

**Univerzita Karlova**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra analytickej chémie

Diplomová práca  
**Sekvenčná injekčná chromatografia**  
**pokročilé a dvojdimenzionálne separácie**

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

## **Prehlásenie**

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal sú uvedené v zozname literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové, dňa

Na tomto mieste by som rád poďakoval môjmu školiteľovi pánovi doc. PharmDr. Petrovi Chocholoušovi, PhD. za jeho užitočné a podnetné rady, nápady, za pomoc a trpezlivosť v priebehu vypracovávaní celej diplomovej práce.

## **Abstrakt**

Katedra: Katedra analytickej chémie

Kandidát: Matej Gužiňák

Školiteľ: doc. PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Sekvenčná injekčná chromatografia – pokročilé a dvojdimenzionálne separácie

Predmetom tejto práce bol vývoj dvoch analytických metód určených na separáciu látok obsiahnutých v silymaríne, ich porovnanie a príprava šablóny v programe Microsoft Excel na zjednodušenie vyhodnocovania dát.

U prvej vyvinutej metódy, s názvom klasická sekvenčná injekčná chromatografia (1D-SIC), bola v priebehu analýzy použitá dlhá chromatografická kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm) a predkolóna opti-guard® C18 (1mm). Mobilnú fázu tvorila zmes acetonitrilu s roztokom kyseliny fosforečnej s pH 2,0 pripravená v pomere 27:73. Pre analýzu bol zvolený izokratický režim, celková dĺžka bola 16,3 minút s prietokovou rýchlosťou 5 µL/s.

U druhej vyvinutej metódy, s názvom dvojdimenzionálna sekvenčná injekčná chromatografia (2D-SIC), bola pre prvú dimenziu zvolená kolóna Kinetex® 5 µm EVO C18 (30 x 3,0 mm) s predkolónou opti-guard® C18 (1mm). V druhej dimenzií bola použitá kolóna Ascentis® Express F5 (30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). Režim analýzy bol zvolený izokratický o celkovej dĺžke 35,3 minút s prietokovou rýchlosťou 10 µL/s. Ako mobilná fáza bola použitá zmes acetonitrilu s roztokom kyseliny fosforečnej s pH 2,0 pripravená v pomere 30:70.

Pri oboch analýzach bol použitý systém pre sekvenčnú injekčnú chromatografiu riadený počítačovým softvérom SIAsoft v1.1.7. Podrobný popis systému a nastavenie programu pre jednotlivé analýzy je obsiahnutý v texte práce.

V programe Microsoft Excel bola vytvorená komplexná šablóna, ktorá výrazne uľahčila vyhodnocovanie získaných dát v priebehu jednotlivých separácií.

Kľúčové slová : sekvenčná injekčná chromatografia, 1D-SIC, 2D-SIC, silymarín

## **Abstract**

Department: Department of analytical chemistry

Candidate: Matej Gužiňák

Supervisor: doc. PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Sequential injection chromatography - advanced and two-dimensional separations

The subject of this work was the development of two analytical methods intended for separating substances contained in silymarin, their comparison and preparing a template in the Microsoft Excel program to simplify data evaluation.

In the first developed method, called classical sequential injection chromatography (1D-SIC), a long Ascentis® Express F5 chromatography column (10 cm x 4.6 mm, 5 µm) with an opti-guard® C18 pre-column (1 mm) was used during analysis. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile with phosphoric acid solution with pH 2.0 prepared in a ratio of 27:73. The isocratic mode was chosen for the analysis; the total length was 16.3 minutes with a flow rate of 5 µL/s.

In the second developed method, called two-dimensional sequential injection chromatography (2D-SIC), a Kinetex® 5 µm EVO C18 column (30 x 3.0 mm) with an opti-guard® C18 pre-column (1 mm) was chosen for the first dimension. In the second dimension, an Ascentis® Express F5 column (30 mm x 4.6 mm, 2.7 µm) was used. The analysis mode was chosen isocratic with a total length of 35.3 minutes with a flow rate of 10 µL/s. A mixture of acetonitrile with phosphoric acid solution with pH 2.0 prepared in a ratio of 30:70 was used as the mobile phase.

During each analysis, the sequential injection chromatography system was controlled by SIAsoft v1.1.7 computer software. A detailed description of the system and program settings for individual analyses is contained in the text of this work.

A complex template was created in the Microsoft Excel program, which significantly facilitated the evaluation of the obtained data during separations.

Keywords: sequential injection chromatography, 1D-SIC, 2D-SIC, silymarin

# 1 Obsah

2	Zoznam skratiek.....	9
3	Úvod.....	10
4	Cieľ a popis zadania práce .....	11
5	Teoretická časť.....	12
5.1	Silymarín.....	12
5.1.1	Pestrec mariánsky .....	12
5.1.2	Charakteristika .....	14
5.1.3	Rešerš.....	16
5.2	Sekvenčná injekčná chromatografia .....	18
5.2.1	Dvojdimenziálna sekvenčná injekčná chromatografia (2D - SIC) .....	18
5.2.2	Prístrojové usporiadanie .....	19
5.2.3	Chromatografické kolóny .....	20
5.2.3.1	Monolitické kolóny .....	20
5.2.3.2	Core-shell kolóny .....	21
5.3	Validácia analytickej metódy.....	23
5.3.1	Vybrané validačné parametre .....	23
5.3.1.1	Počet teoretických etáží (N) .....	23
5.3.1.2	Faktor symetrie píku ( $A_s$ ) .....	23
5.3.1.3	Rozlíšenie ( $R_s$ ).....	24
5.3.1.4	Opakovateľnosť .....	24
5.3.1.5	Linearita.....	24
5.3.1.6	Limit detekcie a limit stanoviteľnosti.....	25
6	Experimentálna časť .....	26
6.1	Použité prístroje a pomôcky .....	26
6.2	Príprava roztokov .....	27
6.2.1	Roztok kyseliny fosforečnej .....	27

6.2.2	Roztoky mobilnej fázy .....	27
6.2.3	Kalibračné roztoky .....	28
6.3	Použité vzorky .....	29
6.3.1	Štandardný roztok silymarínu .....	29
6.3.2	Vzorka z čaju .....	29
6.3.3	Vzorka z tabliet .....	30
6.3.4	Vzorky na určenie výťažnosti .....	31
6.4	Popis prístroja pre 1D-SIC .....	32
6.5	Popis prístroja pre 2D-SIC .....	33
6.6	Vyhodnocovanie dát .....	34
6.6.1	Základná úprava dát .....	34
6.6.2	Korekcia šumu Savitzky-Golay .....	35
6.6.3	Charakteristika píkov .....	38
7	Výsledky a diskusia .....	39
7.1	1D-SIC metóda .....	39
7.1.1	Vývoj metódy .....	39
7.1.1.1	Výber mobilnej a stacionárnej fázy .....	39
7.1.1.2	Nastavenie detektoru .....	40
7.1.1.3	Optimalizácia programu pre 1D-SIC .....	41
7.1.1.4	Vyvinutá metóda .....	41
7.1.2	Validácia vyvinutej metódy .....	41
7.1.2.1	Stanovenie lineariry odozvy .....	41
7.1.2.2	Limit detekcie a limit kvantifikácie .....	46
7.1.2.3	Opakovateľnosť .....	46
7.1.2.4	Výťažnosť .....	48
7.1.2.5	Ostatné validačné parametre .....	50
7.2	2D-SIC metóda .....	52

7.2.1	Vývoj metódy .....	52
7.2.1.1	Výber mobilnej a stacionárnej fázy .....	52
7.2.1.2	Optimalizácia programu pre 2D-SIC.....	52
7.2.1.3	Vyvinutá metóda .....	54
7.2.2	Validácia vyvinutej metódy .....	54
7.2.2.1	Stanovenie linearity odozvy .....	54
7.2.2.2	Limit detekcie a limit kvantifikácie.....	56
7.2.2.3	Opakovateľnosť .....	57
7.2.2.4	Výtlačnosť .....	58
7.2.2.5	Ostatné validačné parametre.....	58
8	Záver .....	60
9	Zoznam obrázkov a tabuliek.....	62
9.1	Zoznam obrázkov .....	62
9.2	Zoznam tabuliek.....	63
10	Použitá literatúra .....	65



## 2 Zoznam skratiek

1D	prvá dimenzia
1D-SIC	jednodimenzionálna sekvenčná injekčná chromatografia
2D	druhá dimenzia
2D – SIC	dvojdimenzionálna sekvenčná injekčná chromatografia
FDA	Správa potravín a liečiv (Food and Drug Administration)
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
ISB <sub>A</sub>	izosilibín A
ISB <sub>B</sub>	izosilibín B
KR1	kalibračný roztok s koncentráciou silymarínu 5 µg/mL
KR2	kalibračný roztok s koncentráciou silymarínu 10 µg/mL
KR3	kalibračný roztok s koncentráciou silymarínu 26 µg/mL
KR4	kalibračný roztok s koncentráciou silymarínu 50 µg/mL
KR5	kalibračný roztok s koncentráciou silymarínu 90 µg/mL
KR6	kalibračný roztok s koncentráciou silymarínu 120 µg/mL
KR7	kalibračný roztok s koncentráciou silymarínu 150 µg/mL
LOD	limit detekcie
LOQ	limit kvantifikácie
MF	mobilná fáza
MF1	mobilná fáza 1
MF2	mobilná fáza 2
PhosA 2,00	kyselina fosforečná s pH 2,00
RT	retenčný čas
SB <sub>A</sub>	silibín A
SB <sub>B</sub>	silibín B
SC <sub>A</sub>	silichristín A
SC <sub>B</sub>	silichristín B
SD	silidianín
SIA	sekvenčná injekčná analýza
SIC	sekvenčná injekčná chromatografia
ST	štandardný roztok s koncentráciou silymarínu 3,5 mg/mL
UV	ultrafialové svetlo
UV-vis	ultrafialové – viditeľné svetlo

### 3 Úvod

V tejto diplomovej práci som sa zamerlal na separáciu látok obsiahnutých v silymaríne, ktorého významným zdrojom je rastlina známa pod latinským názvom *Silybum marianum* (L). Pre svoje hepatoprotektívne, protinádorové a imunostimulačné účinky sa s ním často stretávame v doplnkoch stravy a bylinných čajoch. Hlavné účinné zložky silymarínu tvorí zmes flavonolignanov: silibín A, silibín B, izosilibinín A, izosilibinín B, silichristín A, silichristín B a silidianín. Vzhľadom k tomu, že prvých šesť menovaných látok sa vyskytuje vo forme trans-diaстереoizomerov je zrejmé, že na ich analýzu bolo potrebné vyvinúť metódu s vysokou selektivitou.

V priebehu analýzy bola využívaná metóda klasickej sekvenčnej injekčnej chromatografie (1D-SIC) s dlhou kolónou a dvojdimenzionálna sekvenčná injekčná chromatografia (2D-SIC).

Sekvenčná injekčná chromatografia (SIC) vznikla ako vhodná alternatíva k vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografii (HPLC) na Katedre analytickej chémie, Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, zapojením krátkej monolitckej chromatografickej kolóny do systému sekvenčnej injekčnej analýzy (SIA). SIC vykazuje porovnateľnú separačnú účinnosť ako HPLC a prináša aj radu výhod ako napríklad rýchlosť separácie, presnosť, citlivosť, robustnosť a minimálna spotreba vzoriek a činidiel. Ide o pomerne mladú analytickú metódu, ktorá je od svojho vzniku naďalej inovovaná. Jednou z inovácií je zapojenie druhej kolóny do systému, čo dalo vznik novej 2D-SIC metóde. Zapojenie druhej kolóny do systému prispieva k zvýšeniu selektivity danej metódy, keďže je možné kombinovať kolóny s rôznou účinnosťou.

Nedostatkom SIC je chýbajúci softvér na spracovávanie získaných dát, čo výrazne komplikuje vyhodnocovanie výsledkov jednotlivých analýz. Tento problém bol v priebehu našej práce riešený vytvorením komplexnej šablóny v programe Microsoft Excel na vyhodnocovanie základných charakteristík píkovo.

## 4 Cieľ a popis zadania práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo porovnať možnosti separácie 2D-SIC s klasickou 1D-SIC s dlhou kolónou. Vzorka, ktorá bola pri oboch metódach použitá predstavovala zmes flavonolignánov, známu pod názvom silymarín. Najskôr bolo treba vyvinúť a optimalizovať vhodnú metódu na separáciu jednotlivých zložiek vzorky pre oba systémy a následne porovnať získané výsledky. Pri vývoji bolo treba otestovať viacero kolón, určiť správne zloženie mobilnej fázy a vytvoriť vhodný program pre analýzu testovaných látok. Ďalším, nie menej podstatným, cieľom tejto práce bolo vytvoriť šablónu v programe Microsoft Excel na zjednodušenie vyhodnocovania základných charakteristík jednotlivých píkrov a odstránenie šumu zo záznamu.

## 5 Teoretická časť

### 5.1 Silymarín

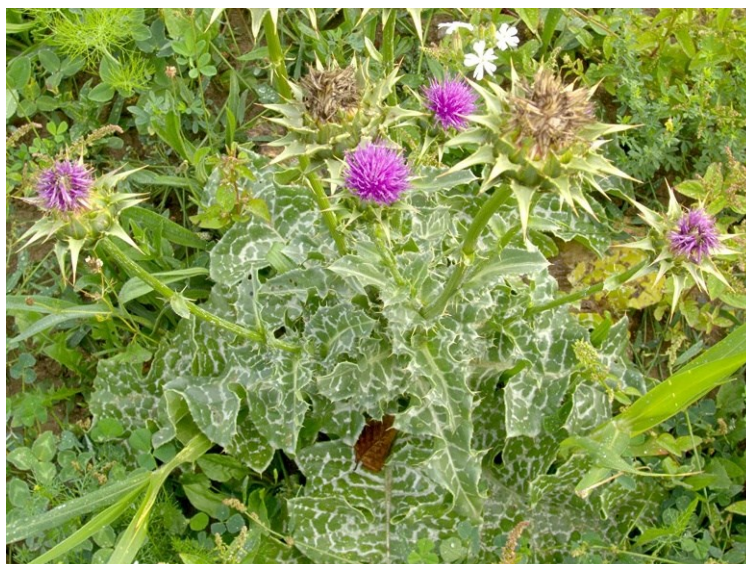
#### 5.1.1 Pestrec mariánsky

Pestrec mariánsky, dobre známy aj pod latinským názvom *Silybum marianum* (L), je jednoročná alebo dvojročná bylina patriaca do čeľade astrovité (*Asteraceae*). Pôvod tejto rastliny je lokalizovaný do oblasti Stredomoria, Severnej Afriky a Ázie. Pestuje sa v Európe, Argentíne, Číne. Z obrázku 1 je zrejmé, že pestrec mariánsky môžeme nájsť aj na území Českej a Slovenskej republiky, kde sa vyskytuje na okrajoch ciest, rumoviskách a pastvinách. Pre svoj rast vyžaduje teplé prostredie a suchú pôdu [1; 2; 3; 4].



Obrázok 1 Výskyt Pestreca mariánskeho v Európe (vyznačené čiernou farbou) [4]

Pestrec mariánsky je liečivá bylina, ktorá vďaka svojmu vzhľadu nachádza uplatnenie aj ako okrasná rastlina. Priemerne dorastá do výšky 150 centimetrov. Má nápadné, tmavozelené, ostnaté listy, na ktorých sú charakteristické biele škvrny. Rastlina kvitne v období od júla do augusta. Červenofialové kvety sú usporiadané v jednotlivých úboroch širokých 4 – 8 centimetrov. Plody tvoria 6 – 7 milimetrov dlhé, červenohnedé nažky s bielo lesknúcim sa páperím na vrchole, vďaka ktorému sa môžu vznášať a šíriť vzduchom. Účinnou látkou je zmes flavonolignanov označovaných ako silymarín[5].



