit jako výtěžnost metody [43].

##### **4.2.3.2.1 Výtěžnost metody – recovery**

Recovery neboli výtěžnost udává poměr množství (koncentrační) analytu získaného danou analytickou metodou ( $n_{II}$ ) k přijaté referenční hodnotě ( $n_I$ ):

—

[43]

#### **4.2.3.3 Přesnost metody (Precision)**

Přesnost metody vyjadřuje těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky zkoušek získanými za předem definovaných podmínek. Přesnost se vyjadřuje jako směrodatná odchylka resp. relativní směrodatná odchylka (RSD) [43].

#### **4.2.3.4 Opakovatelnost metody**

Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti (podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí) [45].

#### **4.2.3.5 Hodnocení linearity**

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. V současné době se k hodnocení linearity téměř výhradně používá korelační koeficient [44].

Korelační koeficient je charakterizován jako těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných [45].

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Validace analytické metody

### 5.2 Materiál, přístroje a pomůcky

#### 5.2.1 Přístroje, podmínky separace

*Tabulka 1 – Přístroje podmínky separace*

<i>Chromatografická sestava:</i>	Shimadzu LC-10
<i>Pumpy:</i>	LC – 10 AD VP
<i>Degasser:</i>	DGU-14 A
<i>Autosampler:</i>	SIL – HTA
<i>Termostat kolony:</i>	CTO – 10 AC VP
<i>Detektor:</i>	DAD detektor SPD – M10A VP
<i>Vyhodnocení:</i>	Chromatografický software LC Solution
<i>Kolony:</i>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Synergi Hydro RP – 80 A 75 x 3,00 mm, 4 <math>\mu</math> Phenomenex</li><li>2. Synergi POLAR – RP 80 A 75 x 3,00 mm, 4 <math>\mu</math> Phenomenex</li><li>3. Synergi FUSION – RP 80 75 x 3,00 mm, 4 <math>\mu</math> Phenomenex</li><li>4. Ascentis Express Phenyl – Hexyl 10 cm x 3,00 mm, 2,7 <math>\mu</math>m Supelco Analytical</li><li>5. Ascentis Express RP – Amide 10 cm x 3,0 mm, 2,7 <math>\mu</math>m Supelco Analytical</li><li>6. Gemini 3 <math>\mu</math> C 18 110 A 50 x 3,0 mm, 3 <math>\mu</math>m Phenomenex</li><li>7. Ascentis Express C 18</li></ol>



- 3 cm x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m  
Supelco Analytical
8. Onyx Monolithic C 18  
100 x 4,6 mm  
Phenomenex
9. Synergi Hydro - RP 80 A  
75 x 3,00 mm, 4  $\mu$ m  
Phenomenex
10. ZORBAX SB – CN  
4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m  
Agilent
11. ZORBAX TMS  
4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m  
Agilent

<i>Dávkování:</i>	5 $\mu$ l
<i>Detekce:</i>	UV 220; 255 a 283 nm
<i>Mobilní fáze:</i>	Acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 30:70
<i>Izokratický režim</i>	
<i>Teplota:</i>	50°C
<b>pH metr:</b>	Hanna intrumens
<b>Ultrazvuková lázeň:</b>	Tescon 1, Tesla, ČR
<b>Centrifuga:</b>	EBA 21, Hettich Zentrifugen, Germany
<b>Analytické váhy:</b>	Sartorius GENIUS, SRN
Ostatní pomůcky:	
	PTFE filtry o velikost pórů 0,45 $\mu$ m
	Pipety (BRAND)
	Třecí miska s tloučkem
	Běžné laboratorní sklo a pomůcky

### 5.2.2 Standardy

Rutin 95 %, (Sigma – Aldrich)  
Diosmin 95 %, (Sigma – Aldrich)  
Hesperidin 90 %, (Fluka)

Methyl– 4 – hydroxybenzoate, (Fluka)  
Ethyl – p – hydroxybenzoate, (Fluka)  
Propyl – 4 – hydroxybenzoate, (Fluka)  
Butyl – 4 – hydroxybenzoate, (Fluka)  
Kyselina benzoová, (Sigma – Aldrich)  
Kyselina salicylová, (Sigma – Aldrich)  
Kyselina acetylsalicylová, (Sigma – Aldrich)

### **5.2.3 Testované potravinové doplňky a farmaceutické přípravky**

Cilkanol, výrobce: Zentiva, a. s., složení 300 mg troxerutinu v jedné tobolce.

Detralex, výrobce: Les Laboratoires Servier, Francie, složení: 500 mg purifikované mikronisované frakce flavonoidů – 450 mg diosminu, 50 mg hesperidinu v jedné tabletě.

Hemodin Prebio Forte, výrobce Valosun a. s., složení: 225 mg diosmin, 75 mg hesperidin, 40 mg rutin, 360 mg inulin, 20 mg vitamin C v jedné tabletě.

MobiVen Micro, výrobce: Vulm cz a. s., 450 mg diosmin, 50 mg hesperidin (mikronizované bioflavonoidy), 30 mg alfa aescin v jedné tabletě.

### **5.2.4 Chemikálie**

Acetonitril p. a., (Sigma – Aldrich)  
Methanol p.a., (Sigma – Aldrich)  
Kyselina octová, (Sigma Aldrich)  
Dimethylsulfoxid p. a., (Sigma – Aldrich)  
Ultračistá voda

## **5.3 Příprava roztoků**

### **5.3.1 Příprava zásobního roztoku**

Byl připraven zásobní roztok analytu (rutinu, hesperidinu, diosminu a troxerutinu) o koncentraci 2500 mg/l. Zásobní roztok každého analytu byl připravován separátně. Pro přípravu zásobního roztoku bylo naváženo 0,0625 g analytu (rutinu, hesperidinu, diosminu, troxerutinu a methylparabenu) a toto množství bylo rozpuštěno a doplněno po rysku rozpouštědlem do 25 ml odměrných baněk. Pro hesperidin a diosmin byl nejvhodnějším rozpouštědlem DMSO. Rutin, troxerutin a methylparaben byly rozpuštěny v MeOH. Tyto roztoky byly uchovávány při 4°C.

### 5.3.2 Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu

Byl připraven zásobní roztok vnitřního standardu (methylparaben) o koncentraci  $c=25\ 000\ \text{mg/l}$ . Bylo naváženo 2,5 g methylparabenu a toto množství bylo rozpuštěno v 100 ml methanolu. Roztok byl uchováván při 4°C.

### 5.3.3 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Pracovní roztoky pro kalibraci byly připraveny jako směsné roztoky zásobních roztoků (rutinu, hesperidinu, diosminu, troxerutinu a methylparabenu) v koncentračním rozmezí od 500 mg/l do 10 mg/l. Roztok o koncentraci 500 mg/l byl připraven smísením 2 ml od každého zásobního roztoku (rutinu, hesperidinu, diosminu, troxerutinu a methylparabenu) v 10 ml odměrné baňce a poté doplněn MeOH po rysku. Stejným způsobem byly připraveny roztoky o koncentraci 400 mg/l, 300 mg/l, 200 mg/l, 100mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 10 mg/l smísením daného množství zásobního roztoku analytu uvedeného v Tabulka 2.

*Tabulka 2 – Příprava pracovních roztoků pro kalibraci, objem analytů v 10 ml roztoku methanolu.*

KONCENTRACE (mg/l)	Objem zásobního roztoku rutinu, troxerutinu, hesperidinu, diosminu, methylparabenu (ml)
500	2,00
400	1,60
300	1,20
200	0,80
100	0,40
50	0,20
25	0,10
10	0,04

### 5.3.4 Příprava vzorku z tablety

#### 5.3.4.1 Cilkanol

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,3256 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi  $\frac{1}{4}$  tablety, tj. 0,0800 g. Naváženo bylo celkem 6 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Vzorek byl vždy rozpuštěn v 10 ml DMSO a bylo do něj

přidáno 1 ml roztoku vnitřního standardu (methylparaben). Tento roztok byl vložen na 10 minut na ultrazvukovou lázeň a poté doplněn po rysku MeOH. Pro přípravu vzorku do vialky bylo napipetováno 100  $\mu$ l této směsi a 900  $\mu$ l MeOH. Vzorek byl přefiltrován membránovým filtrem 0,45  $\mu$ m.

#### **5.3.4.2 Detralex**

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,6713 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi  $\frac{1}{4}$  tablety tj. 0,1600 g. Naváženo bylo celkem 6 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Vzorek byl vždy rozpuštěn v 10 ml DMSO a bylo do něj přidáno 1 ml roztoku vnitřního standardu (methylparaben). Tato roztok byl vložen na 10 minut na ultrazvukovou lázeň, a poté doplněn po rysku MeOH. Pro přípravu vzorku do vialky bylo napipetováno 100  $\mu$ l této směsi a 900  $\mu$ l MeOH. Vzorek byl přefiltrován membránovým filtrem 0,45  $\mu$ m.

#### **5.3.4.3 MobiVen Micro**

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 1,0381 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi  $\frac{1}{4}$  tablety, tj. 0,2500 g. Naváženo bylo celkem 6 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Vzorek byl vždy rozpuštěn v 10 ml DMSO a bylo do něj přidáno 1 ml roztoku vnitřního standardu (methylparaben). Tato roztok byl vložen na 10 minut na ultrazvukovou lázeň, a poté doplněn po rysku MeOH. Pro přípravu vzorku do vialky bylo napipetováno 100  $\mu$ l této směsi a 900  $\mu$ l MeOH. Vzorek byl přefiltrován membránovým filtrem 0,45  $\mu$ m.

#### **5.3.4.4 Hemodin Prebio Forte**

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 1,0167 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi  $\frac{1}{4}$  tablety, tj. 0,2500 g. Naváženo bylo celkem 6 vzorků do 25 ml odměrných baněk. Vzorek byl vždy rozpuštěn v 10 ml DMSO a bylo do něj přidáno 1 ml roztoku vnitřního standardu (methylparaben). Tato roztok byl vložen na 10 minut na ultrazvukovou lázeň, a poté doplněn po rysku MeOH. Pro přípravu vzorku do vialky bylo napipetováno 100  $\mu$ l této směsi a 900  $\mu$ l MeOH. Vzorek byl přefiltrován membránovým filtrem.

### **5.3.5 Správnost**

#### **5.3.5.1 Cilkanol**

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,3256 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ tablety, tj. 0,0800 g. Do vzorku bylo přidáno 2 ml vnějšího standardu troxerutinu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ). Byl použit zásobní roztok troxerutinu. Další postup byl totožný s přípravou vzorku z tablety dle kapitoly 5.3.4.

#### **5.3.5.2 Detralex**

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,6713 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ tablety tj. 0,1600 g. Do vzorku bylo přidáno 2 ml vnějšího standardu diosminu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ) a 2 ml hesperidinu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ). Byl použit zásobní roztok diosminu a hesperidinu. Další postup byl totožný s přípravou vzorku z tablety dle kapitoly 5.3.4.

#### **5.3.5.3 MobiVen Micro**

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 1,0381 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ tablety, tj. 0,2500 g. Do vzorku bylo přidáno 2 ml vnějšího standardu diosminu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ) a 2 ml hesperidinu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ). Byl použit zásobní roztok diosminu a hesperidinu. Další postup byl totožný s přípravou vzorku z tablety dle kapitoly 5.3.4.

#### **5.3.5.4 Hemodin Prebio Forte**

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 1,0167 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ tablety, tj. 0,2500 g. Do vzorku bylo přidáno 2 ml vnějšího standardu hesperidinu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ), 2 ml diosminu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ) a 2 ml rutinu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ). Byl použit zásobní roztok hesperidinu, diosminu a rutinu. Další postup byl totožný s přípravou vzorku z tablety dle kapitoly 5.3.4.

## **5.3.6 Přesnost**

### **5.3.6.1 Cilkanol**

Bylo naváženo 10 tablet, z nichž byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,3256 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi  $\frac{1}{4}$  tablety, tj. 0,0800 g. Postupem totožným s kapitolou 5.3.4 bylo připraveno 6 pracovních roztoků.

### **5.3.6.2 Detralex**

Bylo naváženo 10 tablet, z nichž byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,6713 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi  $\frac{1}{4}$  tablety, tj. 0,1600 g. Postupem totožným s kapitolou 5.3.4 bylo připraveno 6 pracovních roztoků.

### **5.3.6.3 MobiVen Micro**

Bylo naváženo 10 tablet, z nichž byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 1,0381 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi  $\frac{1}{4}$  tablety, tj. 0,2500 g. Postupem totožným s kapitolou 5.3.4 bylo připraveno 6 pracovních roztoků.

### **5.3.6.4 Hemodin Prebio Forte**

Bylo naváženo 10 tablet, z nichž byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety tj. 1,0167 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi  $\frac{1}{4}$  tablety, tj. 0,2500 g. Postupem totožným s kapitolou 5.3.4 bylo připraveno 6 pracovních roztoků.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 Optimalizace metody

Cílem optimalizace metody bylo najít vhodné podmínky pro současné stanovení rutinu, troxerutinu, hesperidinu a diosminu. Bylo nutné dosáhnout dobrého rozlišení analyzovaných látek v přijatelném čase a ve výsledném chromatogramu získat vhodnou šířku a symetrii píku. Dále najít vhodnou kolonu a pro tuto kolonu vhodnou mobilní fázi. Byl testován vliv poměru zastoupení organické a vodné fáze a vliv pH na separaci stanovovaných látek. Dále bylo nutné najít vhodnou vlnovou délku pro detekci. Analýza látek probíhala při průtoku 1 ml/min, byl zvolen nástřik 5  $\mu$ l. Tlak se pohyboval v rozmezí od 3,9 – 22,9 MPa.

#### 6.1.1 Volba vlnové délky

Byla zvolena nejvhodnější vlnová délka pro současnou detekci všech stanovovaných analytů. Pomocí DAD detektoru byla změřena a stanovena vlnová délka, která by umožňovala detekci všech stanovovaných analytů v použité mobilní fázi.

Rutin vykazoval absorpční maximum při 223, 255 a při 353 nm. Obrázek 7

Troxerutin vykazoval absorpční maximum při 221, 254 a 352 nm. Obrázek 8

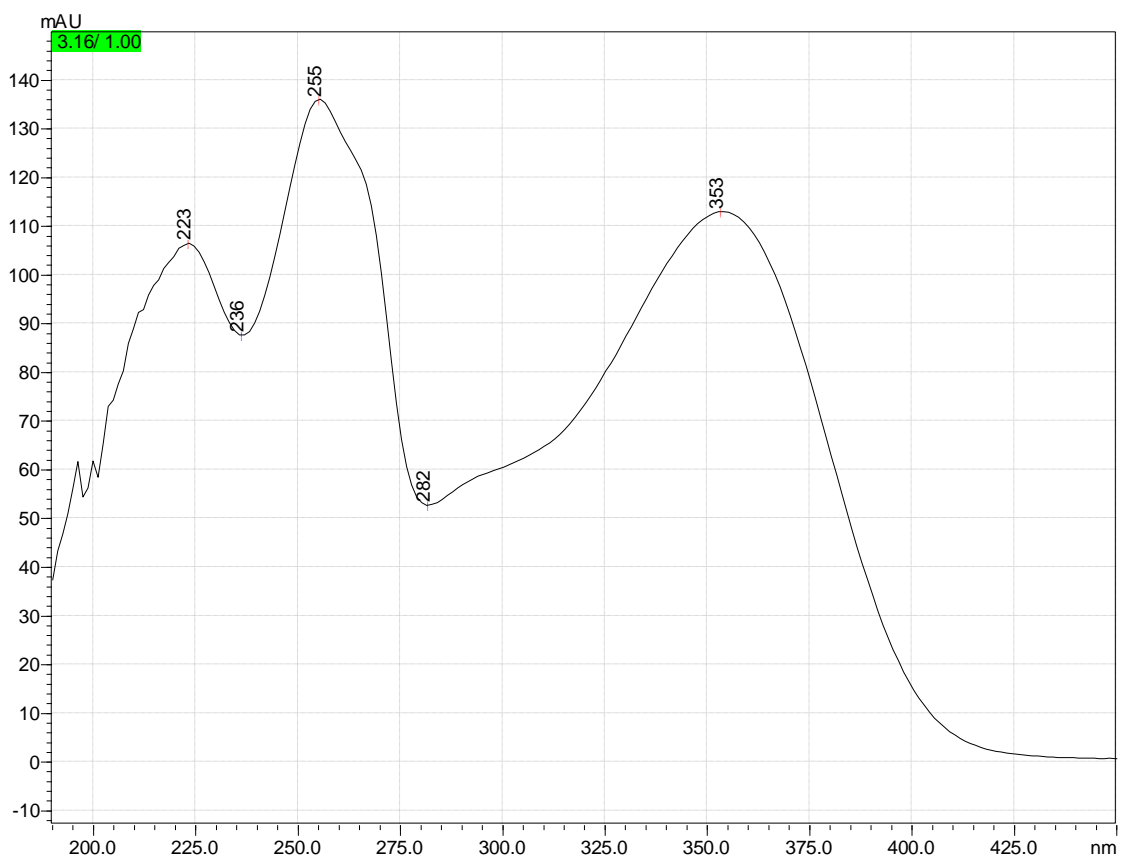
Hesperidin vykazoval absorpční maximum při 227 a 283 nm. Obrázek 9

Diosmin vykazoval absorpční maximum při 252, 266 a při 346 nm. Obrázek 10

Methylparaben vykazoval absorpční maximum při 217 a při 255 nm. Obrázek 11

Pro detekci byla zvolena vlnová délka vyhovující všem měřeným analytům a to 220 nm. Tato vlnová délka detekce byla zvolena pro zjednodušení při optimalizaci separačních podmínek. Následně pak pro validaci metody a pro kvantifikaci látek byly zvoleny dvě vlnové délky, podle absorpčních maxim jednotlivých analytů, tzn. 283 nm pro hesperidin a 255 nm pro rutin, troxerutin, diosmin a vnitřní standard methylparaben. DAD detektor umožňuje vyhodnocení při jakémkoliv vlnové délce spektra, avšak z důvodů zjednodušení vyhodnocování a integrace píků byly vybrány dvě vlnové délky absorpčních maxim, které pokrývaly maxima všech analyzovaných látek i vnitřního standardu.