Obrázok 2 Pestrec mariánsky (*Silybum marianum*) [6]

Český liekopis oficiálne uvádza dve drogy a to *Silybi mariani extractum siccum raffinatum et normatum* (Pestrecový extrakt suchý čistený a štandardizovaný) a *Silybi mariani fructus* (Plod Pestreca mariánskeho) [2; 7].

*Silybi mariani extractum siccum raffinatum et normatum* je suchý čistený a štandardizovaný extrakt vyrobený z drogy *Silybi mariani fructus*. Je to žltohnedý amorfný prášok. Obsahuje 90% až 110% menovitého obsahu silymarínu vyjadreného ako silibinin (C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>;Mr 482,2) [7].

*Silybi mariani fructus* je páperia zbavený zrelý plod druhu *Silybum marianum* (L) Gaertn. Obsahuje najmenej 1,5% silymarínu, vyjadreného ako silibinin (C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>;Mr 482,2), počítaného na vysušenú drogu [7].

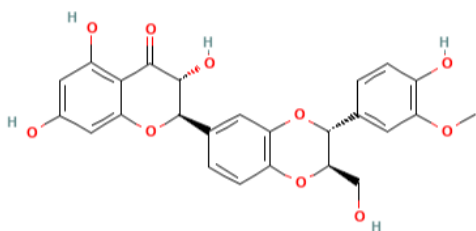


Obrázok 3 *Silybi mariani fructus* [8]

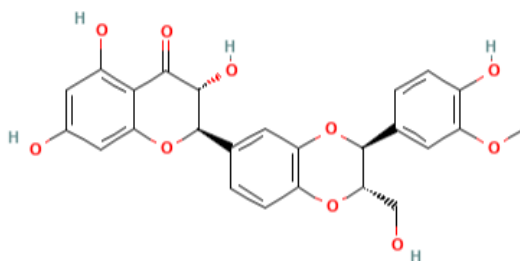
### 5.1.2 Charakteristika

Významným zdrojom silymarínu je, už v predchádzajúcej podkapitole spomínaný, pestrec mariánsky. Zloženie a obsah silymarínu nie je vo všetkých odrodách jednotný. Svedčí o tom aj práca výskumníkov z Olomouca, ktorým sa podarilo vyšľachtiť tri nové odrody s rôznym zložením aktívnych látok. Hlavné aktívne zložky silymarínu tvorí zmes flavonolignánov: silibín A ( $SB_A$ ), silibín B ( $SB_B$ ), izosilibinín A ( $ISB_A$ ), izosilibinín B ( $ISB_B$ ), silichristín A ( $SC_A$ ), silichristín B ( $SC_B$ ) a silidianín (SD). Prvých šesť látok sa vyskytuje vo forme ekvimolárnej zmesi, ako trans-dia stereoizoméry. Štruktúry jednotlivých flavonolignánov sú na obrázkoch 4 - 10. V zmesi prevláda  $SB_A$  a  $SB_B$  (50 – 60%), nasledujú  $SC_A$  a  $SC_B$  (~20%), SD (~10%) a  $ISB_A$  a  $ISB_B$  (~5%) [9; 10; 11; 12].

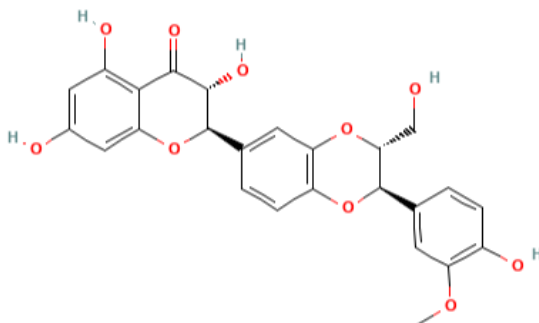
Najväčšiu biologickú aktivitu zo zmesi flavonolignánov obsiahnutých v silymaríne vykazuje práve najviac zastúpený silibín. Na základe štúdií, ktoré sa vzťahujú hlavne na, už spomínaný, silibín sa silymarín vstrebáva z tráviaceho traktu a vylučuje sa žľou. Biologická dostupnosť silibínu z tráviaceho traktu závisí na rôznych faktoroch, ako napríklad koncentrácia v prípravku alebo množstvo použitých látok solubilizačného charakteru [4; 13].



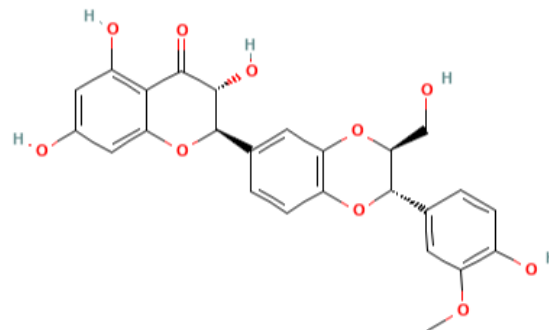
Obrázok 4 Štruktúra silibínu A [14]



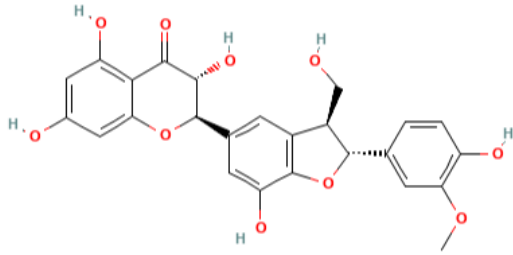
Obrázok 6 Štruktúra silibínu B [16]



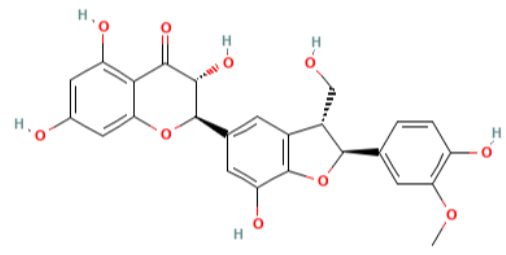
Obrázok 5 Štruktúra izosilibínu A [15]



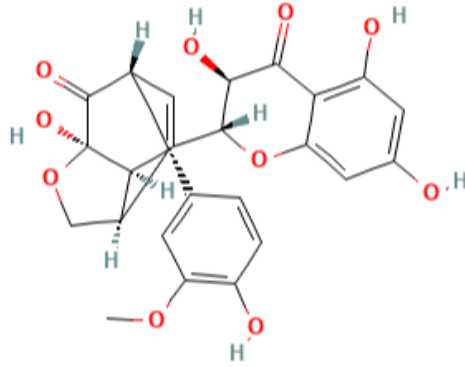
Obrázok 7 Štruktúra izosilibínu B [17]



Obrázok 8 Štruktúra silichristínu A [18]



Obrázok 9 Štruktúra silichristínu B [19]



Obrázok 10 Štruktúra silidianínu [20]

### 5.1.3 Rešerš

Tabuľka 1 Rešerš

Stanovované látky	Vzorky	Použitý prístroj	Kolóna	Prietoková rýchlosť (ml/s)	Mobilná fáza	Detektor	Zdroj
Silymarín	Doplňky stravy a čajové zmesi s obsahom silymarínu	UHPLC	Kinetex 2.6 – F5 100A (150 x 4,6 mm)	0,35	A – metanol B – kys. fosforečná s pH 2,00	DAD	[21]
Silymarín	Extrakt silymarínu	UHPLC	Acquity UHPLC C18 (50 x 21 mm; 1,7 µm)	0,25	A – superčistá voda s 0,1 % kys. mravčou B – metanol s 0,1 % kys. mravčou	Hmotnostný spektrometer	[22]
Silymarín	Extrakt silymarínu	UHPLC	HSS T3 C18 (100 x 21 mm; 1,8 µm)	0,5	A – superčistá voda s 0,1 % kys. mravčou B – metanol s 0,1 % kys. mravčou	Hmotnostný spektrometer	[23]



Tabuľka 2 Rešerš

Stanovované látky	Vzorky	Použitý prístroj	Kolóna	Prietoková rýchlosť (ml/s)	Mobilná fáza	Detektor	Zdroj
Silymarín	Extrakt z plodov	HPLC	Purospher C18 (250x4mm, 5 µm)	0,017	A-Superčistá voda okyslená 10% kyselinou fosforečnou s pH 2,6 B-ACN v pomere 62:38	Fotodiódový detektor	[24]
Silymarín	Extrakt z plodov	HPLC	Lichrosphere C8 (250x4mm, 5 µm)	0,017	Gradient; A-Superčistá voda okyslená 10% kyselinou fosforečnou s pH 2,6 B-ACN C-metanol	Fotodiódový detektor	[24]

Z rešerši literatúry, vid' tabuľka 1 a 2, sa ukázalo, že pre analýzu tohto typu rastlinného materiálu sú používané hlavne HPLC a UHPLC metódy v spojení s UV alebo hmotnostnou spektrometriou. Metóda SIC pre analýzu takto zložitých vzoriek zatiaľ nebola použitá.

## 5.2 Sekvenčná injekčná chromatografia

Sekvenčná injekčná chromatografia (SIC) je moderná analytická metóda známa od roku 2003. Patrí medzi strednotlakové separačné analytické techniky a vznikla zapojením krátkej monolitckej kolóny do systému sekvenčnej injekčnej analýzy (SIA) [25; 26].

SIC nadväzuje na SIA a bola skonštruovaná ako vhodná alternatíva k vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii (High-performance liquid chromatography, HPLC). SIC vykazuje porovnateľnú separačnú účinnosť ako HPLC a prináša aj radu výhod ako napríklad rýchlosť separácie, nižšia spotreba vzoriek, mobilných fázy a činidiel, ekologickosť a finančná náročnosť. Benefitom tejto metódy je aj možnosť automatizácie, miniaturizácie. Na druhej strane má SIC v porovnaní s HPLC aj radu nevýhod. Limitom je hlavne sila a rezervoár použitej pumpy, ktorý môže dosahovať objem 4 mL až 10 mL, čo limituje dĺžku analýzy a dĺžku použitej kolóny [25; 27; 28].

Na rozdiel od konvenčných chromatografických techník je SIC založená na programovateľnom toku MF, čo umožňuje výber vstrekovaného objemu vzorku a jednoduchú tvorbu elučného gradientu. Na začiatku analýzy sa systém naplní mobilnou fázou, do ktorého je následne nasávaná zóna vzorku. Viaccestný ventil sa následne prepne z výstupu vzorku na výstup kolóny a vzorka sa cez kolónu, kde dochádza k jej separácii, dostáva až k detektoru [29].

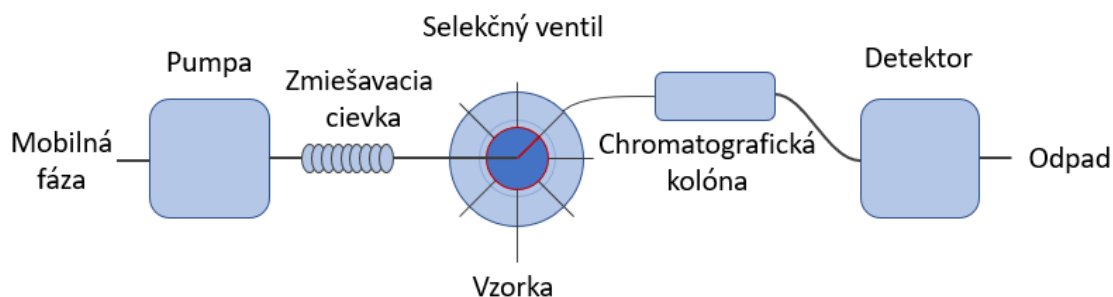
### 5.2.1 Dvojdimenziálna sekvenčná injekčná chromatografia (2D - SIC)

Na separáciu veľkého počtu látok v zložitých vzorkách je potrebný separačný systém s vysokou kapacitou separácie, ktorú je náročné dosiahnuť pri použití jednej chromatografickej kolóny a to aj v prípade, že sa použije kolóna s vysokou účinnosťou. Výrazného zvýšenia kapacity separácie je možné doceliť za pomoci dvojdimenziálnych separačných techník, medzi ktoré sa radí aj 2D-SIC. Významný prínos 2D-SIC spočíva aj v možnosti separácie zložiek vzorky do skupín podľa charakteristických spoločných štruktúrnych znakov, čo môže uľahčiť vyhodnocovanie výsledkov analýzy a identifikáciu látok obsiahnutých vo vzorku. Výhodou 2D-SIC je nepochybne aj to, že pre prvú a druhú dimenziu môžu byť použité kolóny s rôznou selektivitou [30; 31].

Pri 2D-SIC je eluát z kolóny umiestnenej v prvej dimenzii zbieraný do frakcii, ktoré sú následne dávkované na kolónu použitú v druhej dimenzii. Pri vývoji 2D-SIC metódy je potrebné zladit' rozmery oboch kolón. Prietok mobilnej fázy, objem vzorku a mobilnej fázy v prvej a druhej dimenzii musí byť vzájomne kompatibilný. Obe kolóny bývajú najčastejšie spojené cez dvojpohový šesťcestný ventil [30; 31].

### 5.2.2 Prístrojové usporiadanie

Systém pre SIC je tvorený z obojsmernej piestovej pumpy, ktorej objem sa najčastejšie pohybuje v rozmedzí 4-10 mL a je schopná vytvoriť tlak nad 6,2 MPa. Pumpa má zvyčajne dva porty. Jeden port je cez zmiešavaciu cievku napojený na selekčný ventil. Druhý port je napojený na tlakový ventil, ktorý slúži k regulácii pretlaku, ktorý môže vzniknúť pri upchaní kolóny alebo systému, alebo je napojený na zásobník mobilnej fázy a slúži k rýchlemu naplneniu pumpy. Zmiešavacia cievka je tvorená stočenou hadičkou. Dĺžka hadičky závisí od požadovanej aplikácie, ale najčastejšie sa vyskytuje v dĺžke 100 – 500 cm s vnútorným priemerom 0,051 – 0,076 cm, čo zodpovedá celkovému vnútornému objemu 0,5 – 1,5 mL. Ďalšou dôležitou súčasťou systému pre SIC je viaccestný selekčný ventil, ktorý umožňuje programovateľné a diskontinuálne nasávanie vzoriek a činidiel do systému. Najčastejšie sa využíva ventil s 8, 10 alebo 12 výstupmi. Neodmysliteľnou súčasťou zariadenia je aj separačná kolóna, pred ktorou môže byť umiestnená aj predkolóna. Najčastejšie sa využívajú C18, C8 a Si kolóny s rôznou dĺžkou. Medzi hlavné súčasti zariadenia sa radí aj detektor. Najčastejšie sa používa spektrofotometrický detektor, ktorý umožňuje merať absorbanciu pri rôznych vlnových dĺžkach a tým zvyšuje selektivitu metódy. Celé zariadenie je napojené na počítač vybavený príslušným softvérom, ktorý umožňuje celý systém ovládať [25; 28]. Schéma systému pre SIC je znázornená na obrázku 11.

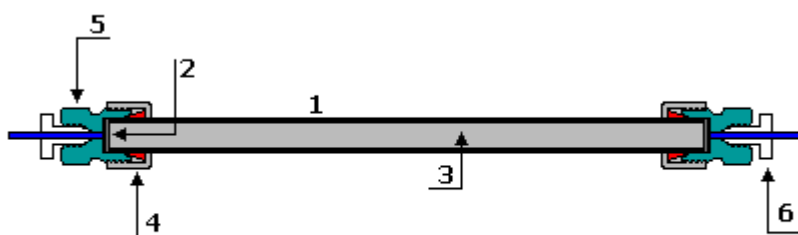


Obrázok 11 Schematické usporiadanie SIC systému

### 5.2.3 Chromatografické kolóny

Chromatografická kolóna je v podstate trubka alebo kapilára rovnomerne naplnená alebo pokrytá stacionárnou fázou. Dochádza v nej ku kontaktu mobilnej a stacionárnej fázy, čo umožňuje dosiahnutie samotnej separácie. V súčasnosti sú pre analytické účely používané konvenčné analytické kolóny s vnútorným priemerom 2,1 až 5 mm, dĺžkou 10 až 300 mm a plnené náplňami o veľkosti častíc 1 až 10  $\mu\text{m}$ . Kolóny s veľkosťou častíc 10  $\mu\text{m}$  sa používajú už len výnimočne a to hlavne pri aplikácii starších liekopisných metód [31; 32; 33].

Na obrázku 12 je znázornená klasická HPLC kolóna. Plášť (1) chromatografickej kolóny je uzavretý poréznu fritou (2). Úlohou frity je zabrániť uvoľňovaniu stacionárnej fázy (3) z kolóny a súčasne zabezpečuje plynulý tok mobilnej fázy. Oba konce kolóny sú ukončené prevlečným ochranným krúžkom (4) a koncovou hlavicou (5), v ktorej je navítaný vstup pre kapiláru so skrutkou (6) [31].



Obrázok 12 Chromatografická kolóna [33]

Na obrázku je znázornená klasická chromatografická kolóna: 1- plášť kolóny, 2- fritu, 3- stacionárna fáza, 4- ochranný krúžok, 5- koncová hlavica, 6- vstup pre kapiláru so skrutkou

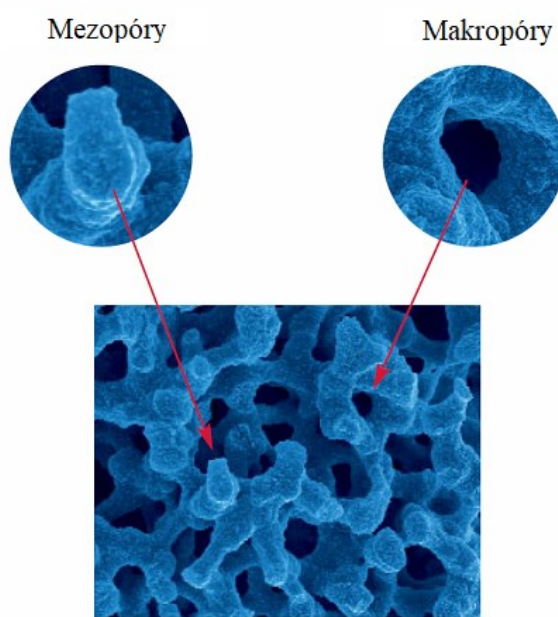
#### 5.2.3.1 Monolitické kolóny

Na rozdiel od klasických konvenčných stacionárnych fáz, ktoré sa skladajú z jednotlivých častíc sorbentu o definovanej veľkosti, sú monolitické kolóny tvorené jedným kusom pórovitého materiálu, ktorý úplne zaplňuje vnútro chromatografickej kolóny. Stacionárna fáza v monolitických kolónach môže byť tvorená makroporéznym organickým polymérom pripravovaným odliatím alebo tyčinkou silikagelu, ktorá sa vyrába pomocou „sol-gel“ technológie [34; 35; 36].

Pórovitý materiál, ktorý tvorí jadro monolitickej kolóny, obsahuje dva typy pórov, makropóry a mezopóry. Makropóry, s priemernou veľkosťou 2  $\mu\text{m}$ , zaisťujú ustálený tok mobilnej fázy cez monolit a významne zrýchľujú prenos hmoty medzi mobilnou

a stacionárnou fázou. Mezopóry, s priemernou veľkosťou 13 nm, poskytujú monolitu dostatočne veľký povrch a tým vysokú separačnú kapacitu. Takto skonštruovaná kolóna umožňuje vysoký prietok mobilnej fázy, bez výrazného zvýšenia tlaku a zároveň bez straty separačnej účinnosti. Táto schopnosť dovoľujúca použiť bežné prietokové rýchlosti mobilných fáz pri nižšom tlaku bola rozhodujúca pre zavedenie týchto kolón do systému s jednoduchou piestovou pumpou [25; 34; 35; 36]. Štruktúra monolitu je znázornená na obrázku 13.

Účinnosť monolitických kolón je porovnateľná s účinnosťou klasickej kolóny s veľkosťou častíc 5  $\mu\text{m}$ , ale výhodou sa javí to, že u monolitických kolón s rastúcou rýchlosťou mobilnej fázy klesá účinnosť pomalšie ako u klasických kolón. Toto poznanie nám umožňuje zrýchlenie analýzy alebo zapojenie viacerých kolón za sebou pri relatívne vysokej prietokovej rýchlosti [35; 36].

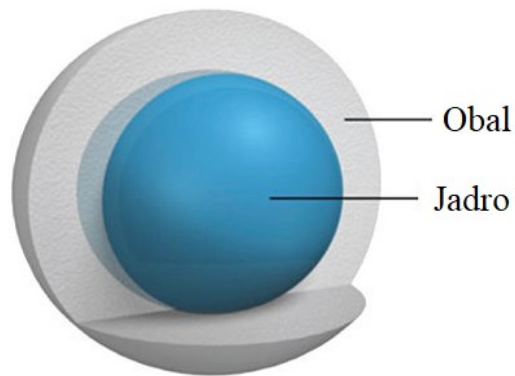


Obrázok 13 Štruktúra monolitu (upravené) [36]

### 5.2.3.2 Core-shell kolóny

Core-shell, respektíve fused-core, kolóny sú tvorené časticami, ktoré pozostávajú z dvoch častí, jadra a obalu. Na výrobu jadra a obalu sa používajú rozličné materiály, respektíve sa dá použiť aj rovnaký materiál s rozdielnou štruktúrou. Jadro, ktoré býva pevné, neporézne a inertné tvorí základ celej častice. Najčastejšie je z oxidu kremičitého o priemere 0,9 -3,7  $\mu\text{m}$ . Menej často sa na výrobu jadra používajú anorganické (hliník, zlato, uhlík) alebo organické (polyméry alebo zmesi polymérov) materiály. Jadro môže

tvoriť samostatná častica alebo zhluk niekoľkých častíc. Druhou časťou core-shell častice je obal tvorený niekoľkými vrstvami rôzne modifikovaného silikagelu s kontrolovanou porozitou. Podľa spôsobu výroby môže byť štruktúra obalu buď kontinuálna, môže mať pripevnené malé častice na povrchu alebo častice môžu byť zakomponované priamo do povrchu jadra. Celkový priemer core-shell častíc dosahuje veľkosť 1,3 – 5  $\mu\text{m}$  [37; 38; 39]. Na obrázku 14 je znázornená core-shell častica.



Obrázok 14 Core-shell častica (upravené) [40]

## 5.3 Validácia analytickej metódy

Validácia analytickej metódy je proces, pri ktorom sa určujú najdôležitejšie charakteristiky metódy, takzvané validačné parametre. Zmyslom validácie je preukázať, že vyvinutá metóda je pre dané použitie vhodná. Cieľom validácie je určiť podmienky, za ktorých je skúšobný postup použiteľný, a zaručiť rovnakú spoľahlivosť pri opakovanom použití daného postupu v jednom alebo aj v rôznych laboratóriách [41; 42].

### 5.3.1 Vybrané validačné parametre

#### 5.3.1.1 Počet teoretických etáží (N)

Účinnosť je parameter, ktorý sa používa pre hodnotenie účinnosti separačného procesu. Účinnosť kolóny charakterizuje mieru rozširovania elučných zón delených na kolóne a je ukazovateľom kvality chromatografickej separácie. Počet teoretických etáží je bezrozmerná veličina, ktorá určuje mieru účinnosti kolóny. Vypočíta sa podľa nasledujúceho vzorca, kde hodnoty  $t_R$  a  $w_h$  sa musia vyjadriť v rovnakých jednotkách :

$$N = konst \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

kde:

$konst$  je v prípade izokraticekej elúcie rovná 5,54

$t_R$  je retenčný čas píku odpovedajúci danej zložke

$w_h$  je šírka píku v polovici jeho výšky

Počet teoretických etáží závisí na stanovovanej zložke, použitej kolóne, teplote kolóny, mobilnej fáze a retenčnom čase [7; 31].

#### 5.3.1.2 Faktor symetrie píku ( $A_s$ )

Faktor symetrie píku sa vypočíta podľa nasledujúceho vzorca:

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

kde:

$w_{0,05}$  vyjadruje šírku píku v jednej dvadstatine jeho výšky

$d$  je vzdialenosť medzi kolmicou spustenou z vrcholu píku a vzostupnou časťou píku v jednej dvadstatine jeho výšky

V prípade, že hodnota  $A_s$  sa rovná 1,0 hovoríme o ideálnej symetrii píku. Ak je hodnota  $A_s > 1,0$  nastáva jav nazývaný chvostovanie píku. Ak je hodnota  $A_s < 1,0$  dochádza k čelnej asymetrii píku, respektíve k frontovaniu píku [7; 31].

### 5.3.1.3 Rozlíšenie ( $R_s$ )

Rozlíšenie medzi píkmi dvoch zložiek sa môže vypočítať podľa vzorca:

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

kde:

$t_{R1}$ ,  $t_{R2}$  sú retenčné časy pík, pričom  $t_{R2} > t_{R1}$

$w_{h1}$ ,  $w_{h2}$  vyjadrujú šírky pík v polovičnej výške [7]

### 5.3.1.4 Opakovateľnosť

Opakovateľnosť metódy je definovaná ako tesnosť zhody medzi výsledkami nezávislých meraní rovnakej vzorky, realizovaných tým istým pracovníkom, na tom istom prístroji, v tom istom laboratóriu v krátkom časovom rozmedzí [41; 42].

Opakovateľnosť odozvy sa vyjadruje ako odhad relatívnej smerodajnej odchýlky (RSD(%)) v percentách pre radu následných meraní najmenej troch nástrekov alebo pre meranie pracovného roztoku. Vypočíta sa podľa nasledujúceho vzorca:

$$RSD(\%) = \frac{100 \sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}}{\bar{y} \sqrt{n - 1}}$$

kde:

$y_i$  predstavuje jednotlivé hodnoty vyjadrené ako plocha píku, výška píku alebo pomer plôch u metódy vnútorného štandardu

$\bar{y}$  predstavuje priemer jednotlivých hodnôt

$n$  znázorňuje počet jednotlivých hodnôt [7]

### 5.3.1.5 Linearita

Pod pojmom linearita chápeme schopnosť metódy poskytnúť v danom rozsahu akceptovateľnú lineárnu koreláciu medzi odozvou detektoru a koncentráciou látky vo vzorke. Obvykle sa stanovuje minimálne päť rôznych koncentrácií v rozsahu 50 –150 % deklarovaneho obsahu. V súčasnej dobe sa k hodnoteniu linearity takmer výhradne používa korelačný koeficient (R). V ideálnom prípade nadobúda hodnotu rovnú jednej [33; 41; 42].



### 5.3.1.6 Limit detekcie a limit stanoviteľnosti

Detekčný limit (LOD) sa definuje ako najnižšie množstvo látky vo vzorke, ktoré je možné spoľahlivo detegovať, ale nie je nutné ho kvantifikovať danou analytickou metódou. V praxi sa v separačných metódach určuje hranica detekcie ako trojnásobok šumu základnej línie [40; 41; 44; 45].

Hranica stanoviteľnosti, respektíve limit kvantifikácie (LOQ), predstavuje hodnotu, ktorá vyjadruje najnižšiu koncentráciu látky vo vzorke, pri ktorej je presnosť stanovenia taká, že umožňuje kvantitatívne vyhodnotenie.

Vzťah medzi oboma veličinami sa dá vyjadriť nasledovne:

$$LOQ = 3 * LOD$$

Čím bude väčší rozdiel medzi výškou píku a výškou šumu základnej línie, tým budú hodnoty LOQ a LOD nižšie [41; 42; 46; 47].

## **6 Experimentálna časť**

### **6.1 Použité prístroje a pomôcky**

**Ultrazvuková vaňa (Bandelin Sonorex RK100)**

**Digitálny pH meter (HANNA instruments)**

**Minitrepačka (IKA® lab dancer)**

**Centrifuga (MiniSpin Plus)**

**Chromatografický systém pre SIC**

**Použité chromatografické kolóny:**

Ascentis® Express F5; 10 cm x 4,6 mm, 5 µm

Ascentis® Express F5; 30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm

Ascentis® Express RP-amide; 30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm

Ascentis® Express Phenyl-Hexyl; 3 cm x 4,6 mm, 2,7 µm

Chromolith® SpeedRod CN; 50 mm x 4,6 mm

Chromolith® Flash RP 18C; 25 mm x 3 mm

Chromolith® FastGradient RP-18C; 50 mm x 2 mm

Chromolith® HighResolution RP-18C; 50 mm x 4,6 mm

Kinetex® 5 µm EVO C18; 50 x 4,6 mm

Kinetex® 5 µm EVO C18; 30 x 3,0 mm

Predkolóna opti-guard® C18; 1mm

Časticová kolóna DSC-SCX SPE (Supelco); 50 µm

Časticová kolóna Oasis HLB (Waters); 50 µm

Časticová kolóna Discovery Cyano (Supelco); 5 µm

Časticová kolóna Discovery RP – 18 C (Supelco); 5µm

**Manuálne automatické pipety**

**Plastové injekčné striekačky o objeme 10 mL**

**PTFE filtre o priemere 13 mm s veľkosťou pórov 0,22  $\mu\text{m}$  a 0,45  $\mu\text{m}$ , pre použitie s injekčnou striekačkou Luer**

**Použité chemikálie :**

Silymarín  $\geq 30$  % Silibín (Sigma-Aldrich) – zmes flavonolignánov

Superčistá voda (Systém Milli-Q)

Acetonitril LC-MS grade (Merck)

Metanol LC-MS grade (Merck)

Kyselina fosforečná 85 % p.a. (Penta)

## **6.2 Príprava roztokov**

### **6.2.1 Roztok kyseliny fosforečnej**

Na prípravu roztoku kyseliny fosforečnej bola použitá superčistá voda a 85% kyselina fosforečná.

Do sklenenej fľaše s celkovým objemom 500 mL bolo pridaných približne 450 mL superčistej vody a za neustáleho miešania na magnetickej miešačke bola prikvapkávaná 85 % kyselina fosforečná až do chvíle kým sa hodnota pH daného roztoku neustálila na čísle 2,00. Na meranie pH pripravovaného roztoku bol používaný pH meter (HANNA instruments). Roztok bol uskladňovaný pri laboratórnej teplote.

### **6.2.2 Roztoky mobilnej fázy**

Na prípravu mobilnej fázy bol používaný, v predchádzajúcej podkapitole spomínaný, roztok kyseliny fosforečnej s pH 2,00 a acetonitril.

V priebehu meraní bolo vyskúšaných viacero mobilných fáz pripravených zmiešaním už spomínaných roztokov v rôznom pomere. Mobilná fáza bola pripravovaná v objeme 200 mL v prípade že boli v chromatografickom systéme pre SIC zapojené krátke kolóny a v objeme 400 mL pri použití dlhých kolón a vývoji 2D-SIC metódy. Pomer jednotlivých zložiek mobilnej fázy a ich množstvo použité na prípravu 200 mL je uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3 Príprava mobilnej fázy

Z tabuľky je možné zistiť množstvo jednotlivých roztokov potrebných na prípravu 200 mL mobilnej fázy v danom pomere.