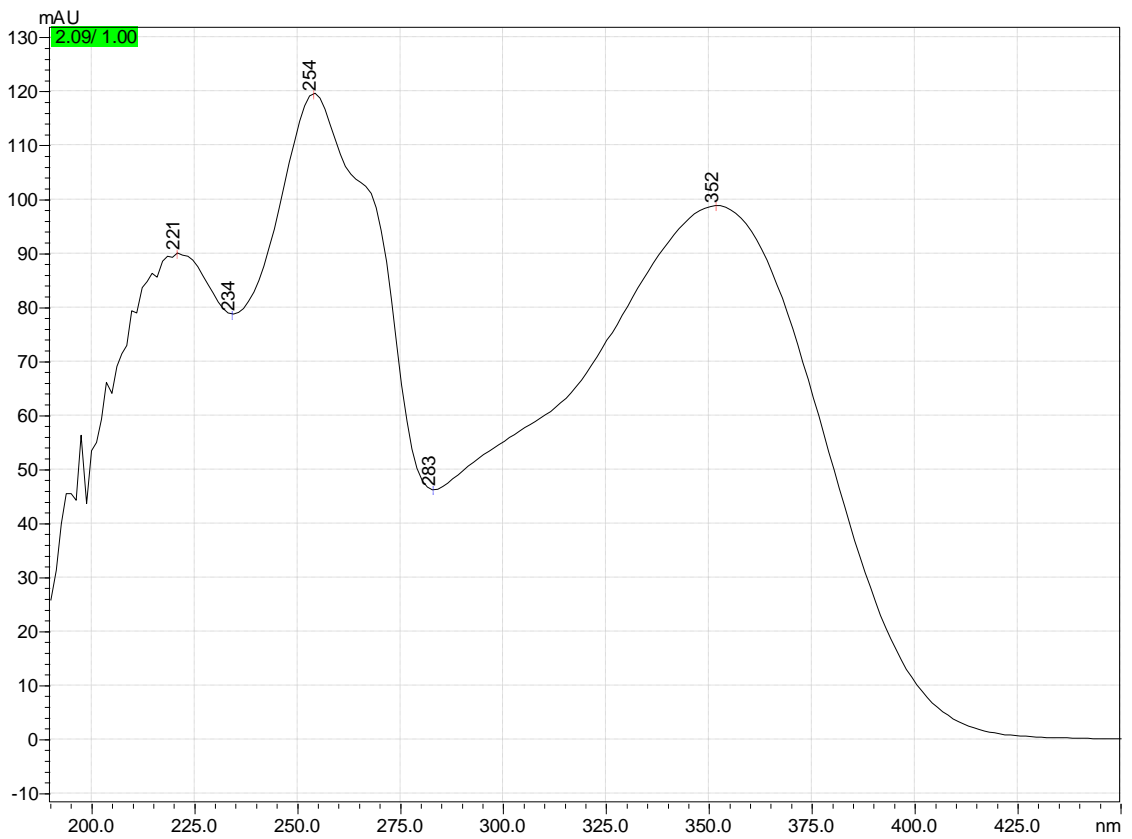
### 6.1.1.1 Absorpční spektrum RUTIN



Obrázek 7 – Absorpční spektrum v mobilní fázi - rutin

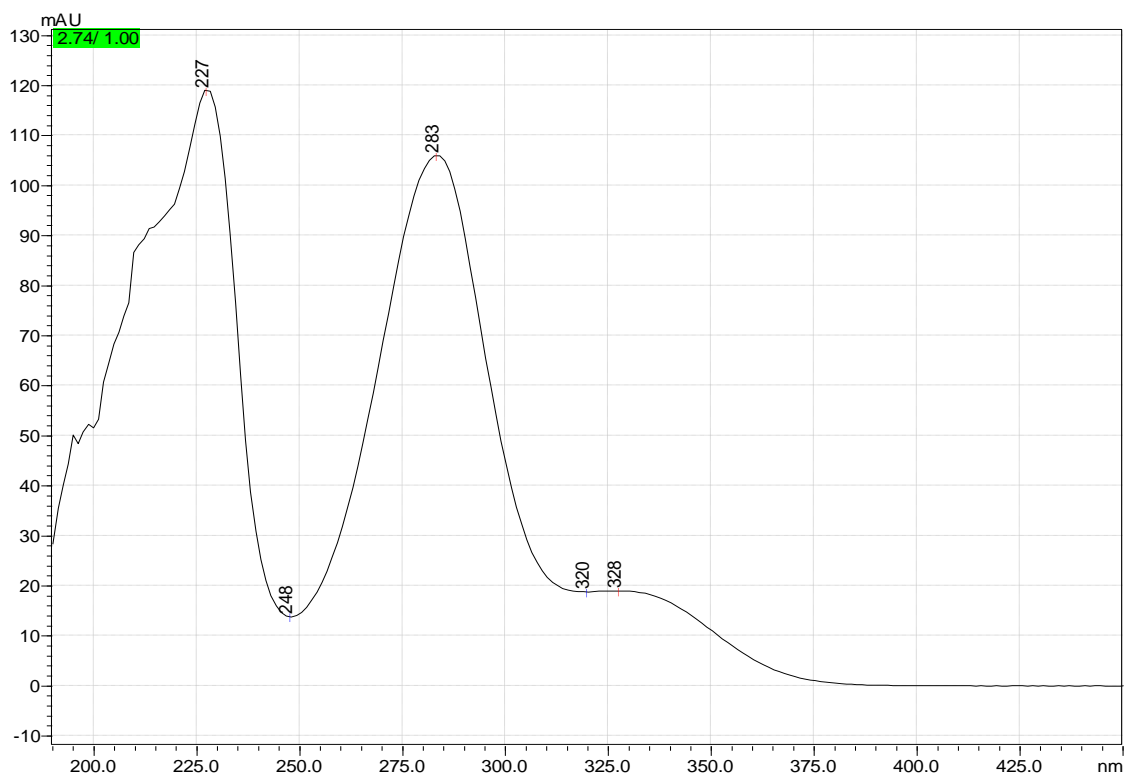


### 6.1.1.2 Absorpční spektrum TROXERUTIN



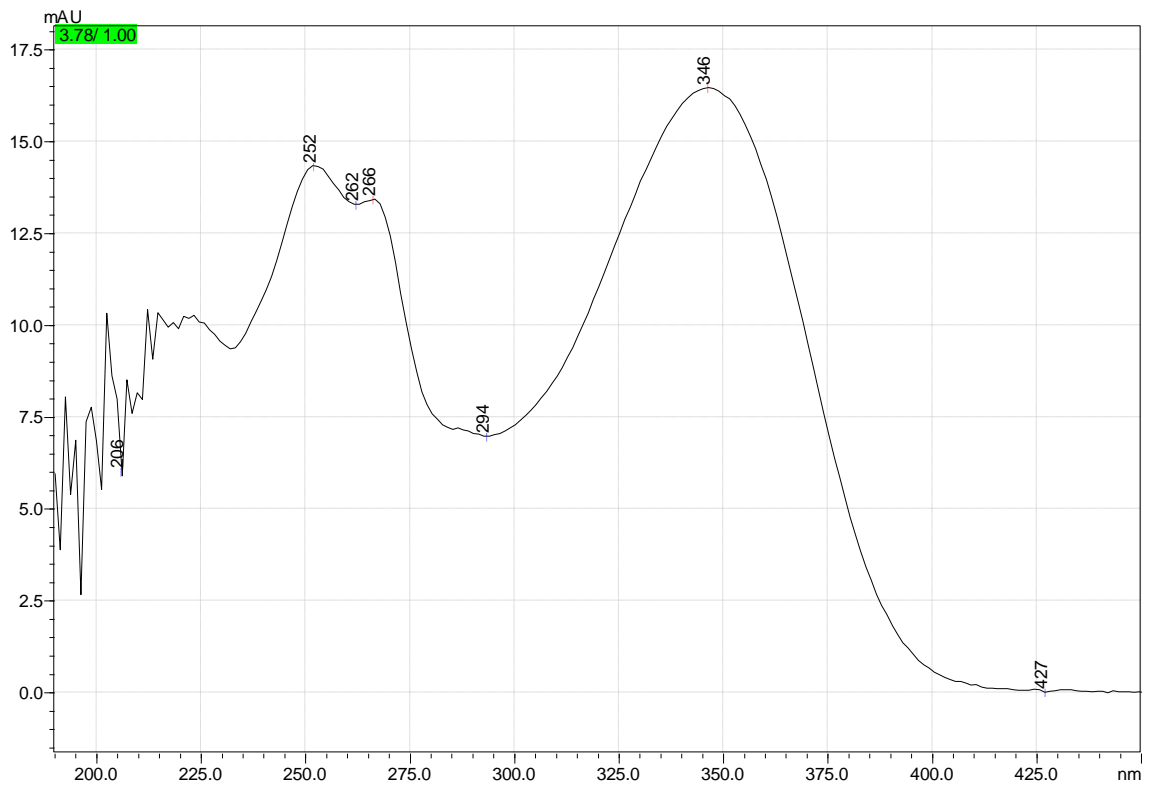
Obrázek 8 – Absorpční spektrum v mobilní fázi – troxerutin

### 6.1.1.3 Absorpční spektrum HESPERIDIN



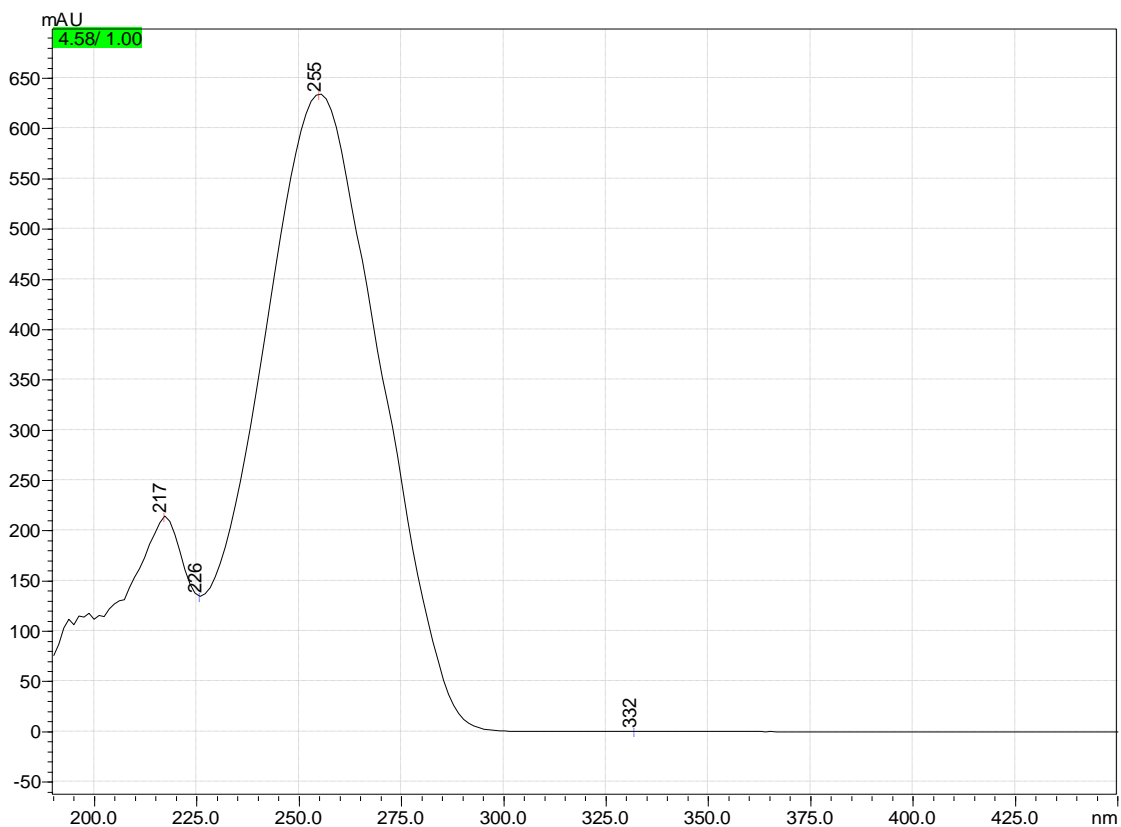
Obrázek 9 – Absorpční spektrum v mobilní fázi – hesperidin

#### 6.1.1.4 Absorpční spektrum DIOSMIN



Obrázek 10 – Absorpční spektrum v mobilní fázi – diosmin

### 6.1.1.5 Absorpční spektrum METHYLPARABEN



Obrázek 11 – Absorpční spektrum v mobilní fázi - methylparaben

### 6.1.2 Volba vnitřního standardu

Pro volbu vnitřního standardu bylo testováno celkem sedm látek.

Methylparaben

Ethylparaben

Propylparaben

Butylparaben

Kyselina benzoová

Kyselina salicylová

Kyselina acetylsalicylová

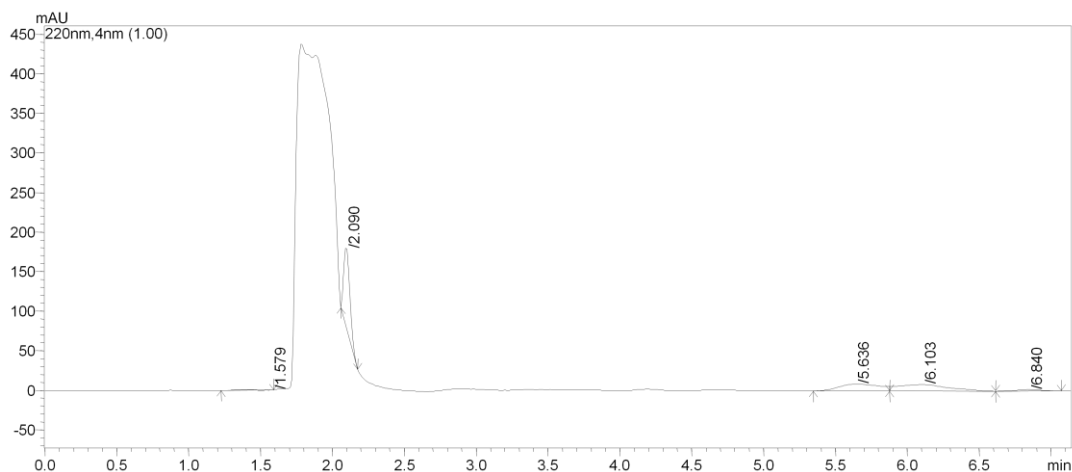
Jako nejvhodnější vnitřní standard byl stanoven methylparaben. Pík methylparabenu byl dostatečně separovaný od píků stanovovaných látek, eluoval se v blízkosti stanovovaných látek a jeho retenční čas tedy zbytečně neprodlužoval analýzu.