Pomer ACN : PhosA 2,00	Objem použitého roztoku (mL)	
	ACN	PhosA 2,00 pH
0:100	0	200
5:95	10	190
10:90	20	180
20:80	40	160
25:75	50	150
27:73	54	146
30:70	60	140
35:65	70	130
40:60	80	120
45:55	90	110
50:50	100	100

### 6.2.3 Kalibračné roztoky

Pre určenie linearity vyvíjanej metódy bolo treba pripraviť roztoky na zhotovenie kalibračnej krivky. Kalibračná rada pozostávala zo siedmych roztokov s koncentráciou silymarínu 5 (5,25)(KR1), 10 (10,5)(KR2), 26(KR3), 50 (52,5)(KR4), 90 (93,3)(KR5), 120 (116,7)(KR6) a 150 (150,5)(KR7)  $\mu\text{g/mL}$ . Na prípravu jednotlivých roztokov bol použitý štandardný roztok s koncentráciou silymarínu 3,5  $\text{mg/mL}$  a ten bol následne riedený destilovanou vodou.

Postup prípravy jednotlivých kalibračných roztokov bol nasledovný: pri príprave roztoku s koncentráciou 150  $\mu\text{g/mL}$  bolo do ependorfovej skúmavky, s celkovým objemom 1 mL, napipetovaných 21,5  $\mu\text{L}$  ST a 478,5  $\mu\text{L}$  destilovanej vody. Na prípravu kalibračného roztoku s koncentráciou 120  $\mu\text{g/mL}$  bolo použitých 10  $\mu\text{L}$  ST a doplnené superčistou vodou do objemu 300  $\mu\text{L}$ . Roztok o koncentrácii 90  $\mu\text{g/mL}$  vznikol zmiešaním 8  $\mu\text{L}$  ST a 292  $\mu\text{L}$  superčistej vody. Pri príprave roztoku s koncentráciou silymarínu 50  $\mu\text{g/mL}$  bolo do ependorfovej skúmavky napipetovaných 15  $\mu\text{L}$  ST a doplnené superčistou vodou do objemu 1 mL. Na prípravu kalibračného roztoku s koncentráciou 25  $\mu\text{g/mL}$  bolo použitých 150  $\mu\text{L}$  KR4 a 150  $\mu\text{L}$  superčistej vody. Pri príprave KR2 bolo zmiešaných 200  $\mu\text{L}$  KR4 a 800  $\mu\text{L}$  superčistej vody. Posledný roztok z kalibračnej rady s koncentráciou 5  $\mu\text{g/mL}$  bol pripravený z 250  $\mu\text{L}$  KR2 a doplnený superčistou vodou do objemu 500  $\mu\text{L}$ . Všetky takto pripravené roztoky boli následne ešte premiešané na minitrepačke (IKA<sup>®</sup> lab danecer).

## 6.3 Použité vzorky

### 6.3.1 Štandardný roztok silymarínu

Pri vývoji metódy bol použitý, už predom pripravený, štandardný roztok silymarínu svetložltej farby o koncentrácii 3,5 mg/mL. Roztok bol uchovávaný v chladničke v sklenenej vialke. V priebehu vývoja a validácie metódy sa pracovalo s roztokmi s koncentráciou silymarínu v rozmedzí 5-600 µg/mL. Roztoky s požadovanou koncentráciou boli pripravené nariadením už spomínaného štandardného roztoku. Na riedenie bola použitá superčistá voda.

### 6.3.2 Vzorka z čaju

Na prípravu výluhu bol použitý bylinný čaj s názvom Ostropestřec, vyrobený spoločnosťou Dr.Max, vid' obrázok číslo 15. Ide o doplnok stravy, s obsahom plodu pestreca mariánskeho.

Postup prípravy vzorky bol nasledujúci: do kadičky s objemom 250 mL bolo za pomoci odmerného valca naliatych 100 mL metanolu a doplnené superčistou vodou do objemu 200 mL. Takto pripravený 50 % roztok metanolu bol privedený k varu na elektrickom variči. Následne bolo do kadičky vložené čajové vrečko o hmotnosti 1,5 g a lúhovalo sa po dobu 10 minút. Po uplynutí času stanoveného výrobcom bolo čajové vrečko vytiahnuté. Po ochladení bol výluh filtrovaný. Na filtráciu bola použitá injekčná striekačka o objeme 10 mL a dva PTFE filtre s veľkosťou pórov 0,45 µm a 0,22 µm. Najskôr bol použitý filter s veľkosťou pórov 0,45 µm a následne ten s pórmami o veľkosti 0,22 µm. Takto pripravený roztok bol následne 10x zriedený a použitý ako vzorka. Vzorka z čaju bola vždy v deň merania čerstvo pripravená.



Obrázok 15 Bylinný čaj Ostropestřec [48]

### 6.3.3 Vzorka z tabliet

Pri príprave vzorky boli použité tablety Lipovitan S, vid' obrázok 16. Tento prírodný doplnok stravy s obsahom silymarínu prispieva k správnej funkcii pečene. Lipovitan S je vyrábaný spoločnosťou Herbacos Recordati. V balení sa zvyčajne nachádza 90 tabliet, pričom výrobca v zložení prípravku uvádza, že jedna tableta obsahuje 140 mg silymarínu.

Postup prípravy bol nasledujúci: do sklenenej kadičky o objeme 250 mL bolo za pomoci odmerného valca pridaných 100 mL superčistej vody a 100 mL metanolu. Do pripraveného roztoku boli vložené tri tablety prípravku Lipovitan S. Tablety sa nechali 10 minút rozpúšťať pri laboratórnej teplote. Po uplynutí 10 minút bola kadička na ďalších 10 minút umiestnená do ultrazvukovej vane (Bandelin, Sonorex Digitec), aby bolo docielené úplné rozpadnutie tabliet. Následne bol roztok prefiltrovaný za pomoci injekčnej striekačky, na ktorej koniec sa nasadil PTFE filter s veľkosťou pórov 0,45  $\mu\text{m}$ . Filtrácia bola zopakovaná aj s PTFE filtrom s veľkosťou pórov 0,22  $\mu\text{m}$  aby sa odstránilo čo najviac nečistôt, ktoré by mohli upchať chromatografickú kolónu. Z dva-krát prefiltrovaného roztoku bol za pomoci pipety odobraný objem 2 mL a umiestnený do endendorfovej skúmavky. Skúmavka bola následne umiestnená na 60 sekúnd do centrifúgy (MiniSpin Plus). Po usadení zvyšných nečistôt bol roztok znova prepipetovaný do novej endendorfovej skúmavky. Takto pripravený roztok bol následne 10-krát zriedený superčistou vodou a použitý ako vzorka. Vzorka z tabliet bola vždy v deň merania čerstvo pripravená.



Obrázok 16 Tablety Lipovitan S [49]

#### 6.3.4 Vzorky na určenie výťažnosti

Pri zisťovaní výťažnosti jednotlivých vyvinutých metód boli použité vzorky pripravené zo ST, výluhu z čaju a roztoku z tabliet.

Prvá vzorka, ktorá sa použila na stanovenie výťažnosti slúžila ako štandard o známej koncentrácii silymarínu. V prvom kroku prípravy tejto vzorky bolo do endendorfovej skúmavky napipetovaných 5,8  $\mu\text{L}$  ST a doplnené superčistou vodou do objemu 200  $\mu\text{L}$ . Z takto pripraveného a na minitrepačke premiešaného roztoku sa odobralo 50  $\mu\text{L}$  a doplnilo sa superčistou vodou do objemu 100  $\mu\text{L}$ . Vzniknutý roztok s koncentráciou silymarínu 50(50,75)  $\mu\text{g/mL}$  bol následne využitý ako štandard pri stanovovaní výťažnosti.

Druhú vzorku predstavovala vzorka z čaju, ktorá bola pripravená spôsobom uvedeným v podkapitole 6.3.2.

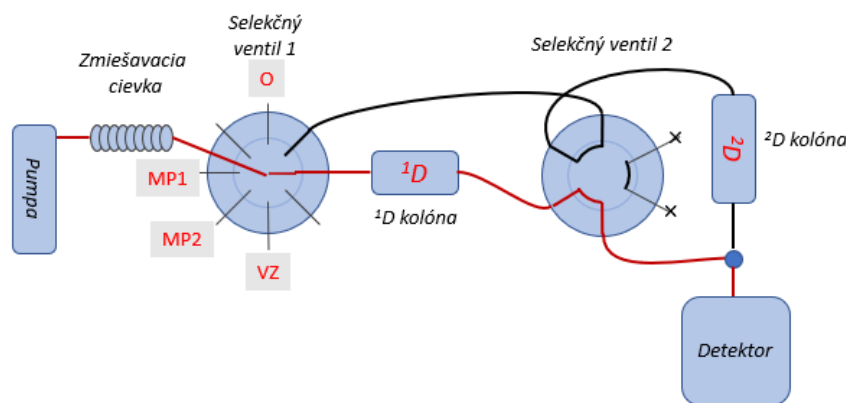
Tretia vzorka, ktorá bola použitá pri určovaní výťažnosti bola zmes tvorená výluhom z čaju a štandardným roztokom. Prvú zložku tejto zmesi tvoril roztok, ktorý vznikol v prvom kroku prípravy štandardu o známej koncentrácii silymarínu, čiže roztok s koncentráciou 100(101,5)  $\mu\text{g/mL}$ . Druhá zložka predstavovala výluh z čaju, ktorý bol pripravený podľa postupu uvedeného v podkapitole 6.3.2 a zriedený 5-krát. Obe zložky boli zmiešané v pomere 1:1 a následne sa pretrepali na minitrepačke (IKA<sup>®</sup> lab dancer). Takto pripravená vzorka slúžila pri určovaní výťažnosti ako zmes štandardu a vzorky z čaju.

Štvrtý typ vzorky, ktorý bol použitý pri určovaní výťažnosti bol pripravený z tabliet Lipovitan S. Postup prípravy vzorky z tabliet je opísaný v podkapitole 6.3.3.

Posledný typ vzorky vznikol taktiež zmiešaním dvoch roztokov. Prvým z nich bol už spomínaný roztok štandardu o koncentrácii 100(101,5)  $\mu\text{g/mL}$ . Druhý roztok, ktorý bol použitý na prípravu zmesi bol pripravený z roztoku z tabliet, postup vid' v podkapitole 6.3.3, zriedený 5-krát. Takto zhotovené roztoky boli následne zmiešané v pomere 1:1, premiešané na minitrepačke (IKA<sup>®</sup> lab dancer) a boli použité ako vzorka zmesi štandardu a vzorky z tabliet.

## 6.4 Popis prístroja pre 1D-SIC

Pri vývoji metódy bol použitý chromatografický systém pre SIC, ktorý bol tvorený prístrojom SICrom II<sup>TM</sup> (FIALab instruments, USA). Prístroj pozostával zo strednotlakovej injekčnej pumpy neMESYS 1000N s celkovým objemom 5,0 mL, tlakovým limitom 10,3 MPa (Getoni GmbH, Nemecko) a zmiešavacej cievky tvorenej PEEK hadičkami s vnútorným priemerom 0,75 mm. Cez zmiešavaciu cievku bola pumpa napojená na centrálny viaccestný ventil s ôsmymi výstupmi, ventil 1, umožňujúci meniť nastriekavané kvapaliny. Tieto kvapaliny boli do systému privádzané cez PEEK hadičky o priemere 0,5 mm a 0,25 mm. Výstup číslo 1 na ventile 1 bol priamo prepojený na nádobu s odpadom. Výstup 2 a 3 slúžil na prívod MF 1 a MF 2 a vzorka bola do systému privádzaná cez výstup číslo 5. Výstup číslo 7 prepájal centrálny ventil s viaccestným ventilom číslo 2, ktorý bol prepnutý do pozície load. Medzi ventilom 1 a ventilom 2 bola umiestnená chromatografická kolóna.. Oba VICI ventily boli tvorené hlaviciami C5H-2348D (Valco Instrument Co., Houston, TX, USA). Ďalšou súčasťou systému bola prietoková detekčná Z-cela s dĺžkou 10 mm a vnútorným objemom 6  $\mu\text{L}$  (FIALab Instruments, USA). Na zapojenie Z-cely na chromatografickú kolónu bola použitá PEEK hadička o priemere 0,25 mm aby došlo k zníženiu mŕtveho objemu. Systém bol vybavený spektrofotometrickým FLAME-T-UV-VIS detektorom (Ocean Optic Inc., USA) a zdrojom UV-vis žiarenia DH2000 (Ocean Optic Inc., USA). Prepojenie detektoru so zdrojom žiarenia bolo sprostredkované cez optické káble (priemer 0,6 mm) zakončené SMA konektorom na prenos signálu (Ocean Optic Inc., USA). Celý systém pre SIC bol riadený softvérom SIAsoft (FIALab Instruments, USA). Na obrázku 17 je znázornená schéma chromatografického systému pre 1D-SIC.



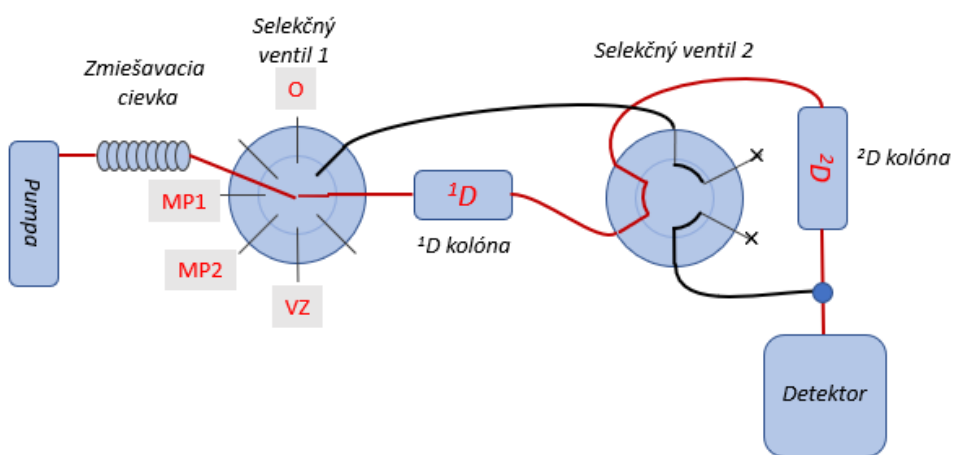
Obrázok 17 Schematické usporiadanie 1D-SIC systému

Na obrázku je možné vidieť schematické usporiadanie systému, ktoré bolo použité pri 1D-SIC metóde. Červenou farbou je znázornený tok. MP1 – mobilná fáza 1, MP2 – mobilná fáza 2, VZ – vzorka, O – odpad



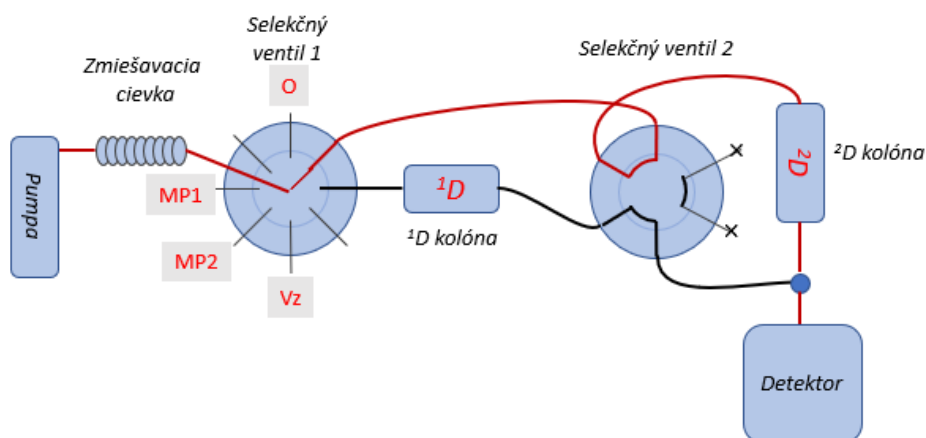
## 6.5 Popis prístroja pre 2D-SIC

Pri vývoji 2D-SIC metódy bol použitý rovnaký systém ako pre 1D-SIC metódu. Rozdiel spočíval len v tom, že bola do systému pridaná druhá kolóna, ktorá bola umiestnená medzi ventil 2 a detektor. Pri nástreku reagentov z 1D kolóny na 2D kolónu bol ventil 2 prepnutý do pozície inject a samotný tok je naznačený na obrázku 18 červenou farbou. V priebehu samotnej separácie na 2D kolóne sa ventil 2 prepol do pozície load a MP bola na danú kolónu privádzaná vývodom číslo 8 na viaccestnom ventile 1. Tok pri separácii je naznačený červenou farbou na obrázku 19.