### 6.1.3 Volba kolony a mobilní fáze

Celkem bylo testováno 11 kolon, jejichž seznam je uvedený v Tabulka 1. Cílem optimalizace – volby kolony a mobilní fáze nebylo stanovení pořadí a určení retenčního

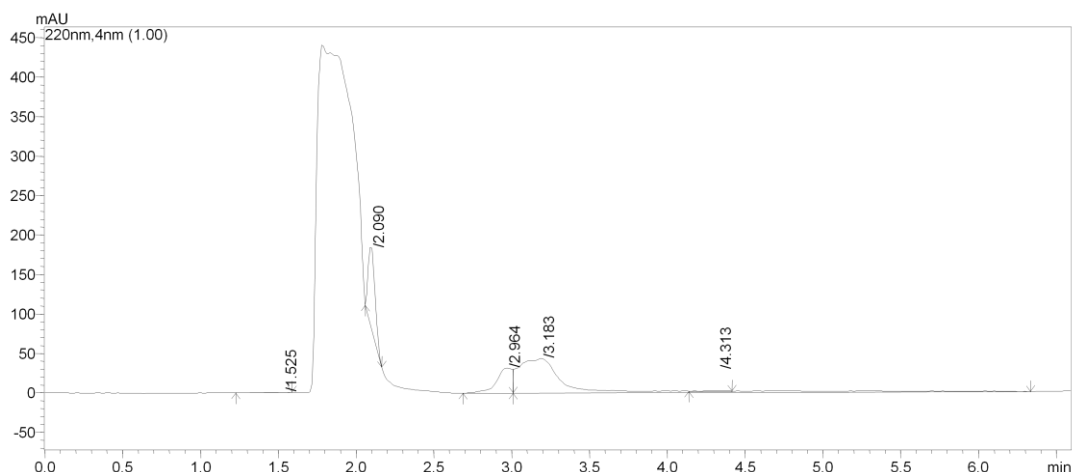
času v jakém se analyzované látky eluují na koloně, ale dosažení separace všech čtyř stanovovaných látek, vhodná šířka a symetrie píku a separace všech čtyř stanovovaných látek v přijatelném čase. Na následujících obrázcích jsou dokumentovány separace na jednotlivých kolonách za různých testovaných podmínek mobilních fází.

#### 6.1.3.1.1 *Onyx Monolithic C 18 100 x 4,6 mm, acetonitril/voda (30:70)*



Obrázek 12 – *Onyx Monolithic C 18 100 x 4,6 mm, acetonitril/voda (30:70)*

#### 6.1.3.1.2 *Onyx Monolithic C 18 100 x 4,6 mm, acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 30:70*

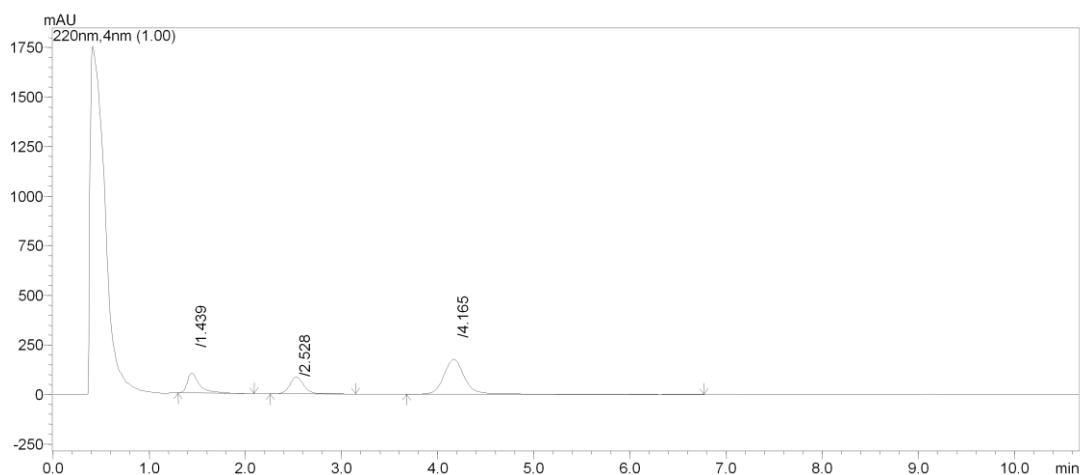


Obrázek 13 – *Onyx Monolithic C 18 100 x 4,6 mm, acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 30:70*

Při analýze nebyla získána dobrá šířka a symetrie píků. Analýza nebyla uskutečněna ve vhodných retenčních časech. Obrázek 12

Při změně pH okyselením mobilní fáze na pH 3 nebyla dosažena dobrá separace látek  
Obrázek 13, kolona je pro analýzu látek nevhodná.

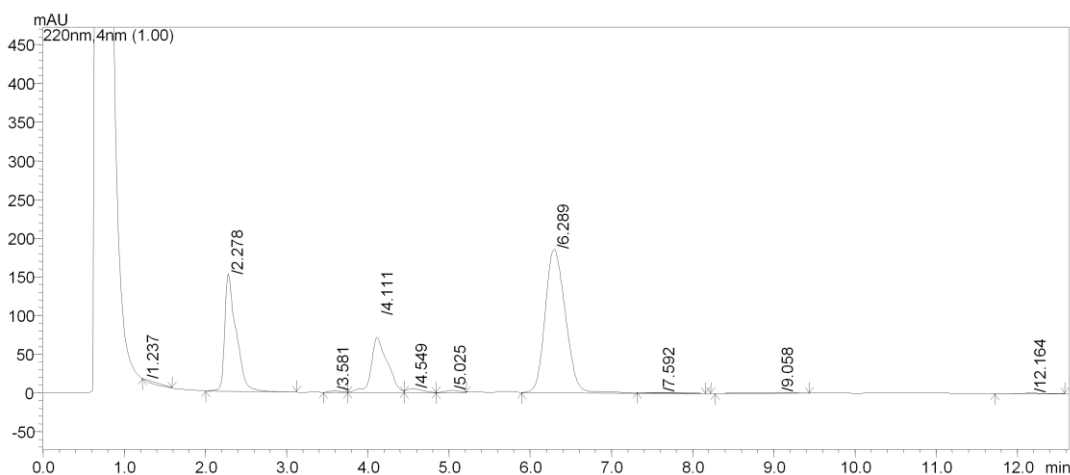
**6.1.3.1.3 Ascentis Express C18 3 cm x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m, acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 25:75**



Obrázek 14 – Ascentis Express C18 3 cm x 4,6 mm, 2,7  $\mu$ m, acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 25:75

Při testování kolony Ascentis Express C 18 nedošlo k separaci všech čtyř testovaných látek. Kolona není vhodná k analýze stanovovaných látek.

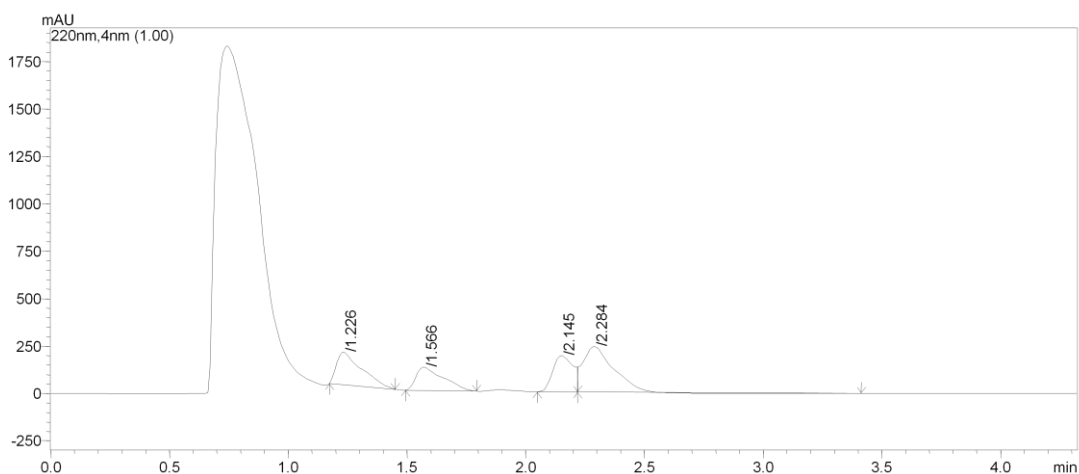
**6.1.3.1.4 Ascentis Express Phenyl – Hexyl 10 cm x 3,00 mm, 2,7  $\mu$ m, methanol/voda 50:50**



Obrázek 15 – Ascentis Express Phenyl – Hexyl 10 cm x 3,00 mm, 2,7  $\mu$ m, methanol/voda 50:50

### 6.1.3.1.5 Ascentis Express Phenyl – Hexyl 10 cm x 3,00 mm, 2,7 µm, methanol/voda

60:40



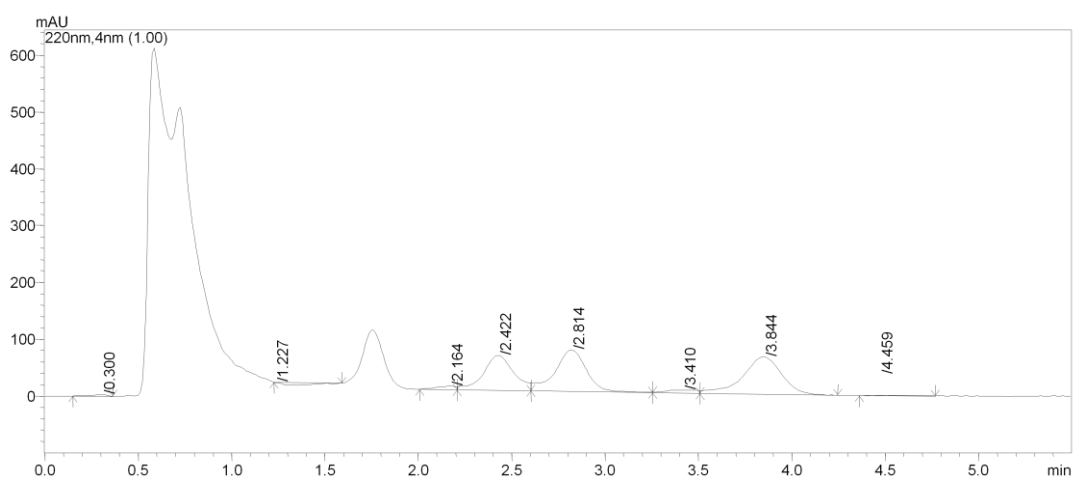
Obrázek 16 – Ascentis Express Phenyl – Hexyl 10 cm x 3,00 mm, 2,7 µm, methanol/voda 60:40

Fenyl - hexyl fáze zvyšuje selektivitu pro polární aromatické a heterocyklické sloučeniny vyplývající z interakce solutů s aromatickým kruhem a jeho delokalizovanými elektrony [40].

U kolony Ascentis Express Phenyl - Hexyl nedošlo k separaci všech čtyř látek. Kolona je pro analýzu látek nevhodná.

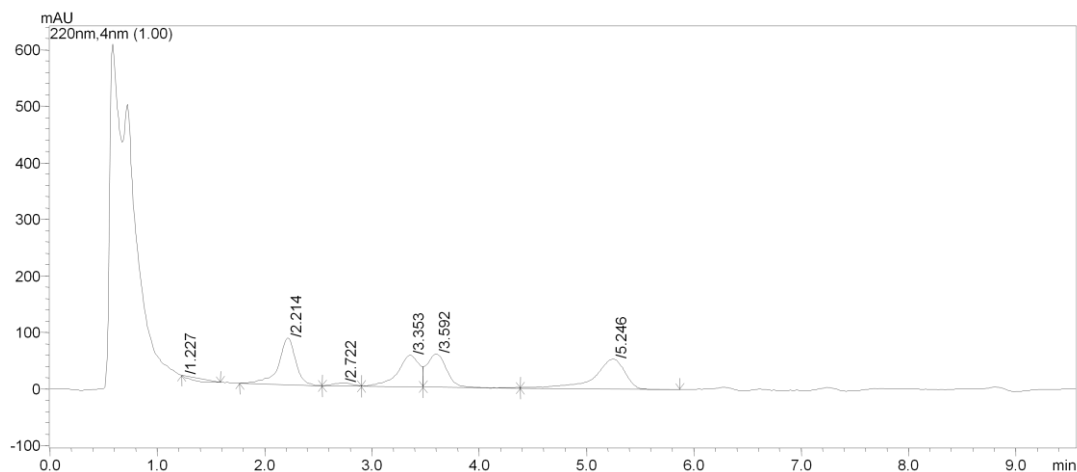
### 6.1.3.1.6 Synergi 4 µ Fusion – RP 80 75 x 3,00 mm, 4 µ, acetonitril/voda + kyselina

octová (pH3) 30:70



Obrázek 17 – Synergi 4 µ Fusion - RP 80 75 x 3,00 mm, 4 µ, acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 30:70

**6.1.3.1.7 Synergi 4  $\mu$  Fusion – RP 80 75 x 3,00 mm, 4  $\mu$ , acetonitril/voda +kyselina octová (pH 3) 28:72**

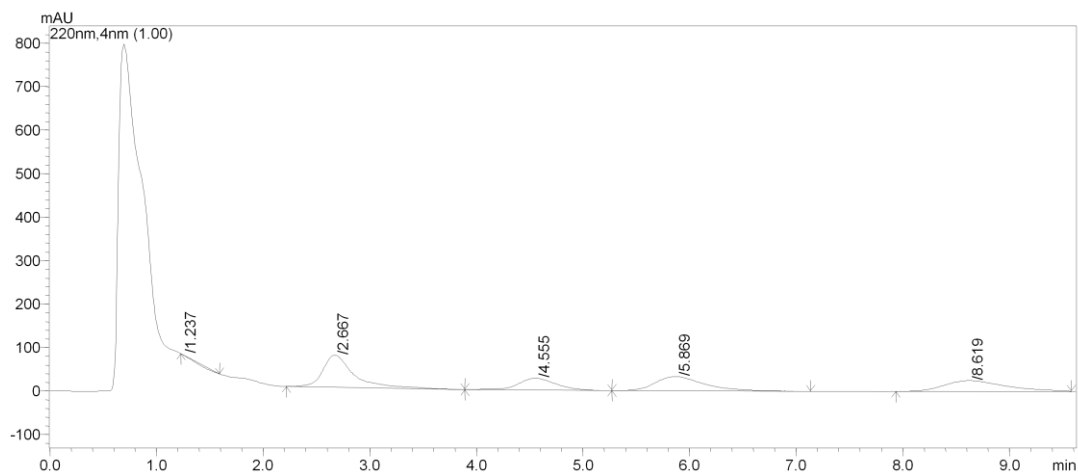


*Obrázek 18 – Synergi 4  $\mu$  Fusion - RP 80 75 x 3,00 mm, 4  $\mu$ , acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 28:72*

Vázaný C 18 ligand dává koloně dobrou hydrofobní retenci a selektivitu zatímco polární skupina zajišťuje zlepšení polární retence. Tato duální fáze obsažená na koloně dovolu je vyrovnávat retenci polárních, kyselých, bazických a hydrofobních sloučenin. Kolona umožňuje použití u práce se směsí, ve které jsou obsaženy jak polární tak i nepolární látky [37]. U kolony Synergi 4  $\mu$  Fusion – RP 80 byl pro mobilní fázi acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 30/70 patrný špatný tvar píku Obrázek 17. Při změně podmínek (poměr organické/vodné fáze 28/72) nebyly všechny čtyři látky dostatečně separovány. Změna mobilní fáze na methanol/voda nevedla k lepším výsledkům. Kolona není vhodná pro separaci stanovovaných látek.



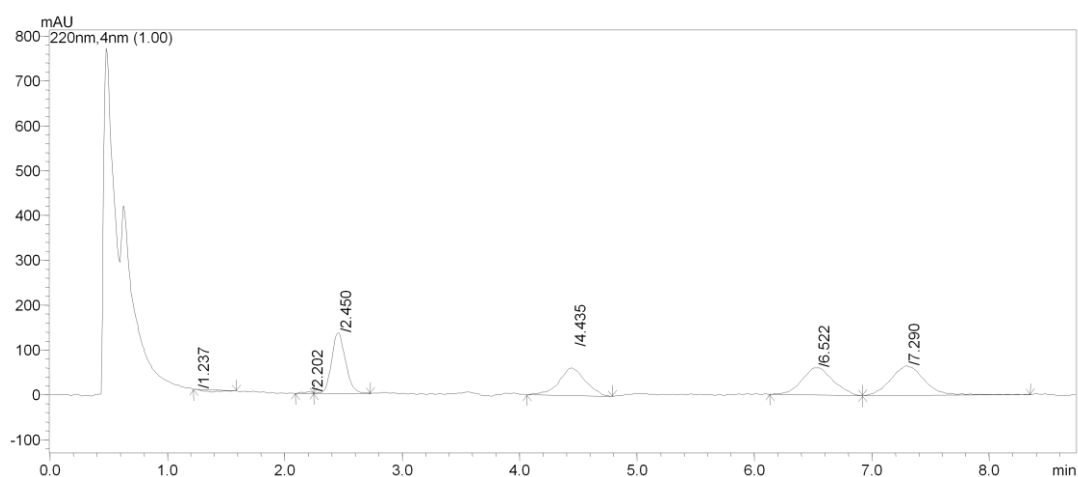
**6.1.3.1.8 Synergi 4  $\mu$  Polar – RP 80 A 75 x 3,00 mm, 4  $\mu$ , methanol/voda + kyselina octová (pH 3) 50:50**



*Obrázek 19 – Synergi 4  $\mu$  Polar - RP 80 A 75 x 3,00 mm, 4  $\mu$ , methanol/voda + kyselina octová (pH 3) 50:50*

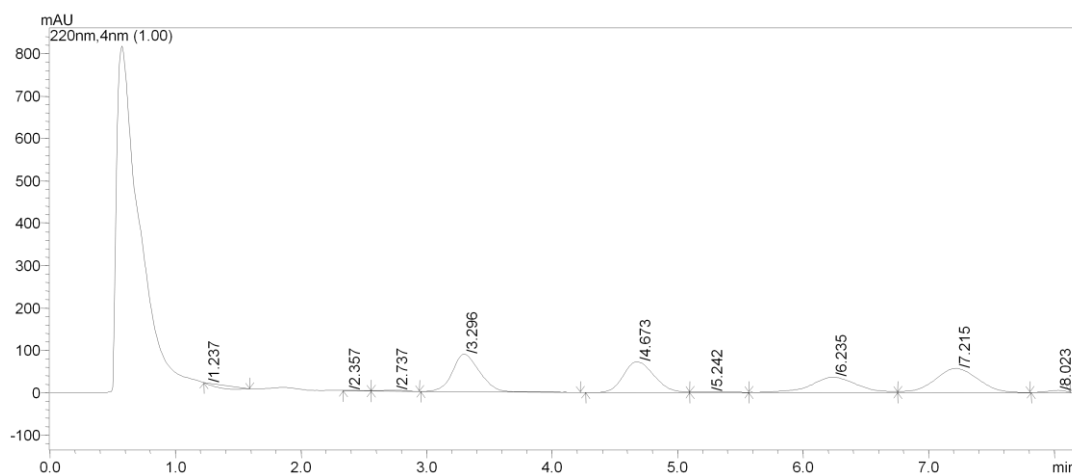
Kolona s étericky vázanou fenylovou fází s polárním zakončením je určena pro polární a aromatické látky. Éterická vazba přispívá ke zlepšení tvaru píku při analýze kyselých a bazických látek [36]. Kolona Synergi 4  $\mu$  Polar – RP 80 A vykazuje špatnou šířku a asymetrii píku a dlouhé retenční časy. Kolona je pro analýzu nevhodná.

**6.1.3.1.9 Synergi 4 $\mu$  Hydro RP – 80A 75 x 3,00 mm, 4  $\mu$ , acetonitril/voda +kyselina octová (pH3) 25:75**



*Obrázek 20 – Synergi 4 $\mu$  Hydro RP - 80A 75 x 3,00 mm, 4  $\mu$ , acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 25:75*

**6.1.3.1.10 Synergi 4 $\mu$  Hydro – RP 80A 75 x 3,00 mm, 4  $\mu$ , methanol/voda kyselina octová (pH3) 45:55**



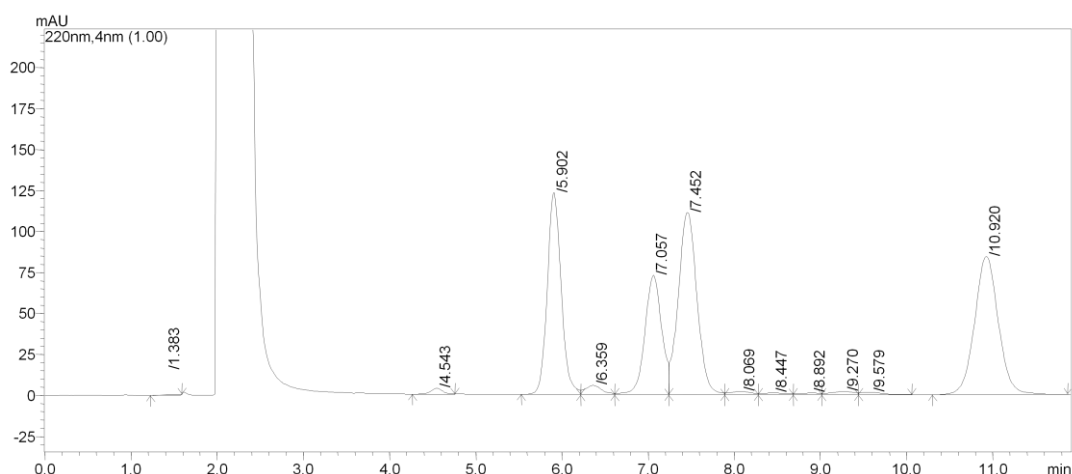
*Obrázek 21 – Synergi 4 $\mu$  Hydro - RP 80A 75 x 3,00 mm, 4  $\mu$ , methanol/voda + kyselina octová (pH 3) 45:55*

Kolony Synergi HYDRO – RP používají C18 vázanou fázi s C1 "endcappingem". Ten dodává kolonám HYDRO – RP díky polárním interakcím, vodíkovým můstkům či elektrostatickým interakcím schopnost hydrofobní i polární retence. Tyto nové kolony jsou schopny dělit analyty o širokém spektru polarit, od nepolárních až po vysoce polární látky [36].

U kolony Synergi 4 $\mu$  Hydro RP – 80 A byla testována mobilní fáze methanol/voda a tato mobilní fáze byla testovaná s přidavkem kyseliny octové pro úpravu pH 3. Mobilní fáze methanol/voda bez přidavku kyseliny octové vykazovala chromatogram s dlouhými retenčními časy nebo se špatně separovanými píky. Při změně podmínek na pH 3 došlo k separaci všech čtyř analyzovaných látek. Kolona s těmito parametry je vhodná k analýze stanovovaných látek. Obrázek 21 Dále byla testovaná mobilní fáze acetonitril/voda. Jako nejvhodnější byl stanoven poměr organické a vodné fáze 25/75 o pH 3. Obrázek 20

Všechny čtyři látky byly od sebe separované. Kolona s výše uvedenými parametry je vhodná k analýze stanovovaných látek.

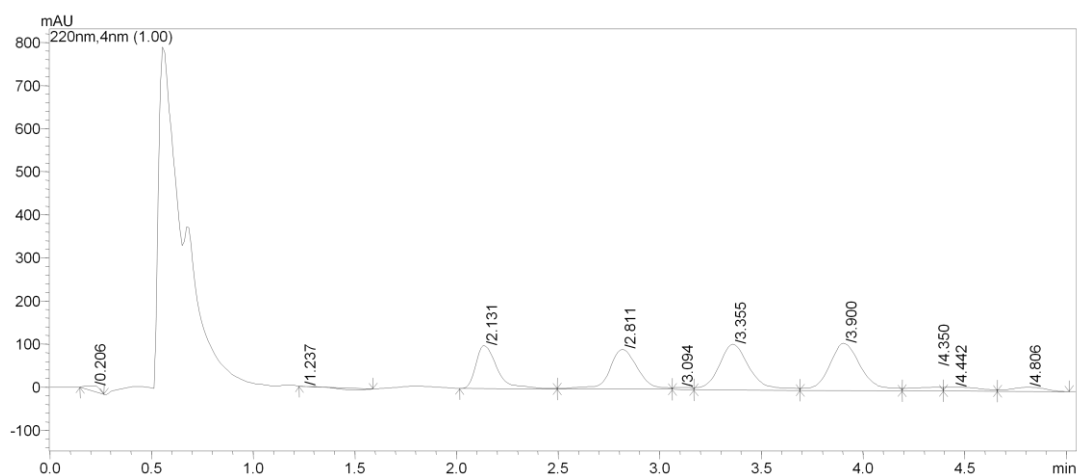
### 6.1.3.1.11 Zorbac SB – CN 4,6 x 150 mm, 5 µm acetonitril/voda 30:70



Obrázek 22 – Zorbac SB – CN 4,6 x 150 mm, 5 µm acetotril/voda 30:70

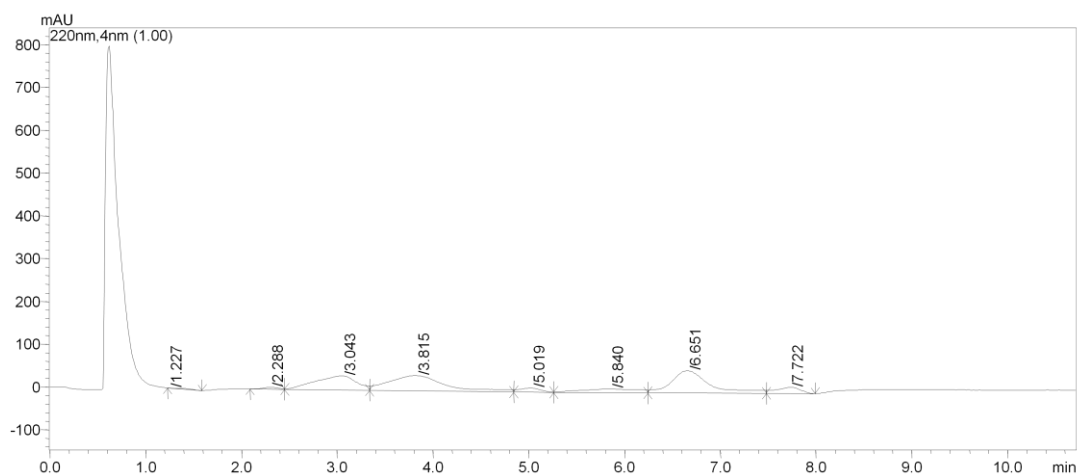
Kolona obsahuje chemicky vázanou, stericky chráněnou kyanopropyl stacionární fázi. Je navržena tak, aby redukovala nebo eliminovala silnou adsorpci bazických sloučenin. Hustě pokrytá, stericky chráněná stacionární fáze je chemicky stabilní při nižším pH a dává koloně delší životnost. Je vhodná při použití pro bazické, neutrální a kyselé vzorky [41]. Při použití této kolony nedošlo k separaci všech čtyř látek. Kolona je pro analýzu nevhodná. Obrázek 22

### 6.1.3.1.12 Ascentis Express PR – Amide 10 cm x 3,0 mm, 2,7 µm, acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 30:70



Obrázek 23 – Ascentis Express PR – Amide 10 cm x 3,0 mm, 2,7 µm, acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 30:70

**6.1.3.1.13 Ascentis Express RP – Amide 10 cm x 3,0 mm, 2,7 μm, methanol/voda + kyselina octová (pH 3) 40:60**



*Obrázek 24 – Ascentis Express RP – Amide 10 cm x 3,0 mm, 2,7 μm, methanol/voda + kyselina octová (pH 3) 40:60*

Kolona Ascentis Express RP – Amide redukuje silanolové interakce s bazickými analyty a zlepšuje tvar jejich píku. Zvyšuje selektivitu u polárních sloučenin, zvláště u těch, u kterých působí jako donor vodíkových vazeb. Fenoly, karboxylové kyseliny, aminy a v menší míře alkoholy vykazují zlepšenou retenci na RP – Amide fázi ve srovnání s neutrálními, nepolárními analyty. Zlepšuje tvar píku pro základnu [34].

Kolona Ascentis Express RP – Amide byla testována pro dvě mobilní fáze methanol/voda a acetonitril/voda. Vhodnější byla mobilní fáze acetonitril/voda. U mobilní fáze methanol/voda nedošlo i po pozměnění poměru organické a vodné fáze a změně pH k separaci všech stanovovaných látek. Obrázek 24 Jako nejvhodnější kolona pro analýzu separovaných látek byla vyhodnocena Ascentis Express RP – Amide, mobilní fáze acetonitril/voda v poměru organické a vodné fáze 30/70 o pH 3. V chromatografu byly patrné separované všechny čtyři stanovované látky, byly separovány v přijatelném čase a jejich píky měly vhodnou šířku a symetrii.

Při optimalizaci metody byly testované kolony shrnuté v Tabulka 1, s rozdílnými parametry. Testované látky měly různou schopnost retence na těchto kolonách. Při analýze látek došlo ke změně pořadí píků, v jakém se eluovaly na koloně.

### 6.1.4 Optimální podmínky pro HPLC analýzu

Optimální podmínky pro HPLC analýzu popsané výše jsou shrnuty do Tabulka 3.

Tabulka 3 – Optimální podmínky pro HPLC analýzu

Chromatografická sestava	Shimadzu LC – 10
Detektor	DAD detektor SPD - M10A VP
Kolona	Ascentis Express RP – Amide 10 cm x 3,0 mm, 2,7 µm Supelco Analytical
Dávkování	5µl
Detekce	UV 255 a 283 nm
Mobilní fáze	Acetonitril/voda + 0,5 % kyselina octová (pH 3) 30:70
Izoktatický režim	
Teplota	50°C
Tlak	18,6 MPa

## 6.2 Validace analytické metody

### 6.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Převzato z kalibrace na hladině 100 mg/l

#### 6.2.1.1 Účinnost chromatografického systému - počet teoretických pater (N)

Účinnost kolony byla ověřena proměřením roztoku standardů v testu na opakovatelnost.

Tabulka 4 – Počet teoretických pater

Analyzovaná	t <sub>R</sub> (min)	w <sub>0,05</sub>	N
TRO	2,09	0,097	2341
HES	2,69	0,128	2189
RUT	3,17	0,140	2651
DIO	3,73	0,139	3972
MP	4,54	0,161	4621

Požadavek na počet teoretických pater  $N > 1500$  je splněn pro všech pět látek.

### 6.2.1.2 Asymetrie chromatografických píků (T)

Hodnoty pro ověření asymetrie chromatografických píků byly získány z analýz roztoků standardů pro opakovatelnost. Spektra analyzovaných látek v mobilní fázi acetonitril/voda: 0,5% kyselina octová (30:70, v/v).