Obrázok 18 Usporiadanie 2D-SIC, nástrek na kolónu

Na obrázku je znázornená schéma 2D-SIC systému. Červenou farbou je znázornený tok reagentov pri nástreku zmesi z 1D kolóny na 2D kolónu. MP1 – mobilná fáza 1, MP2 – mobilná fáza 2, VZ – vzorka, O – odpad



Obrázok 19 Usporiadanie 2D-SIC, separácia

Na obrázku je možné vidieť usporiadanie 2D-SIC systému. Červená čiara znázorňuje tok v priebehu separácie. MP1 – mobilná fáza 1, MP2 – mobilná fáza 2, VZ – vzorka, O – odpad

## 6.6 Vyhodnocovanie dát

Vzhľadom k tomu, že v priebehu práce nebol k dispozícii žiadny softvér na vyhodnocovanie nameraných dát, boli všetky získané dáta vyhodnocované za pomoci programu Microsoft Excel. V danom programe boli vytvorené šablóny, ktoré boli následne použité na vyhodnocovanie výsledkov analýzy. Na tvorbu šablón boli využité základné matematické funkcie v programe Microsoft Excel.

### 6.6.1 Základná úprava dát

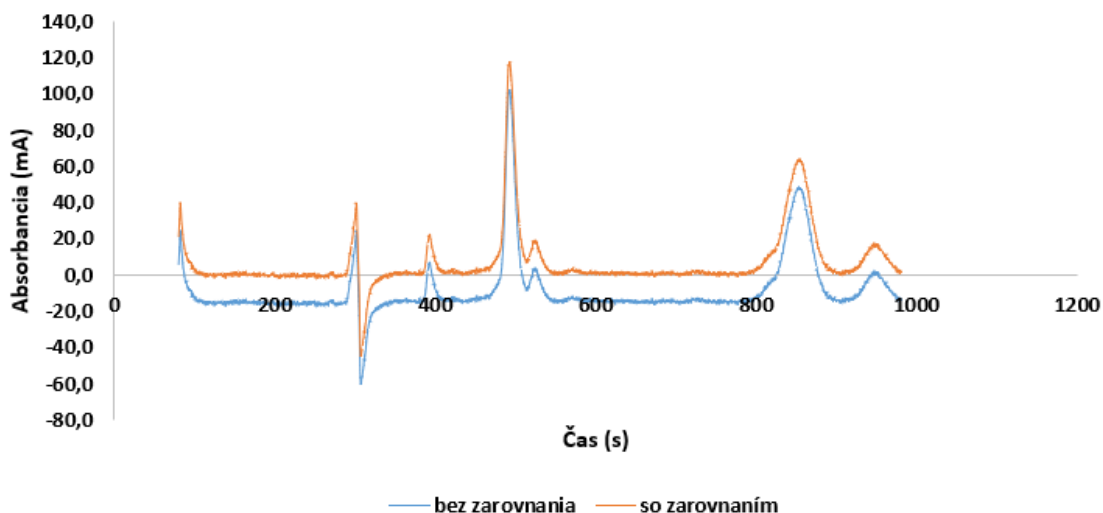
Pre zjednodušenie práce s nameranými hodnotami boli dáta v prvom kroku spracovávaná upravené. Upravovaný bol zaznamenaný čas, absorbancie a následne bola základná línia vyrovnaná na nulu.

Počas analýzy detektor zaznamenával až desať bodov za sekundu a zaznamenaný čas pre každý bod obsahoval až sedem čísiel za desatinou čiarkou. Pre zjednodušenie práce bola hodnota zaznamenaného času zaokrúhlená na jedno desatinne miesto. Na túto úpravu bola v programe Microsoft Excel využitá funkcia zaokrúhliť, ktorej zápis je nasledovný : ZAOKROUHLIT(číslo;číslice). Za parameter číslo bol dosadený zaznamenaný čas a do pozície číslice bolo napísané číslo 1, čo znamená zaokrúhliť na jedno desatinne miesto. Týmto krokom sme dospeli k tomu, že boli získané dáta, u ktorých bol každý jeden bod zaznamenaný v priebehu 0,1 sekundy.

V priebehu tvorby šablóny boli upravené aj hodnoty absorbancie. Keďže sa v priebehu analýzy pri oboch metódach pracovalo so vzorkami o nízkej koncentrácii, tak hodnoty zaznamenaných absorbancie boli nízke. Pre jednoduchšie spracovávanie bola hodnota absorbancie upravená na hodnotu mA (miliabsorbancia). Úprava spočívala v tom, že zaznamenaná hodnota sa vynásobila číslom 1000 a formát bunky, do ktorej sa vypočítala hodnota mA, bol upravený tak, aby ukazoval výsledok s presnosťou 0,1 mA.

Posledným krokom základnej úpravy bolo vyrovnanie základnej línie. Najskôr bol zostrojený graf z už upravených hodnôt času a absorbancie. Následne bol vybraný jeden bod na základnej línii a hodnota mA tohto bodu bola odpočítaná od ostatných už upravených hodnôt absorbancie.

Na obrázku 20 je znázornený chromatografický záznam, u ktorého boli využité vyššie popísané základné úpravy hodnôt.



Obrázok 20 Chromatografický záznam, základná úprava

Na obrázku sú znázornené dva chromatografické záznamy. Modrou farbou je vyznačený záznam, u ktorého bola použitá základná úprava dát bez zarovnaní základnej línie a u záznamu vyznačeného oranžovou farbou bola implementovaná základná úprava dát aj so zarovnaním základnej línie.

### 6.6.2 Korekcia šumu Savitzky-Golay

V priebehu práce bola vytvorená aj šablóna na korekciu šumu. Na úpravu jednej hodnoty absorbancie bolo použitých 17 bodov v okolí (8 pred a 8 po) [50]. Na výpočet bola použitá funkcia s názvom Součin skalární. Celkový tvar rovnice pre výpočet korekcie šumu v jednom bode bol nasledovný  $SOUČIN.SKALÁRNÍ(Pole1;Pole2)/H$ . Do tejto všeobecnej rovnice bolo za Pole1 dosadených 17, po sebe nasledujúcich, hodnôt absorbancie zo získaného záznamu, pričom deviata hodnota bola hodnota korigovaného bodu. Za Pole2 boli dosadené hodnoty, určené pre výpočet korekcie šumu zo 17 bodov, z tabuľky 4. Za H bola taktiež dosadená hodnota z tabuľky 4. Tento vzorec bol implementovaný na všetky hodnoty absorbancie daného záznamu. Následne došlo k základnej úprave a výsledkom bol chromatografický záznam s upraveným šumom a so zarovnanou základnou líniou.

Tabuľka 4 Hodnoty pre výpočet korekcie šumu [50; 51]

počet bodov	15	17	19	21	23	25
1	-78	-21	-136	-171	-42	-253
2	-13	-6	-51	-76	-21	-138
3	42	7	24	9	-2	-33
4	87	18	89	84	15	62
5	122	27	144	149	30	147
6	147	34	189	204	43	222
7	162	39	224	249	54	287
8	167	42	249	284	63	343
9	162	43	264	309	70	387
10	147	42	269	324	75	422
11	122	39	264	329	78	447
12	87	34	249	324	79	462
13	42	27	224	309	78	467
14	-13	18	189	284	75	462
15	-78	7	144	249	70	447
16		-6	89	204	63	422
17		-21	24	149	54	387
18			-51	84	43	343
19			-136	9	30	287
20				-76	15	222
21				-171	-2	147
22					-21	62
23					-42	-33
24						-138
25						-253
<b>hodnota H</b>	1105	323	2261	3059	805	5175

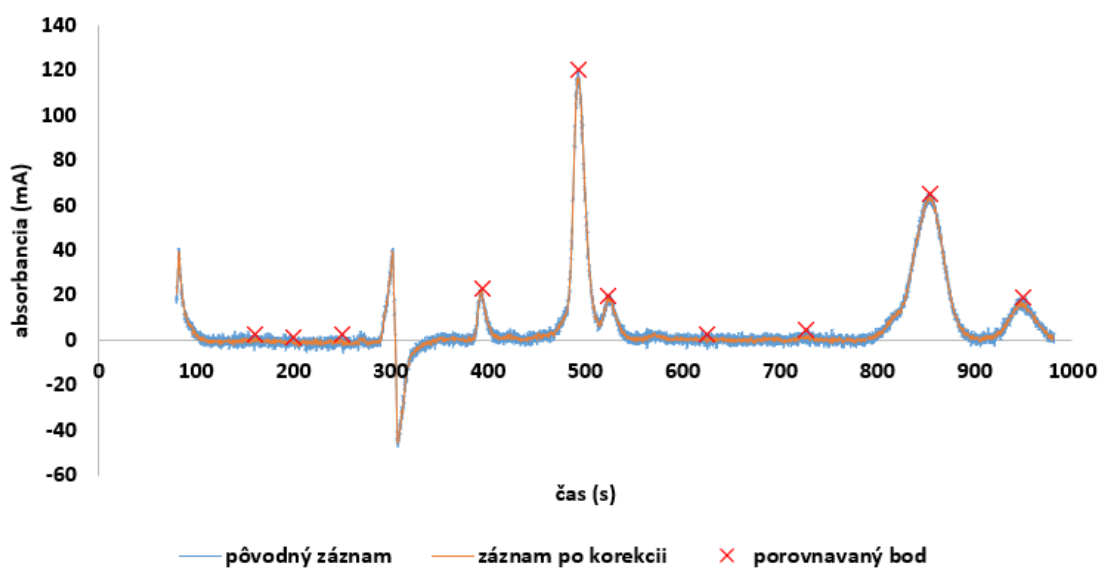
Po dokončení šablóny bolo zisťované, či je daná šablóna pre vyhodnocovanie dát prínosná. Test bol realizovaný nasledovne. Na chromatografickom zázname bolo zvolených desať úsekov. Rozsah každého úseku bol dve sekundy, čo po základnej úprave dát predstavovalo dvadsať hodnôt absorbancie. Päť z daných úsekov bolo vo vrcholoch jednotlivých píkav a ďalších päť bolo náhodne zvolených na základnej línii. Následne boli porovnávané maximálne hodnoty absorbancie v daných úsekoch u dát, ktoré boli upravené pomocou šablóny na korekciu šumu a u dát bez úpravy. Bol sledovaný rozdiel absorbancie a časový posun daných bodov. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 5 a na obrázku 21 je zobrazený chromatografický záznam, na ktorom test prebiehal.

Tabuľka 5 Test šablóny na korekciu šumu

V tabuľke sú výsledné hodnoty sledovaných parametrov, ktoré boli získané počas testovania šablóny na korekciu šumu.

	Rozdiel (mA)	Rozdiel mA (%)	Časový posun (s)
Úsek 1	2,0	71,4	-0,9
Úsek 2	2,0	142,9	1,0
Úsek 3	2,4	88,9	0,1
Úsek 4	2,2	78,6	-0,5
Úsek 5	2,5	55,6	1,3
Úsek 6	1,1	4,8	0,2
Úsek 7	3,1	2,6	0,0
Úsek 8	1,4	7,0	-0,3
Úsek 9	1,4	2,2	0,1
Úsek 10	2,6	13,7	-0,3

Zo získaných výsledkov testovania šablóny, vid' tabuľka 5, je zrejmé, že za pomoci vytvorenej šablóny je možné znížiť hladinu šumu v záznamoch pri minimálnom časovom posune. Na základe týchto zistení bola daná šablóna používaná v priebehu vyhodnocovania všetkých chromatografických záznamov.



Obrázok 21 Chromatogram, test šablóny

Na obrázku sú prekryté dva chromatogramy. Modrou farbou je vyznačený pôvodný záznam a oranžovou záznam po korekcii šumu. Krížiky vyznačujú maxima sledovaných úsekov.

### 6.6.3 Charakteristika pík

Na výpočet základných parametrov charakterizujúcich pík bola vytvorená komplexná šablóna. Do šablóny bol, z dát získaných v priebehu analýzy, dosadený čas a hodnoty absorbancie. Následne došlo k základnej úprave dát a bol vyhotovený chromatografický záznam. Do vybraných buniek danej šablóny bola dopísaná dĺžka kolóny použitej v priebehu analýzy a čas začiatku a konca každého píku. Po dosadení týchto hodnôt boli vo vytvorenej šablóne, pre každý pík, vypočítané nasledujúce parametre: retenčný čas, výška píku, šírka píku, plocha pod píkom, symetria, rozlíšenie, počet teoretických etáži a hodnota HETP.

Okrem komplexnej šablóny, na výpočet základných charakteristických parametrov píku, boli v priebehu práce vytvorené aj šablóny, ktoré boli použité pri určovaní výťažnosti, opakovateľnosti a linearity.

## 7 Výsledky a diskusia

### 7.1 1D-SIC metóda

#### 7.1.1 Vývoj metódy

##### 7.1.1.1 Výber mobilnej a stacionárnej fázy

Mobilná fáza bola pripravená zmiešaním ACN a roztok kyseliny fosforečnej, ktorého pH bolo upravené na hodnotu 2,0, v rôznom pomere.

Pri zisťovaní optimálnej sily mobilnej fázy a výbere chromatografickej kolóny bola MP pripravená v rôznych pomeroch a testovaná na viacerých kolónach. Prehľad použitých kolón je zhrnutý v tabuľke 6. Okrem izokratickej elúcie bola testovaná aj gradientová elúcia. K vzniku gradientu dochádzalo v zmiešavacej cievke po nasatí MP s rôznou silou, kombinácie týchto síl MP, ktoré boli použité na tvorbu gradientu sú zhrnuté v tabuľke 7.

Tabuľka 6 Testované kolóny

Kinetex® 5 µm EVO C18; 50 x 4,6 mm
Chromolith® SpeedRod CN; 50 mm x 4,6 mm
Ascentis® Express F5; 10 cm x 4,6 mm, 5 µm
Ascentis® Express F5; 30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
Ascentis® Express RP-amide; 30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
Ascentis® Express Phenyl-Hexyl; 3 cm x 4,6 mm, 2,7 µm
Chromolith® HighResolution RP-18C; 50 mm x 4,6 mm

Tabuľka 7 MP použitá na testovanie gradientu

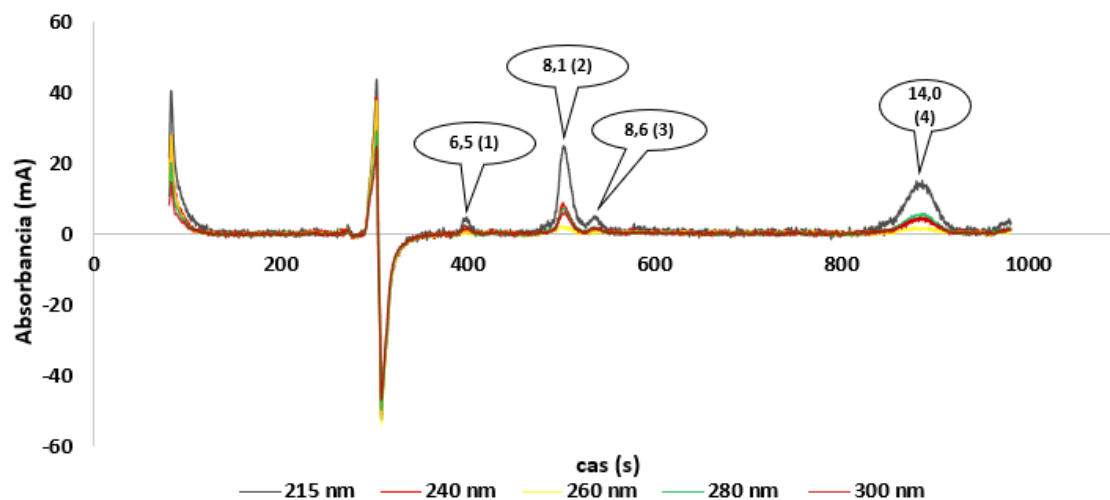
ACN : PhosA 2,0	
MP 1	MP 2
30:70	5:95
30:70	10:90
30:70	20:80
35:65	0:100
35:65	10:90
40:60	10:90
40:60	20:80
40:60	30:70

Pri vyhodnocovaní záznamov získaných pri testovaní chromatografických kolón a sily mobilnej fázy sa kládol dôraz na retenciu pík, aby boli píky súmerne eluované v priebehu celej analýzy, na symetriu pík, aby dochádzalo čo najmenej k takzvanému frontovaniu a chvostovaniu píku, a prihliadalo sa aj na rozlíšenie.

Po vyhodnotení jednotlivých chromatografických záznamov bol pre 1D-SIC metódu zvolený izokratický spôsob elúcie, chromatografická kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm) a MP pripravená v pomere 27:73 (ACN:PhosA).

### 7.1.1.2 Nastavenie detektoru

Na zaznamenávanie údajov bol pri vývoji metódy použitý spektrofotometrický detektor. Frekvencia zaznamenávania bola nastavená na 8 Hz s integračným časom 50 msec. Odozva detektoru sa na chromatograme premietla v podobe absorbancie, ktorej intenzita bola závislá na koncentrácii vzorky. Keďže silymarín je zmes flavonolignanov, ktorých absorpčné spektra dosahujú maxima v rozmedzí 200-400 nm, bol detektor nastavený zaznamenávať absorbanciu vo vlnových dĺžkach 215, 240, 260, 280, 300 nm, vid' obrázok číslo 22. Na základe zistených informácií boli všetky nasledujúce záznamy vyhodnocované pri vlnovej dĺžke 215 nm a to z dôvodu, že v tejto oblasti dosahuje hodnota absorbancie jednotlivých látok najvyššiu intenzitu. Záznamy pri ostatných vlnových dĺžkach boli použité ako pomocné pri identifikácii jednotlivých píkov.



Obrázok 22 Porovnanie vlnových dĺžok

Na obrázku je možné vidieť prekrytie chromatogramov získaných po nástreku KR2 vyhodnocovaných pri vlnových dĺžkach 215, 240, 260, 280 a 300 nm. Pri analýze bola použitá kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm), MF tvoril ACN a PhosA 2,0 v pomere 23:73, objem nástreku vzorky bol 10 µL a analýza trvala 16,3 minút. V bublinách je RT v minútach a poradové číslo píku.



### 7.1.1.3 Optimalizácia programu pre 1D-SIC

Keďže práca na SIC systéme je ovládaná cez počítačový softvér, bolo potrebné vytvoriť taký program, v ktorom budú uvedené jednotlivé kroky celého merania.

Program analýzy bol vytvorený pomocou softvéru SIAsoft v1.1.7 určeného pre Windows. V priebehu vývoja 1D-SIC metódy boli v programe nastavované parametre ako: rýchlosť nasávania MF a vzorky, objem nasávanej MF a vzorku, rýchlosť prietoku, vlnové dĺžky UV-vis detektoru a pauza medzi jednotlivými krokmi analýzy. Optimálne nastavenie programu pre 1D-SIC metódu je zhrnuté v tabuľke 8.

Tabuľka 8 Nastavenie programu pre 1D-SIC

V tabuľke je zorazené nastavenie programu, ktorý bol použitý pri analýze na dlhej kolóne.

Úloha	Jednotka	Parametre úlohy
Nasávanie mobilnej fázy	Ventil 1 Pumpa	Výstup č.2 - zásobník MF Rýchlosť 70 $\mu\text{L/s}$ ; objem 4500 $\mu\text{L}$ Počkaj 4 sekundy
Nasávanie vzorku	Ventil 1 Pumpa	Výstup č.5 - zásobník vzorku Rýchlosť 10 $\mu\text{L/s}$ ; objem 10 $\mu\text{L}$ Počkaj 2 sekundy
Nástrek MF + Vz na kolónu	Ventil 1 Pumpa	Výstup č.7 - kolóna Rýchlosť 5 $\mu\text{L/s}$ ; objem 4510 $\mu\text{L}$
Meranie Absorbancie	Detektor	Vlnové dĺžky 215, 240, 260, 280, 300 nm

### 7.1.1.4 Vyvinutá metóda

V rámci práce bola vyvinutá metóda pre 1D-SIC, ktorej základná charakteristika je zhrnutá v tabuľke 9.

Tabuľka 9 Základná charakteristika metódy pre 1D-SIC

<b>Mobilná fáza</b>	ACN a PhosA 2,0 v pomere 23:27; celkový objem 4500 $\mu\text{L}$
<b>Kolóna</b>	Ascentis® Express F5; 10 cm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$
<b>Objem vzorky</b>	10 $\mu\text{L}$
<b>Rýchlosť prietoku</b>	5 $\mu\text{L/s}$
<b>Nastavenie detektoru</b>	Detektor zaznamenával vlnové dĺžky 215, 240, 260, 280, 300 nm; 8Hz; integračný čas 50 msec
<b>Dĺžka analýzy</b>	16,3 minút

## 7.1.2 Validácia vyvinutej metódy

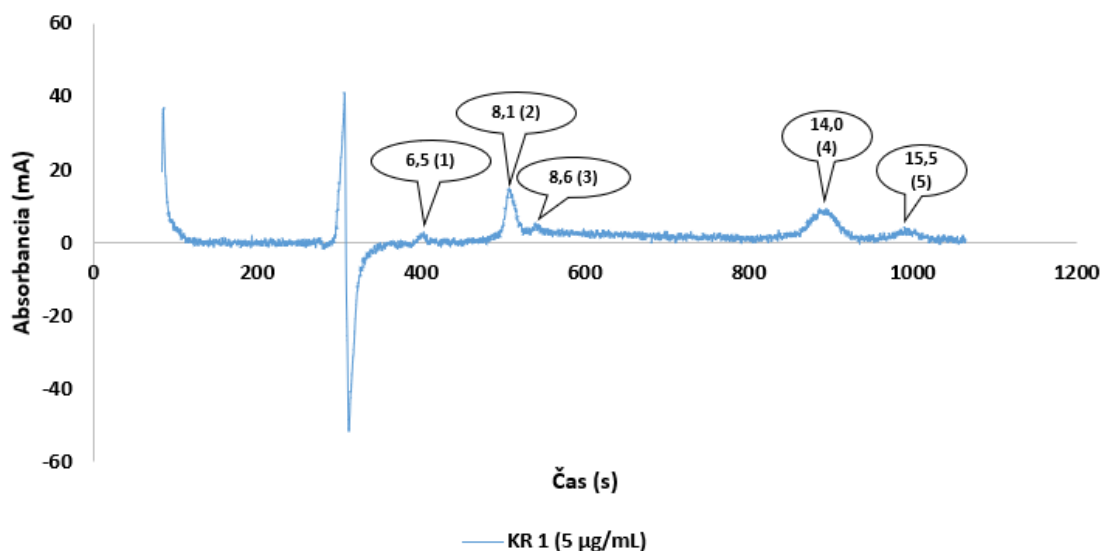
### 7.1.2.1 Stanovenie linearít odozvy

Linearita odozvy vyvinutej metódy bola pre jednotlivé píky stanovená metódou lineárnej regresie. Bolo pripravených sedem roztokov v koncentračnom rozmedzí od 5  $\mu\text{g/ml}$  do 150  $\mu\text{g/ml}$ , KR1-7. Pre každú koncentračnú hladinu bolo meranie zopakované trikrát a z týchto troch meraní bola pre výpočet použitá priemerná hodnota zaznamenaná

absorbancie jednotlivých píkov. Na vyhodnotenie a výpočet bola použitá šablóna pripravená v programe Microsoft Excel. Hodnoty získané v priebehu meraní a parametre kalibračných kriviek pre jednotlivé píky sú zhrnuté v nasledujúcich tabuľkách.

K validácii je dôležitý parameter korelačného koeficientu, ktorého hodnota by podľa liekopisu mala byť minimálne 0,99.

Na zostrojenie kalibračnej krivky je dobré použiť minimálne päť kalibračných roztokov. Táto podmienka bola v priebehu stanovovania linearít splnená aj napriek tomu, že na chromatograme, ktorý vznikol pri nástreku KR 1 je odozva niektorých píkov nízka a preto boli namerané hodnoty na tejto koncentračnej hladine použité pri výpočte lineárnej odozvy iba pre pík s priemerným retenčným časom 8,1 a 14,0 minút. Chromatogram pre KR 1 je možné vidieť na obrázku 23.



Obrázok 23 Chromatogram 1D-SIC KR1

Na obrázku je chromatogram, ktorý vznikol pri nástreku KR 1. Pri analýze bola použitá kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm), MF tvoril ACN a PhosA 2,0 v pomere 23:73, objem nástreku vzorky bol 10 µL a analýza trvala 16,3 minút. Vyhodnotenie prebehlo pri vlnovej dĺžke 215 nm. V bublinách je RT v minútach a poradové číslo píku.

Látka s najslabšou retenciou dosiahla RT 6,5 minúty. Pri výpočte parametrov kalibračnej krivky bolo použitých šesť bodov a výsledná hodnota korelačného koeficientu daného píku vyhovuje požiadavkám liekopisu. Namerané hodnoty výšky píku pre jednotlivé nástreky v jednotlivých koncentračných hladinách sú zhrnuté v tabuľke 10. V tabuľke 11 sú štatistické parametre kalibračnej krivky daného píku.

Tabuľka 10 Namerané hodnoty pre pík s retenčným časom 6,5 minút

Koncentrácia (µg/mL)	Nástrek č.1 (mA)	Nástrek č.2 (mA)	Nástrek č.3 (mA)	Priemer (mA)	RSD
10,5	5,8	6,2	5,3	5,77	6,38%
26,0	12,4	11,4	11,1	11,63	4,78%
52,5	21,5	22,6	21,8	21,97	2,11%
93,3	35,6	36,4	36,6	36,20	1,19%
116,7	43,4	40,2	40,7	41,43	3,39%
150,5	62,4	61,4	60,3	61,37	1,40%

Tabuľka 11 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s retenčným časom 6,5 minút

Štatistické parametre pre regresiu : $y = a + bx$		
Počet bodov	n = 6	Odhad chyby
Smernica	b = 2,61569	± 0,148
Absolútny člen	a = -2,84199	± 5,222
Korelačný koeficient	r = 0,993637	
Reziduálna odchýlka	s = 6,861	

U druhého píku, s retenčným časom 8,1 minút, bolo na zostrojenie kalibračnej krivky použitých osem bodov. Z dát uvedených v nasledujúcich tabuľkách je zrejme, že korelačný koeficient látky, s RT 8,1 minút, v sledovanom koncentračnom rozmedzí dosiahol hodnotu 0,996215 s reziduálnou odchýlkou 5,359.

Tabuľka 12 Namerané hodnoty pre pík s retenčným časom 8,1

Koncentrácia (µg/mL)	Nástrek č.1 (mA)	Nástrek č.2 (mA)	Nástrek č.3 (mA)	Priemer (mA)	RSD
5,25	12,4	13,2	13,3	12,97	3,11%
10,5	22,8	22,6	23,1	22,83	0,90%
26,0	59,9	55,4	53,1	56,13	5,03%
52,5	109,4	112,6	115,0	112,33	2,04%
93,3	177,7	177,4	178,9	178,00	0,36%
116,7	212,0	201,7	207,4	207,03	2,03%
150,5	297,0	299,9	299,4	298,77	0,42%

Tabuľka 13 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s retenčným časom 8,1 minút

Štatistické parametre pre regresiu : $y = a + bx$		
Počet bodov	n = 7	Odhad chyby
Smernica	b = 0,528165	± 0,021
Absolútny člen	a = -2,04226	± 3,307
Korelačný koeficient	r = 0,996215	
Reziduálna odchýlka	s = 5,359	

Na zostrojenie kalibračnej krivky píku s RT 8,6 minút bolo použitých iba šesť bodov, keďže odozva tohto píku po nástreku KR1 bola nízka. U daného píku bolo v sledovanom koncentračnom rozmedzí dosiahnuté hodnôt 0,987497 korelačného koeficientu a 9,602 reziduálnej odchýlky. Korelačný koeficient po zaokrúhlení na stotiny stále spĺňa požiadavku liekopisu.

Tabuľka 14 Namerané hodnoty pre pík s retenčným časom 8,6

Koncentrácia (µg/mL)	Nástrek č.1 (mA)	Nástrek č.2 (mA)	Nástrek č.3 (mA)	Priemer (mA)	RSD
10,5	4,6	4,9	4,5	4,67	3,64%
26,0	9,1	8,8	9,9	9,27	5,01%
52,5	19,0	19,7	18,7	19,13	2,19%
93,3	27,0	27,0	26,4	26,80	1,06%
116,7	33,3	31,2	32,6	32,37	2,70%
150,5	48,0	49,3	50,2	49,17	1,84%

Tabuľka 15 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s retenčným časom 8,6 minút

Štatistické parametre pre regresiu : $y = a + bx$		
Počet bodov	n = 6	Odhad chyby
Smernica	b = 3,305451	± 0,264
Absolútny člen	a = -2,9818	± 7,350
Korelačný koeficient	r = 0,987497	
Reziduálna odchýlka	s = 9,602	

Korelačný koeficient píku s RT 14,0 minút dosiahol v danom koncentračnom rozmedzí hodnotu 0,996838, čo vyhovuje požiadavkám liekopisu.

Tabuľka 16 Namerané hodnoty pre pík s retenčným časom 14,0

Koncentrácia (µg/mL)	Nástrek č.1 (mA)	Nástrek č.2 (mA)	Nástrek č.3 (mA)	Priemer (mA)	RSD
5,25	7,6	7,5	7,6	7,57	0,62%
10,5	12,6	14,2	14,3	13,70	5,69%
26,0	36,1	32,5	30,9	33,17	6,56%
52,5	58,9	61,7	61,9	60,83	2,25%
93,3	98,5	98,5	96,7	97,90	0,87%
116,7	116,1	107,1	109,3	110,83	3,46%
150,5	155,3	154,1	154,9	154,77	0,32%

Tabuľka 17 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s retenčným časom 14,0 minút

Štatistické parametre pre regresiu : $y = a + bx$		
Počet bodov	n = 7	Odhad chyby
Smernica	b = 1,020758	± 0,036
Absolútny člen	a = -4,85069	± 3,102
Korelačný koeficient	r = 0,996838	
Reziduálna odchýlka	s = 4,899	

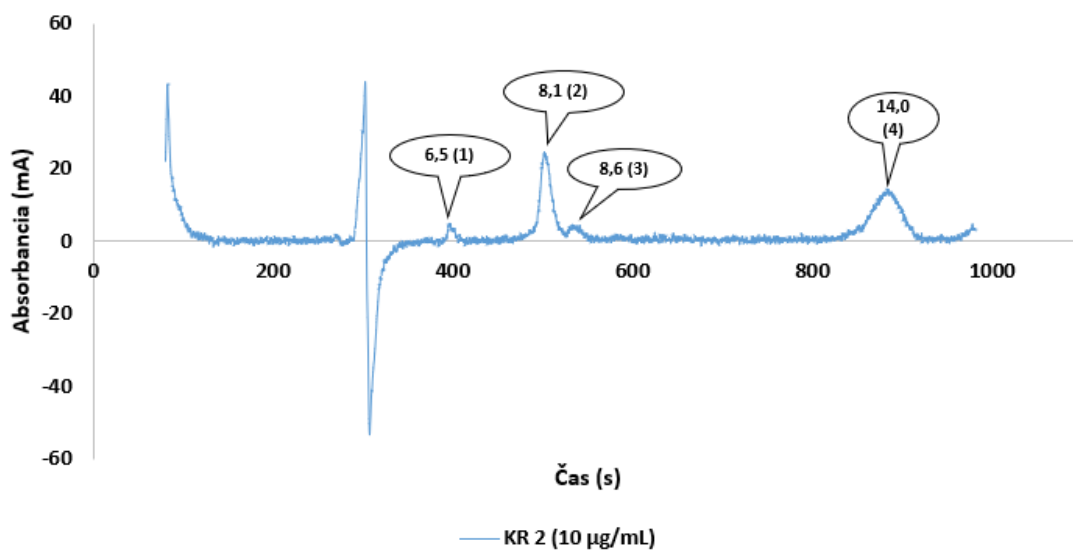
Pík, ktorý reprezentuje látku s najväčšou retenciou dosiahol retenčný čas 15,5 minút. Na zostrojenie kalibračnej krivky tohto píku bolo použitých len päť bodov a to z dôvodu, že pri nástreku KR1 bolo odozva daného píku príliš nízka a pri nástreku KR2 nebol pík úplne zaznamenaný, vid' obrázok 24.