*Tabulka 5 – Asymetrie chromatografických píků*

Sloučenina	$w_{0,01}$	f	Asymetrie (T)
TRO	0,244	0,076	1,603
HES	0,257	0,102	1,266
RUT	0,292	0,107	1,136
DIO	0,278	0,132	1,057
MP	0,315	0,146	1,082

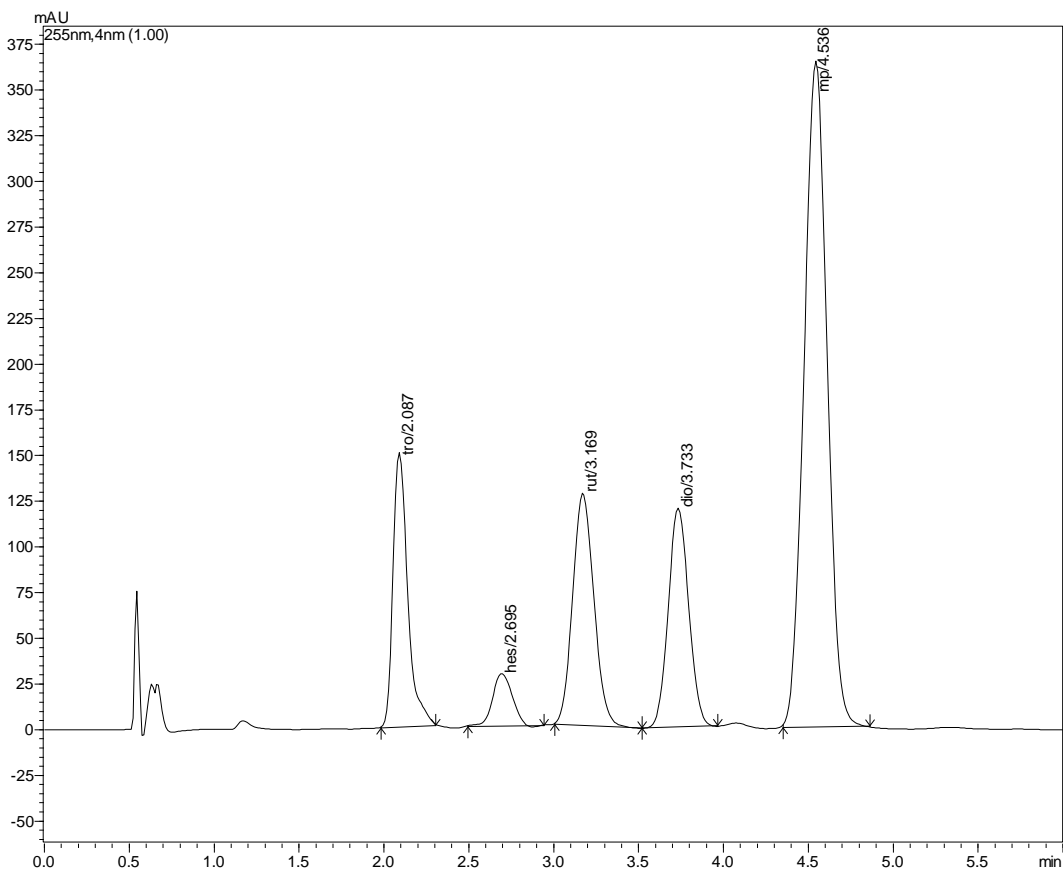
Požadavek na asymetrii chromatografických píků  $T < 2$  byl splněn pro všech pět látek.

### 6.2.1.3 Rozlišení chromatografických píků R

*Tabulka 6 – Rozlišení chromatografických píků*

Hodnocené látky	R
TRO - HES	3,018
HES - RUT	1,993
RUT - DIO	2,336
DIO - MP	3,183

Požadavek na rozlišení chromatografických píků  $R > 1,5$  byl splněn u všech hodnocených chromatografických píků.



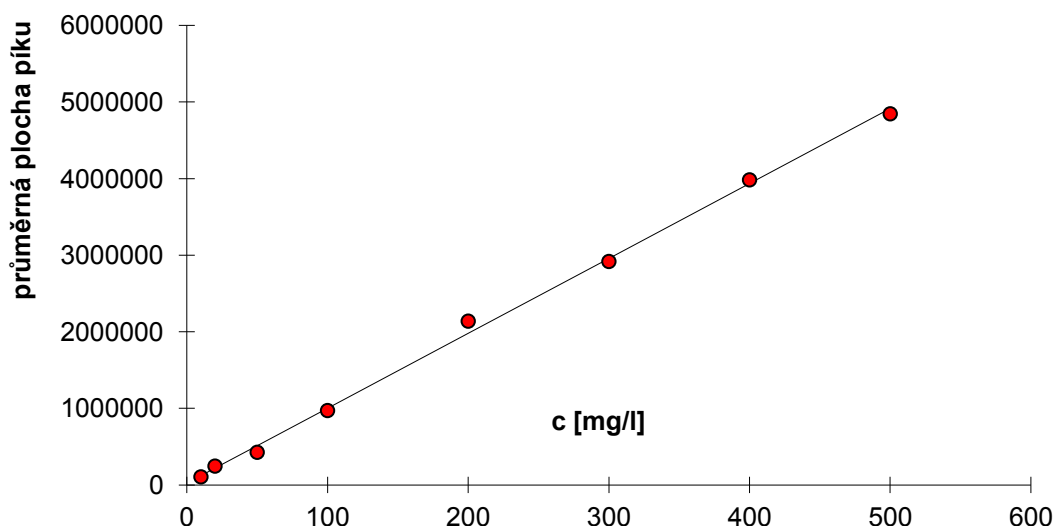
Obrázek 25 – Typový chromatogram za optimálních separačních podmínek

## 6.2.2 Linearita

Pro stanovení linearity bylo použito 8 kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí od 500 mg/l do 10 mg/l, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.3. U každého kalibračního roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Z těchto 3 měření byla stanovena průměrná hodnota plochy píku pro každou koncentraci. Závislost průměrných ploch píků kalibračních roztoků na jejich koncentraci byla vyhodnocena metodou lineární regrese.

### 6.2.2.1 Kalibrační závislost pro diosmin

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace diosminu: 500 mg/l, 400 mg/l, 300 mg/l, 200 mg/l, 100mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 10 mg/l.



Obrázek 26 – Kalibrační závislost pro diosmin

Tabulka 7 - Parametry lineární regrese pro diosmin

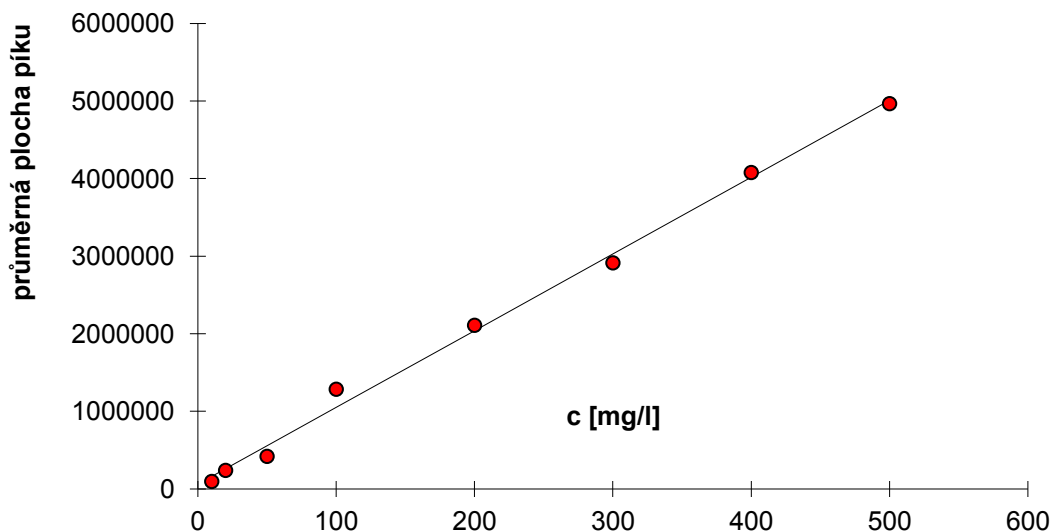
Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	9778,03	± 172,648
Abs. člen	q =	23069,1	± 45391,9
Korelační koef.	r =	0,99907	
Reziduální odch.	s =	84746,9	

Ve sledovaném koncentračním rozmezí byl dosažen korelační koeficient 0,99907.



### 6.2.2.2 Kalibrační závislost pro hesperidin

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace hesperidin: 500 mg/l, 400 mg/l, 300 mg/l, 200 mg/l, 100mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 10 mg/l.



Obrázek 27 – Linearita hesperidin

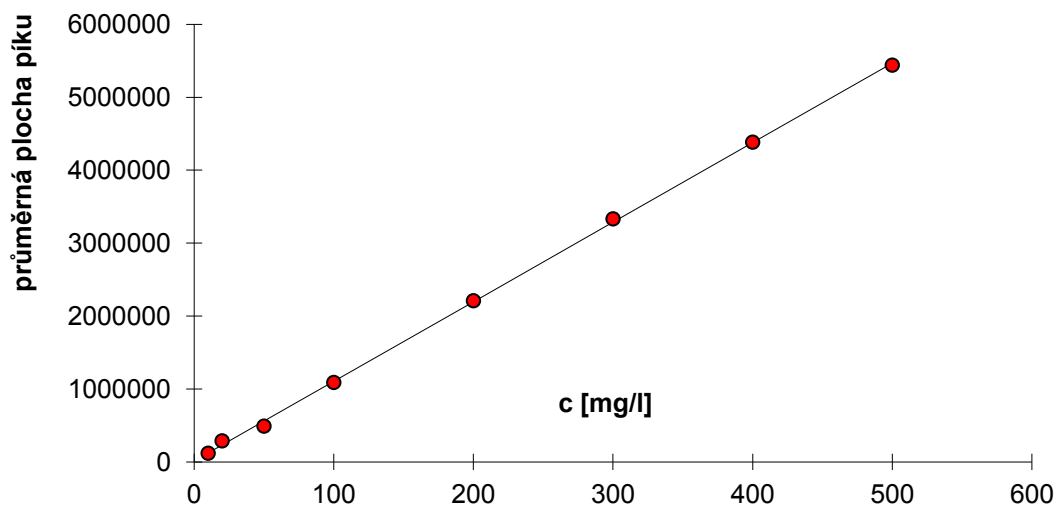
Tabulka 8 – Parametry lineární regrese pro hesperidin

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	9894,48	± 264,834
Abs. člen	q =	59583,4	± 69629,2
Korelační koef.	r =	0,99786	
Reziduální odch.	s =	129998	

Ve sledovaném koncentračním rozmezí byl dosažen korelační koeficient 0,99786.

### 6.2.2.3 Kalibrační závislost pro rutin

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace rutinu: 500 mg/l, 400 mg/l, 300 mg/l, 200 mg/l, 100mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 10 mg/l.



Obrázek 28 – Linearita rutin

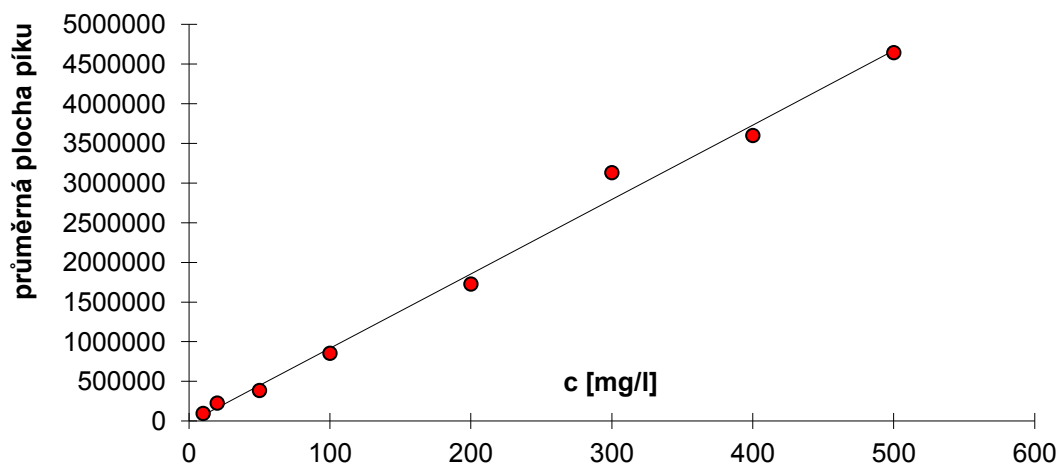
Tabulka 9 – Parametry lineární regrese pro rutin

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	10910	± 88,5556
Abs. člen	q =	13207,4	± 23282,7
Korelační koef.	r =	0,9998	
Reziduální odch.	s =	43469	

Ve sledovaném koncentračním rozmezí byl dosažen korelační koeficient 0,9998.

#### 6.2.2.4 Kalibrační závislost pro troxerutin

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace troxerutinu: 500 mg/l, 400 mg/l, 300 mg/l, 200 mg/l, 100mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 10 mg/l.



Obrázek 29 – Linearita troxerutin

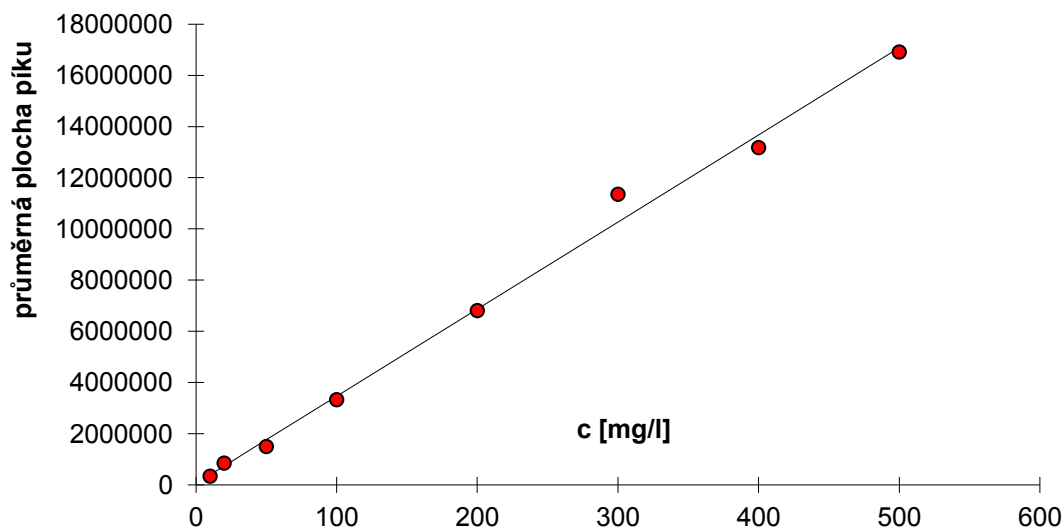
Tabulka 10 – Parametry lineární regrese pro troxerutin

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	$n =$	8	Odhad chyby
Směrnice	$k =$	9383,25	$\pm$ 333,376
Abs. člen	$q =$	-22274	$\pm$ 87650
Korelační koef.	$r =$	0,99623	
Reziduální odch.	$s =$	163643	

Ve sledovaném koncentračním rozmezí byl dosažen korelační koeficient 0,99623.

### 6.2.2.5 Kalibrační závislost pro methylparaben

Měření byla prováděna pro tyto koncentrace methylparabenu: 500 mg/l, 400 mg/l, 300 mg/l, 200 mg/l, 100mg/l, 50 mg/l, 25 mg/l, 10 mg/l.



Obrázek 30 – Linearita methylparaben

Tabulka 11 – Parametry lineární regrese pro methylparaben

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	34061,1	$\pm$ 1037,1
Abs. člen	q =	51062,7	$\pm$ 272671
Korelační koef.	r =	0,99723	
Reziduální odch.	s =	509078	

Ve sledovaném koncentračním rozmezí byl dosažen korelační koeficient 0,99723.

### 6.2.3 Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti byly použity pracovní roztoky troxerutinu, hesperidinu, rutinu, diosminu a methylparabenu, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.3.3. Jednotlivé roztoky byly připraveny vždy ve třech koncentracích  $c = 10$  mg/ml,  $c = 100$  mg/ml,  $c = 500$  mg/ml. Pro každý analyt a koncentraci bylo provedeno 6 nástřiků na kolonu. Z ploch pík analytů byly vypočítány směrodatné odchylky.

Tabulka 12 - Opakovatelnost analýzy pracovních roztoků o koncentraci ( $c=10$  mg/l)

HLADINA 10 MG/L	PRŮMĚR	SD	RSD (%)
TRO	93 474	756	0,81
HES	96 557	812	0,84
RUT	116 731	1 079	0,92
DIOS	104 459	956	0,91
MP	332 205	1 018	0,31

Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí od 0,31 % do 0,92 %. Nejnižší hodnoty dosáhla u methylparabenu a nejvyšší u rutinu. RSD dosahovala hodnoty  $< 1$  %.