Tabuľka 18 Namerané hodnoty pre pík s retenčným časom 15,5 minút

Koncentrácia (µg/mL)	Nástrek č.1 (mA)	Nástrek č.2 (mA)	Nástrek č.3 (mA)	Priemer (mA)	RSD
26,0	9,3	9,2	9,2	9,23	0,51%
52,5	15,5	15,5	15,8	15,60	0,91%
93,3	27,2	25,3	25,5	26,00	3,28%
116,7	30,3	28,1	29,3	29,23	3,08%
150,5	37,5	37,1	37,3	37,30	0,44%

Tabuľka 19 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s retenčným časom 15,5 minút

Štatistické parametre pre regresiu : $y = a + bx$		
Počet bodov	n = 5	Odhad chyby
Smernica	b = 4,450514	± 0,179
Absolútny člen	a = -16,6684	± 4,561
Korelačný koeficient	r = 0,997585	
Reziduálna odchýlka	s = 3,982	



Obrázok 24 Chromatogram 1D-SIC KR2

Na obrázku je chromatogram, ktorý vznikol pri nástreku KR 2. Pri analýze bola použitá kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm), MF tvoril ACN a PhosA 2,0 v pomere 23:73, objem nástreku vzorky bol 10 µL a analýza trvala 16,3 minút. Vyhodnotenie prebehlo pri vlnovej dĺžke 215 nm. V bublinách je RT v minútach a poradové číslo píku.

### 7.1.2.2 Limit detekcie a limit kvantifikácie

Na určenie LOD a LOQ jednotlivých píkovi boli využité dáta namerané v rámci hodnotenia linearity odozvy 1D-SIC metódy. Pri určovaní hodnoty LOD bola postupne porovnávaná výška jednotlivých píkovi s výškou šumu na chromatogramoch získaných pri analýze kalibračných roztokov (KR1-KR7). Ako hodnota LOD daného píku bola určená koncentrácia kalibračného roztoku, na ktorého chromatograme bola výška daného píku minimálne tri-krát vyššia ako výška šumu. Chromatogramy sa vyhodnocovali postupne od kalibračného roztoku s najnižšou koncentráciou (KR1) až po ten s najvyššou (KR7). Hodnota LOQ pre jednotlivé píky bola následne vypočítaná z hodnôt LOD. Na základe spôsobu určovania LOD a LOQ sú hodnoty týchto parametrov len orientačné. Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke.

*Tabuľka 20 LOD a LOQ 1D-SIC  
V tabuľke sú uvedené hodnoty LOD a LOQ pre jednotlivé píky.*

<b>Retenčný čas (min)</b>	6,5 (1)	8,1 (2)	8,6 (3)	14,0 (4)	15,5 (5)
<b>LOD (µg/mL)</b>	10	5	10	5	-
<b>LOQ (µg/mL)</b>	30	15	30	15	-

### 7.1.2.3 Opakovateľnosť

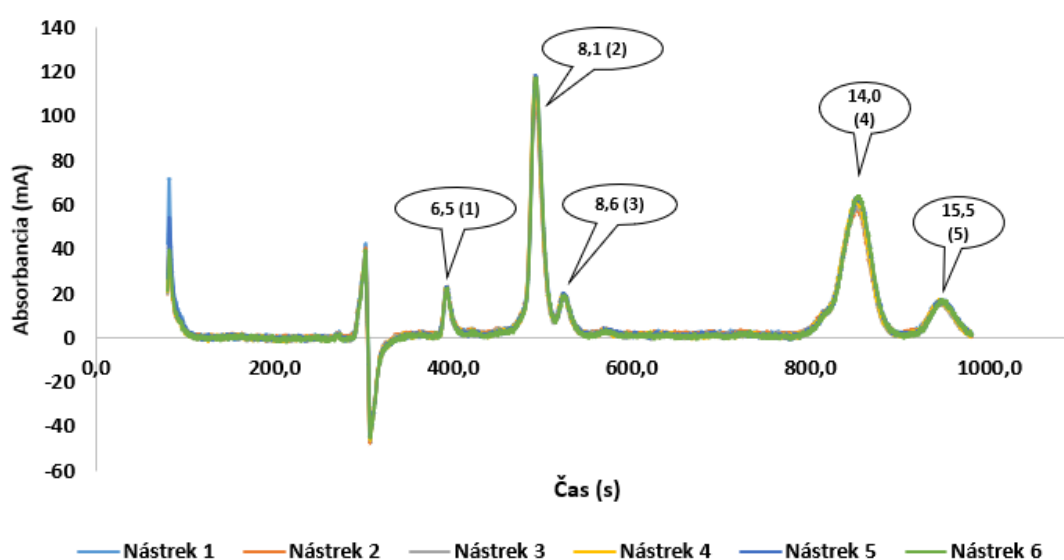
Ďalší validačný parameter, ktorý bol stanovovaný pri finálnych podmienkach vyvinutej metódy bola opakovateľnosť. Na stanovenie daného parametra bol použitý KR 4 a KR 7. Pri oboch roztokoch bolo meranie realizované šesť krát. Chromatogramy pre jednotlivé roztoky sú na obrázkoch 25 a 26.

Parametre, na ktoré bol pri vyhodnocovaní kladený dôraz, boli retenčné časy jednotlivých píkovi, plocha pod danými píkmami a intenzita odozvy detektoru v podobe absorbancie. Zo získaných hodnôt retenčných časov, plôch pod píkmami a absorbancie bol vypočítaný priemer a smerodajná odchýlka. Z týchto hodnôt bola následne dopočítaná relatívna smerodajná odchýlka.

Výsledky zisťovaných parametrov pre KR 4 sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke. Priaznivým zistením je, že smerodajná odchýlka RT neprekročila 1% ani u jedného z píkovi.

Tabuľka 21 Opakovateľnosť pre KR 4

<b>Retenčný čas (min)</b>	6,5 (1)	8,2 (2)	8,7 (3)	14,2 (4)	15,7 (5)
<b>SD</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>RSD (%)</b>	<b>0,11</b>	<b>0,07</b>	<b>0,17</b>	<b>0,19</b>	<b>0,14</b>
<b>Absorbancia (mA)</b>	21,5	109,0	18,3	59,5	14,7
<b>SD (mA)</b>	0,8	3,9	1,0	1,9	1,0
<b>RSD (%)</b>	<b>3,63</b>	<b>3,54</b>	<b>5,41</b>	<b>3,19</b>	<b>6,60</b>
<b>Plocha pod píkom</b>	2094,8	15711,9	2756,0	22544,5	4180,2
<b>SD</b>	141,6	839,3	245,2	772,2	383,8
<b>RSD (%)</b>	<b>6,74</b>	<b>5,34</b>	<b>8,90</b>	<b>3,43</b>	<b>9,18</b>



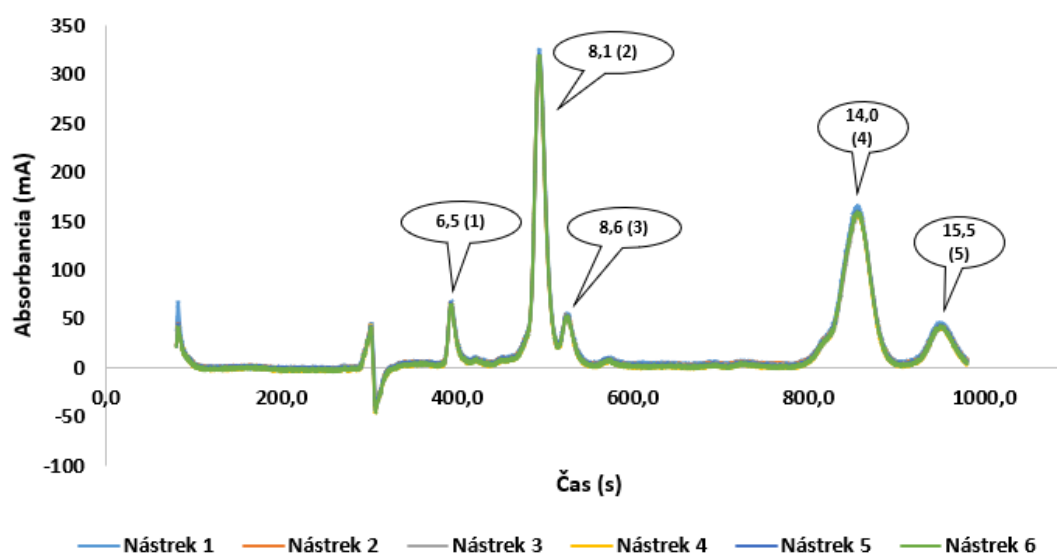
Obrázok 25 Opakovateľnosť KR 4

Na obrázku sú chromatogramy, ktoré vznikli pri testovaní opakovateľnosti. Ako vzorka bol použitý KR 4 u ktorého sa nástrek zopakoval šesť krát. Pri analýze bola použitá kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm), MF tvoril ACN a PhosA 2,0 v pomere 23:73, objem nástreku vzorky bol 10 µL a analýza trvala 16,3 minút. V bublinách je RT v minútach a poradové číslo píku.

V tabuľke 22 sú zhrnuté výsledky pre KR7, ktoré boli získané pri testovaní opakovateľnosti. Z vypočítaných hodnôt smerodajných odchýlok sledovaných parametrov je zrejmé, že výsledky u KR 7 vyšli lepšie ako u KR 4 a ani u jedného píku neprekročila hodnota smerodajnej odchýlky 5%.

Tabuľka 22 Opakovateľnosť pre KR 7

<b>Retenčný čas (min)</b>	6,6 (1)	8,2 (2)	8,7 (3)	14,3 (4)	15,8 (5)
<b>SD</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>RSD (%)</b>	<b>0,08</b>	<b>0,08</b>	<b>0,13</b>	<b>0,09</b>	<b>0,06</b>
<b>Absorbancia (mA)</b>	61,7	300,8	49,0	154,3	37,2
<b>SD</b>	1,0	4,0	0,9	2,8	0,9
<b>RSD (%)</b>	<b>1,54</b>	<b>1,32</b>	<b>1,76</b>	<b>1,83</b>	<b>2,40</b>
<b>Plocha pod píkom</b>	6243,6	43220,3	7379,6	59252,2	10887,1
<b>SD</b>	225,4	1396,9	354,3	1172,6	526,5
<b>RSD (%)</b>	<b>3,61</b>	<b>3,23</b>	<b>4,80</b>	<b>1,98</b>	<b>4,84</b>



Obrázok 26 Opakovateľnosť KR 7

Na obrázku sú chromatogramy, ktoré vznikli pri testovaní opakovateľnosti. Ako vzorka bol použitý KR 7 u ktorého sa nástrek zopakoval šesť krát. Pri analýze bola použitá kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm), MF tvoril ACN a PhosA 2,0 v pomere 23:73, objem nástreku vzorky bol 10 µL a analýza trvala 16,3 minút. V bublinách je RT v minútach a poradové číslo píku.

#### 7.1.2.4 Výťažnosť

Pre vyvinutú 1D-SIC metódu bola stanovovaná aj výťažnosť. Pri stanovovaní tohto parametra bola použitá vzorka z čaju, vzorka z tabliet a vzorka na určenie výťažnosti. Podrobný popis prípravy týchto vzoriek je spomenutý v podkapitole 6.3. Pre každú z týchto vzoriek bola, za finálnych podmienok, analýza zopakovaná dva krát. Zo získaných dát bola pre jednotlivé píky, u daných vzoriek, vypočítaná priemerná hodnota výšky píku a plochy pod píkom. Na výpočet bola použitá šablóna pripravená v programe



Microsoft Excel. Výsledky sú zhrnuté v tabuľkách nižšie. Na obrázkoch 27 a 28, sú zobrazené chromatogramy pre vzorku z čaju a vzorku z tabliet.

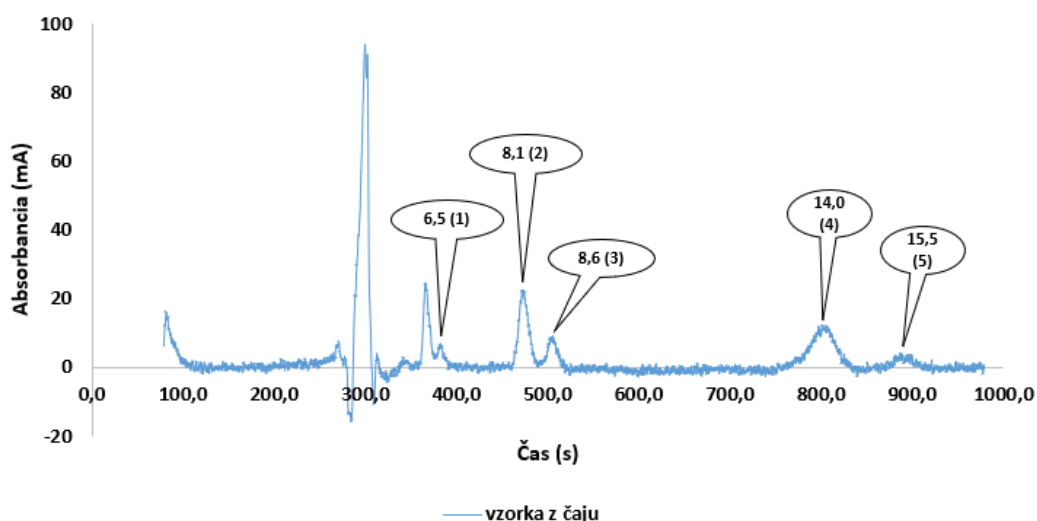
Optimálne by bolo, keby hodnota výťažnosti jednotlivých píkov u vzorky z čaju a aj u vzorky z tabliet dosiahla 100%. Z dát zhrnutých v tabuľkách 23 a 24 je zrejme, že hodnoty výťažnosti niektorých píkov nemajú od 100% ďaleko.

Z nevysvetliteľných dôvodov sú hodnoty výťažnosti píkov s RT 14,0 a 15,5 minút u vzorky z čaju diametrálne odlišné od ostatných hodnôt.

Na chromatograme vzorky z čaju, obrázok 27, je na začiatku záznamu vidieť ešte jeden pík, ktorý sa však nevyskytoval u štandardu a preto výťažnosť u tohto píku nebola stanovovaná.