Tabulka 13 - Opakovatelnost analýzy pracovních roztoků o koncentraci ( $c=100$  mg/l)

HLADINA 100MG/L	PRŮMĚR	SD	RSD (%)
TRO	885 360	6 581	0,74
HES	1 280 506	6 546	0,51
RUT	1 091 106	10 586	0,97
DIOS	972 952	8 731	0,90
MP	3 271 649	30 496	0,93

Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí od 0,51 % do 0,97 %. Nejnižší hodnoty dosáhla u hesperidinu a nejvyšší u rutinu. RSD dosahovala hodnoty  $< 1$  %.

Tabulka 14 - Opakovatelnost analýzy pracovních roztoků o koncentraci ( $c=500$  mg/l)

HLADINA 500MG/L	PRŮMĚR	SD	RSD (%)
TRO	4 681 023	2 142	0,05
HES	4 846 636	10 164	0,21
RUT	5 436 957	18 631	0,34
DIOS	4 851 251	23 521	0,48
MP	16 857506	10 353	0,06

Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí od 0,05 % do 0,48 %. Nejnižší hodnoty dosáhla u troxerutinu a nejvyšší u diosminu. RSD dosahovala hodnoty  $< 1$  %.

## 6.2.4 Přesnost

Pro hodnocení přesnosti metody byla použita metoda vnitřního standardu.

### 6.2.4.1 Hemodin Prebio Forte

Bylo naváženo 10 tablet přípravku, z nichž byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety tj. 1,0167 g. Postupně bylo připraveno a analyzováno 6 pracovních roztoků pro

přesnost, jejichž příprava je uvedena v kapitole 5.3.7. Byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Byla stanovena průměrná hodnota plochy píků ze 3 nástřiků, která byla dále přepočtena na navážku 0,2500 g.

*Tabulka 15 – Přesnost metody - Hemodin Prebio Forte*

PŘESNOST	RUT	HES	DIO
Hodnoty ploch	400 181	660 361	2 101 385
	414 818	687 291	2 185 677
	400 021	661 860	2 033 994
	408 997	679 209	2 093 945
	406 003	675 960	1 989 683
	403 974	674 522	2 010 579
Průměr	405 666	673 201	2 069 211
SD	5 653	10 368	72 407
RSD (%)	1,39	1,54	3,50

RSD dosahovala hodnoty < 5 %.

#### 6.2.4.2 Cilkanol

Bylo naváženo 10 tablet přípravku, z nichž byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety tj. 0,3256 g. Postupně bylo připraveno a analyzováno 6 pracovních roztoků pro přesnost, jejichž příprava je uvedena v kapitole 5.3.6. Byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Byla stanovena průměrná hodnota plochy píků ze 3 nástřiků, která byla dále přepočtena na navážku 0,0800 g.

*Tabulka 16 – Přesnost metody – Cilkanol*

PŘESNOST	TRO
Hodnoty ploch	3 094 213
	3 195 891
	3 105 303
	3 080 105
	3 163 245
	3 148 297
Průměr	3 131 175
SD	45 063
RSD (%)	1,43

RSD dosahovala hodnoty < 5 %

#### 6.2.4.3 Detralex

Bylo naváženo 10 tablet přípravku, z nichž byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety tj. 0,6713 g. Postupně bylo připraveno a analyzováno 6 pracovních roztoků pro přesnost, jejichž příprava je uvedena v kapitole 5.3.6. Byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Byla stanovena průměrná hodnota plochy píků ze 3 nástřiků, která byla dále přepočtena na navážku 0,1600 g.

Tabulka 17 – Přesnost metody – Detralex

PŘESNOST	HES	DIO
Hodnoty ploch	175 515	4 894 254
	177 879	5 139 560
	172 563	4 945 767
	173 673	5 002 632
	170 443	4 949 982
	176 620	5 032 591
Průměr	174 448	4 994 131
SD	2 750	85 982
RSD (%)	1,58	1,72

RSD dosahovala hodnoty < 5 %.

#### 6.2.4.4 MobiVen Micro

Bylo naváženo 10 tablet přípravku, z nichž byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety 1,0381 g. Postupně bylo připraveno a analyzováno 6 pracovních roztoků pro přesnost, jejichž příprava je uvedena v kapitole 5.3.6. Byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Byla stanovena průměrná hodnota plochy píků ze 3 nástřiků, která byla dále přepočtena na navážku 0,2500 g.

Tabulka 18 – Přesnost metody - MobiVen Micro

PŘESNOST	HES	DIO
Hodnoty ploch	526 117	5 045 785
	524 412	5 064 489
	529 432	4 964 910
	526 003	5 020 314
	521 384	4 998 200
	525 784	5 019 250
Průměr	525 522	5 018 825
SD	2 619	35 062
RSD (%)	0,49	0,70

RSD dosahovala hodnoty < 5 %.

## 6.2.5 Správnost metody

Pro ověření správnosti metody byla použita metoda standardního přídatku.

### 6.2.5.1 Správnost Cilkanol

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,3256 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ tablety, tj. 0,0800 g. Do vzorku bylo přidáno 2 ml vnějšího standardu troxerutinu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ). Další postup byl totožný s přípravou vzorku z tablety dle kapitoly 5.3.5.

Bylo připraveno a analyzováno 6 pracovních roztoků s přídatkem vnějšího standardu. U každého roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Z hodnot ploch píků vzorku byla pro každý roztok vypočítána průměrná plocha píku a ta byla následně přepočítána na navážku 0,0800 g. Pro výpočet výtěžnosti byl použit průměr ploch z hodnot stanovení přesnosti, plochy píků přípravků s přídatkem standardů a plochy samotných standardů odpovídající přidávané koncentraci. Rozdílem a poměrem ploch s přídatkem a bez přídatku standardů v přípravku vůči plochám samotných standardů byla zjištěna hodnota výtěžnosti.

Tabulka 19 – Správnost Cilkanol

SPRÁVNOST	TRO
Hodnoty výtěžností (%)	96,54
	99,30
	100,89
	96,68
	99,34
	98,04
Průměr	98,47
SD	1,70
RSD (%)	1,73

Průměrná hodnota výtěžnosti byla dosažena v rozmezí 95 % - 105 %. Pro RSD (%) byla dosažena hodnota < 5 %.



### 6.2.5.2 Správnost Detralex

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,6713 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ tablety tj. 0,1600 g. Do vzorku bylo přidáno 2 ml vnějšího standardu diosminu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ) a 2 ml hesperidinu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ). Další postup byl totožný s přípravou vzorku z tablety dle kapitoly 5.3.5.

Bylo připraveno a analyzováno 6 pracovních roztoků s přidavkem vnějšího standardu. U každého roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Z hodnot ploch píků vzorku byla pro každý roztok vypočítána průměrná plocha píku a ta byla následně přeočítána na navážku 0,1600 g. Pro výpočet výtěžnosti byl použit průměr ploch z hodnot stanovení přesnosti, plochy píků přípravků s přidavkem standardů a plochy samotných standardů odpovídající přidávané koncentraci. Rozdílem a poměrem ploch s přidavkem a bez přidavku standardů v přípravku vůči plochám samotných standardů byla zjištěna hodnota výtěžnosti.

Tabulka 20 – Správnost Detralex

SPRÁVNOST	HES	DIO
Hodnoty výtěžností (%)	99,50	101,70
	101,20	101,08
	100,49	101,02
	96,84	101,15
	101,16	99,61
	99,10	101,45
Průměr	99,72	101,00
SD	1,65	0,72
RSD (%)	1,65	1,72

Průměrná hodnota výtěžností byla dosažena v rozmezí 95 % a 105 %. Pro RSD (%) byla dosažena hodnota < 5 %.

### 6.2.5.3 Správnost Hemodin Prebio Forte

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 1,0167 g. Tablety byly homogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ tablety, tj. 0,2500 g. Do vzorku bylo přidáno 2 ml vnitřního standardu hesperidinu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ), 2 ml diosminu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ) a 2 ml rutinu ( $c = 2500 \text{ mg/l}$ ). Další postup byl totožný s přípravou vzorku z tablety dle kapitoly 5.3.5.

Bylo připraveno a analyzováno 6 pracovních roztoků s přidavkem vnějšího standardu. U každého roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Z hodnot ploch píků vzorku byla pro každý roztok vypočítána průměrná plocha píku a ta byla následně přepočítána na navážku 0,2500 g. Pro výpočet výtěžnosti byl použit průměr ploch z hodnot stanovení přesnosti, plochy píků přípravků s přidavkem standardů a plochy samotných standardů odpovídající přidávané koncentraci. Rozdílem a poměrem ploch s přidavkem a bez přidavku standardů v přípravku vůči plochám samotných standardů byla zjištěna hodnota výtěžnosti.

*Tabulka 21 – Správnost Hemodin Prebio Forte*

SPRÁVNOST	RUT	HES	DIO
Hodnoty výtěžnosti (%)	98,90	101,87	104,28
	98,77	99,28	104,94
	95,46	102,62	104,06
	95,66	99,64	104,42
	95,89	103,12	104,46
	95,31	104,89	103,95
Průměr	96,66	101,90	104,35
SD	1,69	2,14	0,35
RSD (%)	1,75	2,10	0,34

Průměrná hodnota výtěžnosti byla dosažena v rozmezí 95 % a 105 %. Pro RSD (%) byla dosažena hodnota < 5 %.

#### **6.2.5.4 Správnost MobiVen Micro**

Deset tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 1,0381 g. Tablety byly zhomogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi ¼ tablety, tj. 0,2500 g. Do vzorku bylo přidáno 2 ml vnějšího standardu diosminu (c = 2500 mg/l) a 2 ml hesperidinu (c = 2500 mg/l). Další postup byl totožný s přípravou vzorku z tablety dle kapitoly 5.3.5.

Bylo připraveno a analyzováno 6 pracovních roztoků s přidavkem vnějšího standardu. U každého roztoku byly provedeny 3 nástřiky na kolonu. Z hodnot ploch píků vzorku byla pro každý roztok vypočítána průměrná plocha píku a ta byla následně přepočítána na navážku 0,2500 g. Pro výpočet výtěžnosti byl použit průměr ploch z hodnot stanovení přesnosti, plochy píků přípravků s přidavkem standardů a plochy samotných standardů odpovídající přidávané koncentraci. Rozdílem a poměrem ploch s přidavkem

a bez přidavku standardů v přípravku vůči plochám samotných standardů byla zjištěna hodnota výtěžnosti.

*Tabulka 22 – Správnost MobiVen Micro*

SPRÁVNOST	HES	DIO
Hodnoty výtěžnosti (%)	95,18	98,82
	96,71	98,29
	96,36	99,70
	96,50	99,99
	96,71	101,09
	96,00	99,80
Průměr	96,24	99,62
SD	0,58	0,97
RSD (%)	0,60	0,97

Průměrná hodnota výtěžnosti byla dosažena v rozmezí 95 % a 105 %. Pro RSD (%) byla dosažena hodnota < 5 %.

### **6.3 Stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích a ve farmaceutických přípravcích**

Vypracovaná metoda byla použita pro stanovení rutinu, troxerutinu, diosminu a hesperidinu v potravních doplňcích a ve farmaceutických přípravcích. Jednotlivé přípravky mají odlišné složení stanovovaných analytů. V přípravku Cilkanol je obsaženo 300 mg troxerutinu, v přípravku Detralex je obsaženo 450 mg diosminu, 50 mg hesperidinu. V přípravku Hemodin Prebio Forte je obsaženo 225 mg diosminu, 75 mg hesperidinu, 40 mg rutinu. V přípravku MobiVen Micro je obsaženo 450 mg diosminu a 50 mg hesperidinu. Uvedené množství je vztaženo na množství uvedených analytů v jedné tabletě/tobolce. Pro lepší přehled jsou hodnoty uvedeny v Tabulka 23.

*Tabulka 23 – Množství analytů v jedné tabletě.*

Přípravek	RUT (mg)	TRO (mg)	DIO (mg)	HES (mg)
Cilkanol	-	300	-	-
Detralex	-	-	450	50
MobiVen Micro	-	-	450	50
Hemodin Prebio Forte	40	-	225	75

Byly připraveny vzorky pro stanovení množství analytů v jednotlivých přípravcích dle kapitoly 5.3.4. U každého roztoku byly provedeny tři HPLC analýzy. Z průměrů

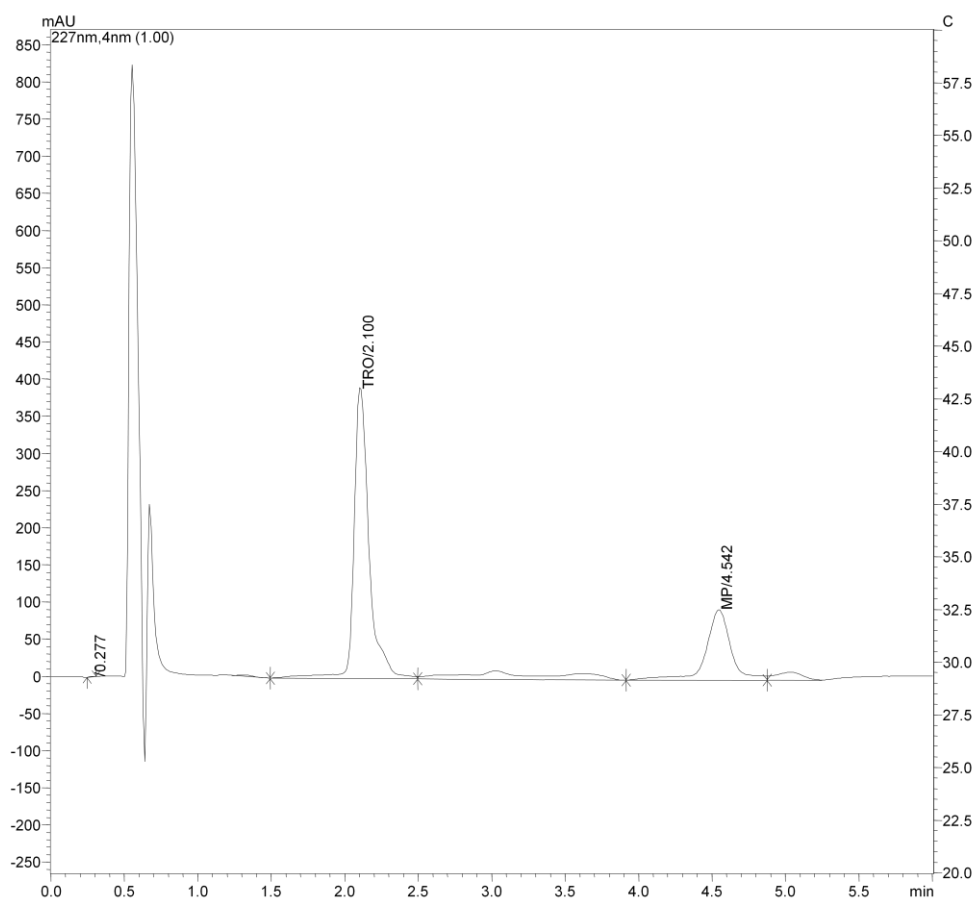
naměřených hodnot byl vypočítán obsah jednotlivých analytů v mg ve výše uvedených přípravcích. Z průměrných hodnot obsahu analytů v jedné tabletě každého přípravku a z naměřených hodnot bylo vypočítáno, jaké množství analytů v procentech tableta opravdu obsahuje.

### 6.3.1 Stanovení obsahu troxerutinu v přípravku Cilkanol

V přípravku je deklarované množství 300 mg troxerutinu v jedné tabletě. Průměrný obsah troxerutinu získaný danou metodou byl 289,83 mg. Toto množství odpovídá 96,61 %.

Tabulka 24 – Deklarovaný a zjištěný obsah analytů v přípravku Cilkanol

Analyt	Deklarovaný obsah [mg/tab.]	Zjištěný obsah [%]
troxerutin	300	96,61



Obrázek 31 – Chromatografický záznam – stanovení obsahu troxerutinu (TRO) v přípravku Cilkanol

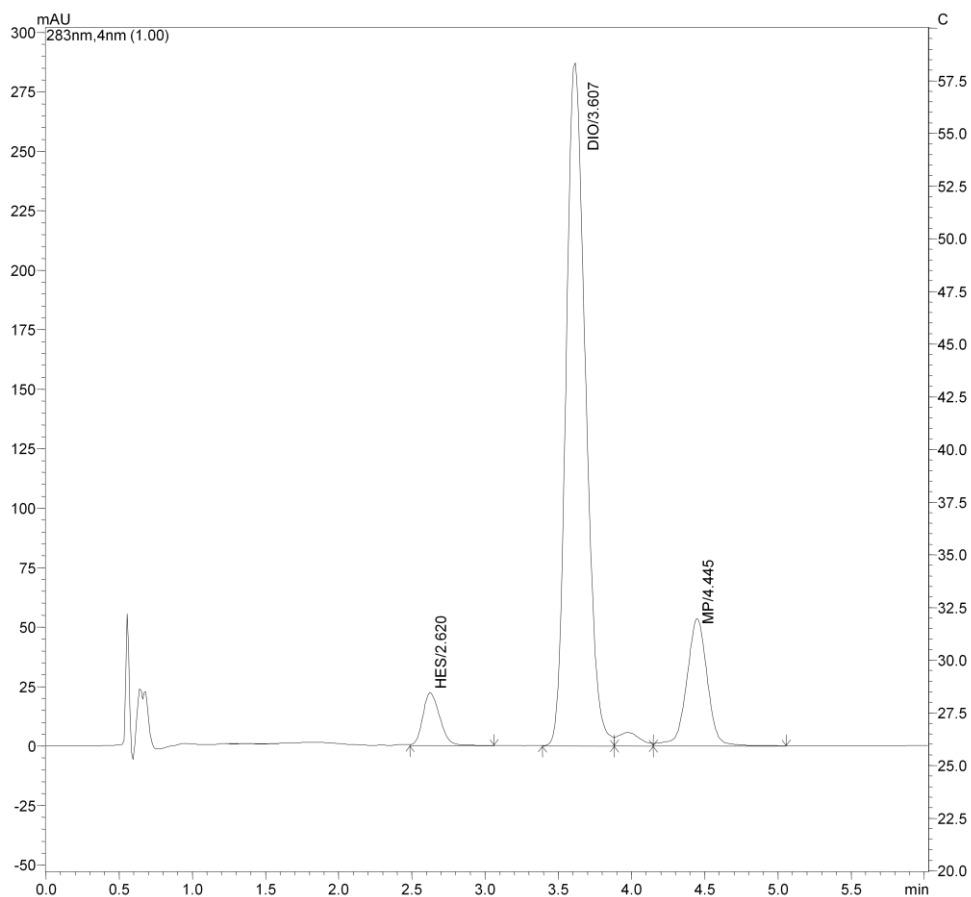
### 6.3.2 Stanovení obsahu hesperidinu a diosminu v přípravku Detralex

V přípravku je deklarované množství 50 mg hesperidinu a 450 mg diosminu v jedné tabletě. Průměrný obsah hesperidinu získaný danou metodou byl 49,82 mg. Toto množství odpovídá 99,64 %.

Průměrný obsah diosminu získaný danou metodou byl 466,97 mg. Toto množství odpovídá 103,77 %.

Tabulka 25 – Deklarovaný a zjištěný obsah analytů v přípravku Detralex

Analyt	Deklarovaný obsah [mg/tabl.]	Zjištěný obsah [%]
hesperidin	50	99,64
diosmin	450	103,77



Obrázek 32 – Chromatografický záznam – stanovení obsahu hesperidinu (HES) a diosminu (DIO) v přípravku Detralex

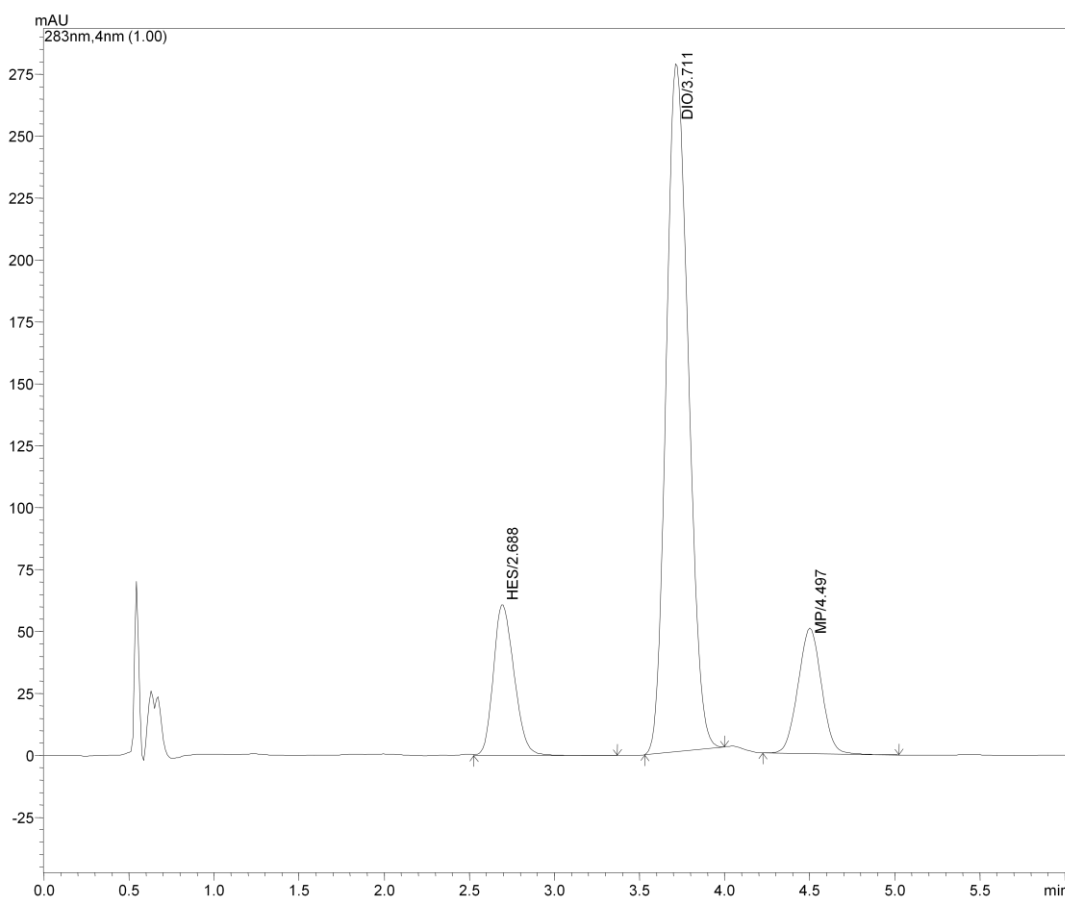
### 6.3.3 Stanovení obsahu hesperidinu a diosminu v přípravku MobiVen Micro

V přípravku je deklarované množství 50 mg hesperidinu a 450 mg diosminu v jedné tabletě. Průměrný obsah hesperidinu získaný danou metodou byl 48,19 mg. Toto množství odpovídá 96,37 %.

Průměrný obsah diosminu získaný danou metodou byl 477,77 mg. Toto množství odpovídá 106,17 %.

Tabulka 26 – Deklarovaný a zjištěný obsah analytů v přípravku MobiVen Micro

Analyt	Deklarovaný obsah [mg/tabl.]	Zjištěný obsah [%]
hesperidin	50	96,37
diosmin	450	106,17



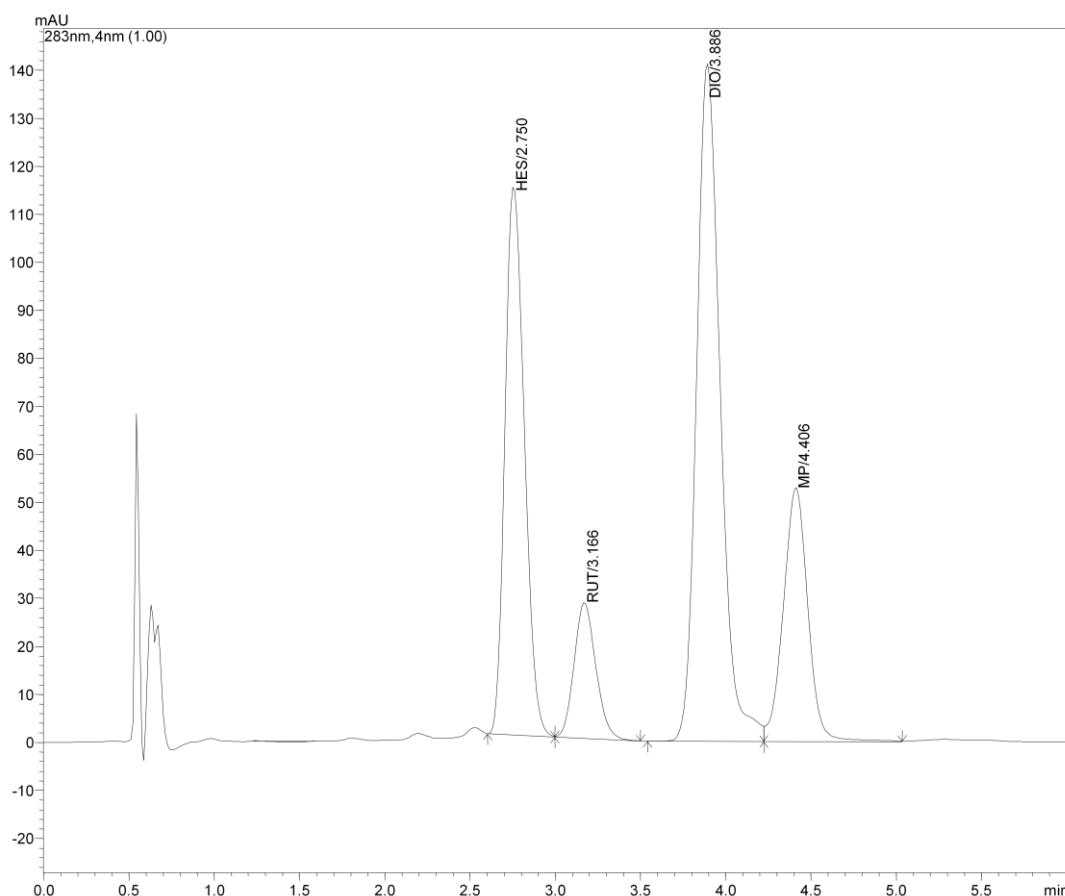
Obrázek 33 – Chromatografický záznam – stanovení obsahu hesperidinu (HES) a diosminu (DIO) v přípravku MobiVen Micro

### 6.3.4 Stanovení obsahu rutinu, diosminu a hesperidinu v přípravku Hemodin Prebio Forte

V přípravku je deklarované množství 40 mg rutinu, 75 mg hesperidinu a 225 mg diosminu v jedné tabletě. Průměrný obsah rutinu získaný danou metodou byl 33,72 mg. Toto množství odpovídá 84,31 %. Průměrný obsah hesperidinu získaný danou metodou byl 62,55 mg. Toto množství odpovídá 83,40 %. Průměrný obsah diosminu získaný danou metodou byl 194,04 mg. Toto množství odpovídá 86,24 %.

Tabulka 27 – Deklarovaný a zjištěný obsah analytů v přípravku Hemodin Prebio Forte

Analyt	Deklarovaný obsah [mg/tabl.]	Zjištěný obsah [%]
rutin	40	84,31
hesperidin	75	83,40
diosmin	225	86,24



Obrázek 34 – Chromatografický záznam – stanovení obsahu rutinu (RUT), hesperidinu (HES) a diosminu (DIO) v přípravku Hemodin Prebio Forte

## 7 ZÁVĚR

Byla vypracovaná HPLC metoda pro stanovení rutinu, troxerutinu, diosminu a hesperidinu. Uvedené analyty byly stanovovány ve farmaceutických přípravcích Cilkanol (Zentiva, a. s.), Detralex (Les Laboratoires Servier) a potravních doplňcích, Hemodin Prebio Forte (Valosun a. s.) a MobiVen Micro (Vulm cz a. s.).

Při optimalizaci byly stanoveny následující optimální podmínky.

Analýza látek probíhala při průtoku 1 ml/min, byl zvolen nástřik 5  $\mu$ l. Pro detekci byly zvoleny dvě vlnové délky, podle absorpčních maxim jednotlivých analytů, tzn. 283 nm pro hesperidin a 255 nm pro rutin, troxerutin, diosmin a vnitřní standard methylparaben, pro detekci byl použit DAD detektor.

Analýza probíhala na koloně Ascentis Express RP – Amide (10 cm x 3,0 mm, 2,7  $\mu$ m) Supelco Analytical, jako mobilní fáze byla zvolena acetonitril/voda 30/70 s přidavkem 0,5 % kyseliny octové na úpravu pH 3.

Analýza probíhala při teplotě 50°C a tlaku 18,6 MPa.

Při volbě vnitřního standardu byl stanoven jako nejvhodnější methylparaben.

Retenční čas troxerutinu byl 2,100 min, hesperidinu 2,750 min, rutinu 3,166 min, diosminu 3,886 min, methylparaben (IS) migroval jako poslední v čase 4,406 min.

U testování parametru linearit, ve sledovaném koncentračním rozmezí byl dosažen korelační koeficient 0,99907 pro diosmin, 0,99786 pro hesperidin, 0,9998 pro rutin, 0,99623 pro troxerutin, 0,99723 pro methylparaben.

Opakovatelnost vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka dosahovala u pracovních roztoků všech koncentračních hladin hodnoty < 1 %.

U pracovního roztoku o koncentraci 10 mg/l se RSD pohybovala v rozmezí od 0,31 % do 0,92 %. Nejnižší hodnoty dosáhla u methylparabenu a nejvyšší u rutinu.

U pracovního roztoku o koncentraci (c=100 mg/l) se RSD pohybovala v rozmezí od 0,51 % do 0,97 %, nejnižší hodnoty dosáhla u hesperidinu a nejvyšší u rutinu.

U pracovního roztoku o koncentraci (c=500 mg/l) se RSD pohybovala v rozmezí od 0,05 % do 0,48 %, nejnižší hodnoty dosáhla u troxerutinu a nejvyšší u diosminu.

Přesnost, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka RSD ve všech stanovovaných farmaceutických přípravcích a potravních doplňcích dosahovala hodnoty < 5 %.

U Přípravku Hemodin Prebio Forte dosahovala RSD 1,39 % pro rutin, 1,54 % pro hesperidin, 3,50 % pro diosmin. U přípravku Cilkanol dosahovala RSD 1,43 % pro rutin. U přípravku Detralex dosahovala RSD 1,58 % pro hesperidin, 1,72 % pro



diosmin. U přípravku MobiVen Micro dosahovala RSD 0,49 % pro hesperidin, 0,70 % pro diosmin.

Správnost byla jako vyjádřena hodnotou výtěžnosti.

Ve všech stanovovaných farmaceutických přípravcích a potravních doplňcích byla dosažena výtěžnost v rozmezí 95 % - 105 %. Pro RSD (%) byla dosažena hodnota < 5 %.

Výtěžnost se pohybovala v rozmezí 96 % - 104 %.

Bylo vypočítáno rozlišení mezi píky R, jeho hodnota se pohybovala v rozmezí 1,993 - 3,183. Požadavek na  $R > 1.5$  byl splněn.

Byl vypočítán faktor asymetrie jednotlivých píků T, jeho hodnota se pohybovala od 1,057 – 1,603. Požadavek na  $T < 2$  byl splněn.

Byl vypočítán počet teoretických pater N. Hodnota N byla v rozmezí 2189 – 4621. Požadavek na  $N > 1500$  byl splněn.

Zjištěný obsah stanovovaných analytů ve farmaceutických přípravcích Cilkanol a Detralex odpovídá obsahu deklarovanému výrobcem, nachází se rozmezí od 95 - 105 %. Obsah stanovovaných analytů v potravních doplňcích odpovídá u MobiVen Micro 96,37 % pro hesperidin, 106,17 % pro diosmin a u potravního doplňku Hemodin Prebio Forte 84,31 % pro rutin, 83,40 % pro hesperidin, 86,24 % pro diosmin obsahu deklarovanému výrobcem. Protože se jedná o potravní doplňky, deklarovaný obsah není garantován a nemusí odpovídat danému obsahu.

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Vzorec 2 – Fenylchromanu [20].....	13
Obrázek 2 – Vzorec rutinu [16] .....	14
Obrázek 3 – Vzorec troxerutinu [17].....	15
Obrázek 4 – Vzorec hesperidinu [18] .....	17
Obrázek 5 – Vzorec diosminu [19].....	18
Obrázek 6 – Schéma kapalinového chromatografu [31] .....	21
Obrázek 7 – Absorpční spektrum v mobilní fázi - rutin .....	32
Obrázek 8 – Absorpční spektrum v mobilní fázi – troxerutin .....	33
Obrázek 9 – Absorpční spektrum v mobilní fázi – hesperidin .....	34
Obrázek 10 – Absorpční spektrum v mobilní fázi – diosmin .....	35
Obrázek 11 – Absorpční spektrum v mobilní fázi - methylparaben.....	36
Obrázek 12 – Onyx Monolithic C 18 100 x 4,6 mm, acetonitril/voda (30:70) .....	37
Obrázek 13 – Onyx Monolithic C 18 100 x 4,6 mm, acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 30:70 .....	37
Obrázek 14 – Ascentis Express C18 3 cm x 4,6 mm, 2,7 $\mu$ m, acetonitril/voda+ kyselina octová (pH 3) 25:75.....	38
Obrázek 15 – Ascentis Express Phenyl – Hexyl 10 cm x 3,00 mm, 2,7 $\mu$ m, methanol/voda 50:50 .....	38
Obrázek 16 – Ascentis Express Phenyl – Hexyl 10 cm x 3,00 mm, 2,7 $\mu$ m, methanol/voda 60:40 .....	39
Obrázek 17 – Synergi 4 $\mu$ Fusion - RP 80 75 x 3,00 mm, 4 $\mu$ , acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 30:70.....	39
Obrázek 18 – Synergi 4 $\mu$ Fusion - RP 80 75 x 3,00 mm, 4 $\mu$ , acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 28:72.....	40
Obrázek 19 – Synergi 4 $\mu$ Polar - RP 80 A 75 x 3,00 mm, 4 $\mu$ , methanol/voda + kyselina octová (pH 3) 50:50.....	41
Obrázek 20 – Synergi 4 $\mu$ Hydro RP - 80A 75 x 3,00 mm, 4 $\mu$ , acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 25:75 .....	41
Obrázek 21 – Synergi 4 $\mu$ Hydro - RP 80A 75 x 3,00 mm, 4 $\mu$ , methanol/voda + kyselina octová (pH 3) 45:55.....	42
Obrázek 22 – Zorbac SB – CN 4,6 x 150 mm, 5 $\mu$ m acetotril/voda 30:70.....	43

Obrázek 23 – Ascentis Express PR – Amide 10 cm x 3,0 mm, 2,7 µm, acetonitril/voda + kyselina octová (pH 3) 30:70 .....	43
Obrázek 24 – Ascentis Express RP – Amide 10 cm x 3,0 mm, 2,7 µm, methanol/voda + kyselina octová (pH 3) 40:60 .....	44
Obrázek 25 – Typový chromatogram za optimálních separačních podmínek.....	47
Obrázek 26 – Kalibrační závislost pro diosmin.....	48
Obrázek 27 – Linearita hesperidin.....	49
Obrázek 28 – Linearita rutin.....	50
Obrázek 29 – Linearita troxerutin.....	51
Obrázek 30 – Linearita methylparaben.....	52
Obrázek 31 – Chromatografický záznam – stanovení obsahu troxerutinu (TRO) v přípravku Cilkanol.....	60
Obrázek 32 – Chromatografický záznam – stanovení obsahu hesperidinu (HES) a diosminu (DIO) v přípravku Detralex .....	61
Obrázek 33 – Chromatografický záznam – stanovení obsahu hesperidinu (HES) a diosminu (DIO) v přípravku MobiVen Micro.....	62
Obrázek 34 – Chromatografický záznam – stanovení obsahu rutinu (RUT), hesperidinu (HES) a diosminu (DIO) v přípravku Hemodin Prebio Forte .....	63

## 9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Přístroje podmínky separace.....	24
Tabulka 2 – Příprava pracovních roztoků pro kalibraci, objem analytů v 10 ml roztoku methanolu.....	27
Tabulka 3 – Optimální podmínky pro HPLC analýzu .....	45
Tabulka 4 – Počet teoretických pater.....	45
Tabulka 5 – Asymetrie chromatografických píků .....	46
Tabulka 6 – Rozlišení chromatografických píků .....	46
Tabulka 7 - Parametry lineární regrese pro diosmin.....	48
Tabulka 8 – Parametry lineární regrese pro hesperidin .....	49
Tabulka 9 – Parametry lineární regrese pro rutin .....	50
Tabulka 10 – Parametry lineární regrese pro troxerutin .....	51
Tabulka 11 – Parametry lineární regrese pro methylparaben .....	52
Tabulka 12 - Opakovatelnost analýzy pracovních roztoků o koncentraci (c=10 mg/l)..	53
Tabulka 13 - Opakovatelnost analýzy pracovních roztoků o koncentraci (c=100 mg/l)	53
Tabulka 14 - Opakovatelnost analýzy pracovních roztoků o koncentraci (c=500 mg/l)	53
Tabulka 15 – Přesnost metody - Hemodin Prebio Forte.....	54
Tabulka 16 – Přesnost metody – Cilkanol .....	54
Tabulka 17 – Přesnost metody – Detralex .....	55
Tabulka 18 – Přesnost metody - MobiVen Micro .....	55
Tabulka 19 – Správnost Cilkanol.....	56
Tabulka 20 – Správnost Detralex.....	57
Tabulka 21 – Správnost Hemodin Prebio Forte.....	58
Tabulka 22 – Správnost MobiVen Micro .....	59
Tabulka 23 – Množství analytů v jedné tabletě. ....	59
Tabulka 24 – Deklarovaný a zjištěný obsah analytů v přípravku Cilkanol .....	60
Tabulka 25 – Deklarovaný a zjištěný obsah analytů v přípravku Detralex .....	61
Tabulka 26 – Deklarovaný a zjištěný obsah analytů v přípravku MobiVen Micro.....	62
Tabulka 27 – Deklarovaný a zjištěný obsah analytů v přípravku Hemodin Prebio Forte	63

## 10 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] PIETTA P. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, vol. 63, s. 1035 - 1042.
- [2] ZHANG Z., ZUO Z., LIN G. Intestinal and Hepatic Glucuronidation of Flavonoids. *Molecular pharmaceutics.* 2007, vol. 4, s. 833 - 845.
- [3] FENG Z., FAN S., ZHENG Y., LU J., WU D., SHAN Q., HU B. Troxerutin Protects the Mouse Liver against Oxidative Stress – Mediated Injury Induced by D - Galactose. *J. Agric. Food Chem.* 2009, vol. 57, s. 7731 - 7736.
- [4] ŠTOČKOVÁ L., MATĚJOVÁ E., JANOVSKÁ D., SÝKOROVÁ S. Porovnávání výsledků tří analytických metod pro stanovení obsahu rutinu v pohance tatarské. *Chem. Listy.* 2009, vol. 103, s. 827 - 831.
- [5] MODRIANSKÝ M., VALENTOVÁ K., PŘIKRYLOVÁ V., WALTEROVÁ D. Přírodní látky v prevenci onemocnění trávicího traktu. *Chem. Listy.* 2003, vol. 97, s. 540 - 547.
- [6] ČOPIKOVÁ J., UHER M., LAPČÍK O., MORAVCOVÁ J., DRAŠAR P. Přírodní barevné látky. *Chem. Listy.* 2005, vol. 99, s. 802-816.
- [7] SRINIVASAN S., PARI L. Ameliorative effect of diosmin, a citrus flavonoid against streptozotocin - nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats. *Chem.Biol. Interact.* 2012, vol. 195, s. 45-51.
- [8] MILENKOVIČ D., DEVAL CH., DUBRAY C., MAZUR A., MORAND CH. Hesperidin Displays Relevant Role in the Nutrigenomic Effect of Orange Juice on Blood Leukocytes in Human Volunteers: A Randomized Controlled Cross - Over Study. *PLoS ONE.* 2011, vol. 6, s. 1 - 9.
- [9] YANG G., LIU P., QU X., XU M., QU Q., WANG CH., HU X., WANG Z. The simultaneous separation and determination of six flavonoids and troxerutin in rat urine and chicken plasma by reversed - phase high - performance liquid

- chromatography with ultraviolet - visible detection. *J. Chromatogr. B.* 2007, vol. 856, s. 222 - 228.
- [10] SEO Ch., LEE J., JUNG D., LEE H., LEE J., HA H., LEE M., SHIN H. Simultaneous Determination of Liquiritin, Hesperidin, and Glycyrrhizin by HPLC - photodiode Array Detection and the Anti-inflammatory Effect of Pyungwi - san. *Arch Pharm Res.* 2011, vol. 34, s. 203 - 210.
- [11] LEE E., YOO K., PATIL B. Development of a Rapid HPLC-UV Method for Simultaneous Quantification of Protodioscin and Rutin in White and Green Asparagus Spears. *J. Food Sci.* 2010, vol. 75, s. 703 - 709.
- [12] LI F., NING S., LI Y., YU Y., SHEN C., DUAN G. Optimisation of Infrared - assisted Extraction of Rutin from Crude Flos Sophorae Immaturus Using Response Surface Methodology and HPLC Analysis. *Phytoch. Anal.* 2011, DOI 10.1007/s11418-011-0617-8
- [13] PATIL J., MURTHY K., JAYAPRAKASHA G., CHETTI M., PATIL B. Bioactive Compounds from Mexican Lime (*Citrus aurantifolia*) Juice Induce Apoptosis in Human Pancreatic Cells. *J. Agric. Food Chem.* 2009, vol. 57, s. 10933 - 10942.
- [14] FECKA I., TUREK S. Determination of Water - Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage. *J. Agric. Food Chem.* 2007, vol. 55, s. 10908-10917.
- [15] ZHENG G., YANG D., WANG D., ZHOU F., YANG X., JIANG L. Simultaneous Determination of Five Bioactive Flavonoids in Pericarpium Citri Reticulatae from China by High - Performance Liquid Chromatography with Dual Wavelength Detection. *J. Agric. Food Chem.* 2009, vol. 57, s. 6552 - 6557.
- [16] PubChem, Rutin - Compound Summary, dostupné z: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280805&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5280805&loc=ec_rcs) (citováno 10. 2. 2012)

- [17] PubChem, Troxerutin - Compound Summary, dostupné z: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5486699&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5486699&loc=ec_rcs) (citováno 10. 2. 2012)
- [18] PubChem, Hesperidin - Compound Summary, dostupné z: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=10621&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=10621&loc=ec_rcs) (citováno 10. 2. 2012)
- [19] PubChem, Diosmin - Compound Summary, dostupné z: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5281613&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=5281613&loc=ec_rcs) (citováno 10. 2. 2012)
- [20] PubChem, 2 - Phenylchromane - Compound Summary, dostupné z: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=94156&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=94156&loc=ec_rcs) (citováno 10. 2. 2012)
- [21] WANG Y.,ZHANG H., ZHANG G., TAO W., TANG S. Interaction of flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *Journal of Luminiscence*. 2007, vol. 126, s. 211 - 218.
- [22] KLOUDA P. *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, s. ISBN 80-86369 – 07 - 2.
- [23] SIEGERS C., ALI S., TEGTMEIER M. Aescin and troxerutin as a successful combination for the treatment of inner ear perfusion disturbances. *Phytomedicine*. 2008, vol. 15, s. 160 - 163.
- [24] KLIMEK B., OLSZEWSKA M., TOKAR M. Simultaneous Determination of Flavonoids and Phenylethanoids in the Flowers of *Verbascum densiflorum* and *V. phlomoides* by High - performance Liquid Chromatography. *Phytoch. Anal.* 2010, vol. 21, s. 150-156.
- [25] KANAZE F., GABIELI CH., KOKKALOU E., GEORGARAKIS M., NIOPAS I. Simultaneous reversed - phase high - performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, vol. 33, s. 243 – 249.

- [26] EL – SHAF AE A., EL – DOMIATY M. Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, vol. 26, s. 539-545.
- [27] WEON J., YANG H., MA J., MA CH. Simultaneous determination of six active components in traditional herbal medicine ‘Oyaksungisan’ by HPLC - DAD. *J Nat Med.* 2012, DOI 10.1007/s11418-011-0617-8
- [28] SAEIDI I., HADJMOHAMMADI M., PEYROVI M., IRANSHAHI M., BARFI B., BABAEI A., DUST A. HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in Iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction. 2011, vol. 56, s. 419 - 422.
- [29] KUNTIĆ V., PEJIĆ N., IVKOVIĆ B., VUJIĆ Z., ILIĆ K., MIĆIĆ, VUKOJEVIĆ V. Isocratic RP - HPLC method for rutin determination in solid oral dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, vol. 43, s. 718 - 721.
- [30] ZU Y., LI C., FU Y., ZHAO C. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides L.*) leaves by RP - HPLC with DAD. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, vol. 41, s. 714 - 719.
- [31] ŠTULÍK K. a kol. *Analytické separační metody*. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 2005, s. 136, ISBN 80 – 246 – 0852 - 9.
- [32] HPLC.CZ, Základní charakteristiky chromatografického procesu, dostupné z: <http://www.hplc.cz/> (citováno 12. 3. 2012)
- [33] JOVANOVIĆ S. V., STEENKEN S., TOSIĆ M., MARJANOVIĆ B., SIMIĆ M. G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116 s. 4846 – 4851.
- [34] SERRA H., MENDES T., BRONZE M., SIMPLÍCIO A. Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16 (7), s. 4009 – 4018.
- [35] SIGMA - ALDRICH, Ascentis Express RP-Amide, dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/technical> -



documents/articles/analytical/brochures/ascentis-express - rp - amide.html  
(citováno: 16. 3. 2012)

- [36] CHROMSERVIS, Fáze SYNERGI, dostupné z:  
<http://chromservis.cz/item/SYNERGI-phase?lang=CZ>  
(citováno 16. 3. 2012)
- [37] FORTUNESCI,  
[http://www.fortunesci.com/image/download/4984\\_I\\_Synergi\\_Brochure\\_UPDATED\\_INTL.pdf](http://www.fortunesci.com/image/download/4984_I_Synergi_Brochure_UPDATED_INTL.pdf) (citováno: 16. 3. 2012)
- [38] labicom, Ascentis Express HPLC Resource Guide, dostupné z:  
[http://www.labicom.cz/administrace/ckfinder/userfiles/files/Supel\\_Res\\_Guid\\_Ascen\\_Express.pdf](http://www.labicom.cz/administrace/ckfinder/userfiles/files/Supel_Res_Guid_Ascen_Express.pdf)  
(citováno 16. 3. 2012)
- [39] chem.agilent, Agilent Zorbax SB - CN, dostupné z:  
<http://www.chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/820644-005g.pdf>  
(citováno 16. 3. 2012)
- [40] sigmaaldrich, Ascentis Express Phenyl/Hexyl HPLC Columns, dostupné z:  
<http://www.sigmaaldrich.com/analytical - chromatography/analytical - products.html?TablePage=101289098> (citováno 17. 3. 2012)
- [41] chem.agilent, Agilent Zorbax SB - CN datasheet, dostupné z:  
<http://www.chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/820644-005g.pdf>  
(citováno 17. 3. 2012)
- [42] HPLC.CZ, Definice: Validační program pro statistické zpracování analytických dat, dostupné z: <http://www.hplc.cz/> (citováno 23. 3. 2012)
- [43] HPLC.CZ, Nejistoty měření a návaznost výsledků, dostupné z:  
<http://www.hplc.cz/> (citováno 23. 3. 2012)
- [44] HPLC.CZ, Hodnocení linearity, dostupné z: <http://www.hplc.cz/> (citováno 23. 3. 2012)

- [45] HPLC.CZ, Validační program, dostupné z: <http://www.hplc.cz/> (citováno 23. 3. 2012)
- [46] HPLC.CZ, Separace na chromatografické koloně, dostupné z: <http://www.hplc.cz/> (citováno 1. 4. 2012)
- [47] HPLC.CZ, Asymetrie píku, dostupné z: [http://www.hplc.cz/Tip/asymm\\_factor.htm](http://www.hplc.cz/Tip/asymm_factor.htm) (citováno 1. 4. 2012)
- [48] Guidechem, Troxerutin (cas 7085 – 55- 4) MSDS, dostupné z: <http://www.guidechem.com/msds/7085-55-4.html> (citováno 1. 4. 2012)