Tabuľka 23 Výťažnosť 1D-SIC vzorka z čaju

Retenčný čas	6,5 (1)	8,1 (2)	8,6 (3)	14,0 (4)	15,5 (5)
<b>Výška píku</b>					
Priemer ST	20,5	84,7	14,6	25,7	6,2
Priemer VZ	5,7	21,8	8,2	12,3	4,2
Priemer STVZ	28,0	139,6	26,1	62,6	15,4
<b>Výťažnosť (%)</b>	<b>109,3</b>	<b>139,1</b>	<b>122,9</b>	<b>195,9</b>	<b>179,8</b>
<b>Plocha pod píkom</b>					
Priemer ST	1860,3	11405,3	2025,6	8209,9	1650,6
Priemer VZ	439,5	2709,3	962,5	3357,9	820,2
Priemer STVZ	2371,1	17399,5	3411,8	21166,1	3860,3
<b>Výťažnosť (%)</b>	<b>103,8</b>	<b>128,8</b>	<b>120,9</b>	<b>216,9</b>	<b>184,2</b>

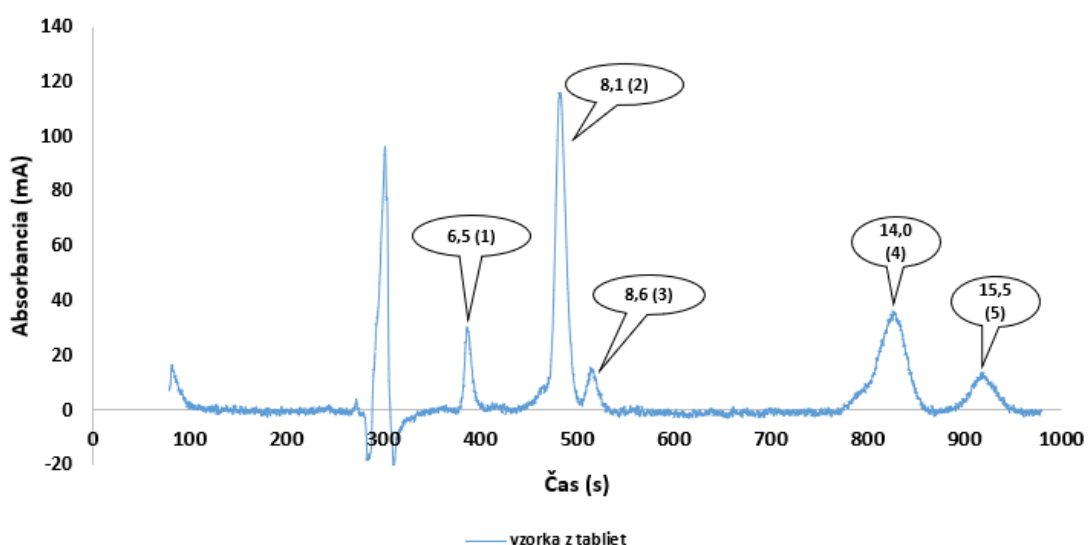


Obrázok 27 Chromatogram 1D-SIC vzorka z čaju

Na obrázku je chromatogram, ktorý vznikol pri nástreku vzorky z čaju. Pri analýze bola použitá kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm), MF tvoril ACN a PhosA 2,0 v pomere 23:73, objem nástreku vzorky bol 10 µL a analýza trvala 16,3 minút. Vyhodnotenie prebehlo pri vlnovej dĺžke 215 nm. V bublinách je RT v minútach a poradové číslo píku. Bublinami sú označené piky, u ktorých sa stanovovala výťažnosť.

Tabuľka 24 Výťažnosť 1D-SIC vzorka z tabliet

Retenčný čas	6,5 (1)	8,1 (2)	8,6 (3)	14,0 (4)	15,5 (5)
<b>Výška píku</b>					
Priemer ST	20,5	84,7	14,6	25,7	6,2
Priemer VZ	28,8	115,3	16,3	38,4	14,3
Priemer STVZ	48,1	199,9	26,8	54,5	21,2
<b>Výt'ážnosť (%)</b>	<b>94,1</b>	<b>99,8</b>	<b>72,3</b>	<b>62,8</b>	<b>111,29</b>
<b>Plocha pod píkom</b>					
Priemer ST	1860,3	11405,3	2025,6	8209,9	1650,6
Priemer VZ	2494,2	15261,4	2083,7	13056,3	4056,0
Priemer STVZ	4208,9	26422,5	3579,9	19614,6	5681,7
<b>Výt'ážnosť (%)</b>	<b>92,2</b>	<b>97,9</b>	<b>73,9</b>	<b>79,9</b>	<b>98,49</b>



Obrázok 28 Chromatogram 1D-SIC vzorky z tabliet

Na obrázku je chromatogram, ktorý vznikol pri nástreku vzorky z tabliet. Pri analýze bola použitá kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm), MF tvoril ACN a PhosA 2,0 v pomere 23:73, objem nástreku vzorky bol 10 µL a analýza trvala 16,3 minút. Vyhodnotenie prebehlo pri vlnovej dĺžke 215 nm. V bublinách je RT v minútach a poradové číslo píku. Bublinami sú označené píky, u ktorých sa stanovovala výťažnosť.

### 7.1.2.5 Ostatné validačné parametre

Okrem už spomínaných parametrov, bola v rámci validácie vyvinutej metódy hodnotená aj symetria píkov, rozlíšenie a účinnosť chromatografickej kolóny, vyjadrenej ako počet teoretických etáží.

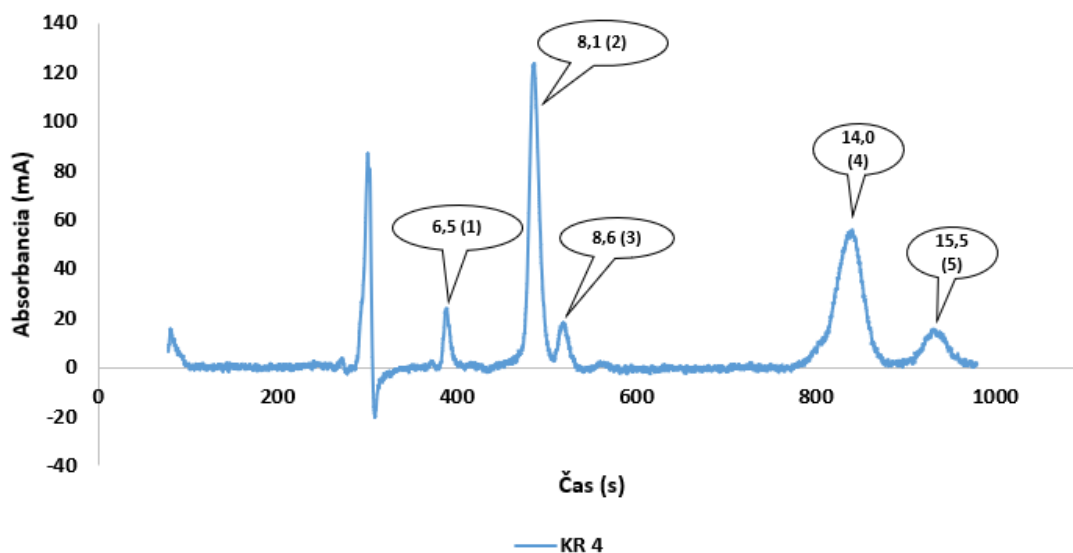
Ako predošlé, tak aj tieto parametre boli hodnotené pri finálnych podmienkach, ktoré sú zhrnuté v tabuľke 9 a program analýzy bol nastavený podľa tabuľky 8. Na vyhodnotenie a prepočet bola použitá šablóna v programe Microsoft Excel.

V tabuľke 25 sú vypočítané hodnoty symetrie pík, rozlíšenie a počet teoretických etáží pre jednotlivé píky. Na obrázku 29 je chromatogram, z ktorého boli dané parametre prepočítavané.

Podľa doporučených limitov FDA by mal byť faktor symetrie menší ako 2, hodnota rozlíšenia väčšia ako 2 a hodnota vyjadrujúca počet teoretických etáží by mala byť väčšia ako 2000. Podľa vypočítaných hodnôt sa dá skonštatovať, že až na hodnoty rozlíšenia pík s RT 8,1 a 14,0 minút, vyvinutá metóda spĺňa požadované limity FDA pre dané parametre.

Tabuľka 25 Parametre 1D-SIC

Retenčný čas (min)	6,5 (1)	8,1 (2)	8,6 (3)	14,0 (4)	15,5 (5)
Symetria píku	1,36	1,11	1,13	0,81	1,16
Počet teoretických etáží	9265	6414	8892	2892	5407
HETP	10,79	15,59	11,25	34,58	18,49
Rozlíšenie	5,9	1,7	8,6	1,7	-----



Obrázok 29 Chromatogram KR 4

Na obrázku je chromatogram z ktorého boli vyhodnocované ostatné validačné parametre pík 1D-SIC metódy. Ako vzorka bol použitý KR 4. Pri analýze bola použitá kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm), MF tvoril ACN a PhosA 2,0 v pomere 23:73, objem nástreku vzorky bol 10 µL a analýza trvala 16,3 minút. V bublinách je RT v minútach a poradové číslo píku.

## 7.2 2D-SIC metóda

### 7.2.1 Vývoj metódy

#### 7.2.1.1 Výber mobilnej a stacionárnej fázy

Pre 2D-SIC metódu bola použitá MP pripravená v pomere 30:70 (ACN:PhosA 2,0).

Pri výbere chromatografickej kolóny sa testovalo rôzne usporiadanie kolón v prvej a druhej dimenzii. Prehľad je zhrnutý v tabuľke 26.

Tabuľka 26 Kombinácia kolón pre 2D-SIC metódu

Prvá kolóna	Druhá kolóna
Ascentis® Express RP-amide; 30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm	Chromolith® Flash RP 18C; 25 mm x 3 mm
Ascentis® Express RP-amide; 30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm	Chromolith® FastGradient RP-18C; 50 mm x 2 mm
Chromolith® FastGradient RP-18C; 50 mm x 2 mm	Ascentis® Express RP-amide; 30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
Kinetex® 5 µm EVO C18; 30 x 3,0 mm	Ascentis® Express RP-amide; 30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
Časticová kolóna Discovery Cyano (Supelco); 5 µm	Ascentis® Express F5; 30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
Časticová kolóna Discovery Cyano (Supelco); 5 µm	Ascentis® Express F5; 10 cm x 4,6 mm, 5 µm
Časticová kolóna Discovery RP – 18 C (Supelco); 5µm	Ascentis® Express F5; 10 cm x 4,6 mm, 5 µm

Po vyhodnotení jednotlivých dát získaných počas testovania vhodnej kombinácie kolón bola pre prvú dimenziu zvolená chromatografická kolóna Kinetex® 5 µm EVO C18 (30 x 3,0 mm) a pre druhú dimenziu chromatografická kolóna Ascentis® Express F5 (30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm).

#### 7.2.1.2 Optimalizácia programu pre 2D-SIC

Vzhľadom k tomu, že pre vyvinutú 2D-SIC metódu bol použitý rovnaký prístroj ako pre 1D-SIC metódu bolo treba v priebehu vývoja nastaviť parametre analýzy. V použítom softvéri SIA soft v1.1.7 boli optimalizované jednotlivé kroky analýzy. Okrem už spomínaných parametrov v podkapitole 7.1.1.3, bolo treba pre 2D-SIC metódu nastaviť aj optimálne rozdelenie zmesi do frakcií, ktoré boli následne nastrekované z 1D-kolóny na 2D-kolónu. Nastavenie programu pre 2D-SIC metódu je zhrnuté v tabuľke 27.

Tabuľka 27 Nastavenie programu pre 2D-SIC

V tabuľke je zhrnutie nastavenia programu pre vyvinutú 2D metódu, z dôvodu ušetrenia miesta nie je v tabuľke uvedená 5 sekundová pauza, ktorá nasledovala po každej vykonanej úlohe.

Úloha	Jednotka	Parametre úlohy
Zopakuj 1x		
Nasávanie mobilnej fázy	Ventil 1 Pumpa	Výstup č.2 – zásobník MF Rýchlosť 70 µL/s; objem 3500 µL
Nasávanie vzorku	Ventil 1 Pumpa	Výstup č.5 – zásobník vzorku Rýchlosť 10 µL/s; objem 10 µL
Nástrek na kolónu	Detektor Ventil 3 Ventil 1 Pumpa	Vlnové dĺžky 215, 240, 260, 280, 300 nm Prepni do pozície Inject Výstup č.7 Rýchlosť 10 µL/s; objem 350 µL
Separácia	Ventil 1 Ventil 3 Pumpa	Výstup č. 8 Prepni do pozície Load Rýchlosť 10 µL/s; zvyšný objem
Zopakuj 2x		
Nasávanie mobilnej fázy	Ventil 1 Pumpa	Výstup č.2 Rýchlosť 70 µL/s; objem 3500 µL
Nástrek na kolónu	Ventil 3 Ventil 1 Pumpa	Prepni do pozície Inject Výstup č. 7 Rýchlosť 10 µL/s; objem 100 µL
Separácia	Ventil 1 Ventil 3 Pumpa	Výstup č. 8 Prepni do pozície Load Rýchlosť 10 µL/s; zvyšný objem
Zopakuj 1x		
Nasávanie mobilnej fázy	Ventil 1 Pumpa	Výstup č.2 Rýchlosť 70 µL/s; objem 3500 µL
Nástrek na kolónu	Ventil 3 Ventil 1 Pumpa	Prepni do pozície Inject Výstup č. 7 Rýchlosť nástreku 10 µL/s; 350 µL
Separácia	Ventil 1 Ventil 3 Pumpa	Výstup č. 8 Prepni do pozície Load Rýchlosť 10 µL/s; zvyšný objem
Zopakuj 1x		
Nasávanie mobilnej fázy	Ventil 1 Pumpa	Výstup č.2 Rýchlosť 70 µL/s; objem 3500 µL
Nástrek na kolónu	Ventil 3 Ventil 1 Pumpa	Prepni do pozície Inject Výstup č. 7 Rýchlosť 10 µL/s; objem 600 µL
Separácia	Ventil 1 Ventil 3 Pumpa Detektor	Výstup č. 8 Prepni do pozície Load Rýchlosť 10 µL/s; zvyšný objem Zastav skenovanie

### 7.2.1.3 Vyvinutá metóda

V priebehu práce došlo aj k vývoju 2D-SIC metódy, ktorej základná charakteristika je zhrnutá v tabuľke 28.

Tabuľka 28 Základne parametre pre 2D-SIC metódu

<b>Mobilná fáza</b>	ACN a PhosA 2,0 v pomere 30:70
<b>Kolóna v pozícii č.1</b>	Kinetex® 5 µm EVO C18; 30 x 3,0 mm
<b>Kolóna v pozícii č.2</b>	Ascentis® Express F5; 30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm
<b>Objem vzorky</b>	10 µL
<b>Rýchlosť prietoku</b>	10 µL/s
<b>Nastavenie detektoru</b>	Detektor zaznamenával vlnové dĺžky 215, 240, 260, 280, 300 nm; 8Hz; integračný čas 50 msec
<b>Dĺžka analýzy</b>	35,3 minút

### 7.2.2 Validácia vyvinutej metódy

#### 7.2.2.1 Stanovenie linearít odozvy

Linearita odozvy vyvinutej metódy bola pre jednotlivé píky stanovená metódou lineárnej regresie. Na zostavenie kalibračnej krivky bolo použitých päť kalibračných roztokov (KR1-4 a KR7) v koncentračnom rozmedzí od 5 µg/mL do 150 µg/mL. Pre každú koncentračnú hladinu bolo meranie za finálnych podmienok zopakované trikrát a z týchto troch meraní bola pre výpočet použitá priemerná hodnota zaznamenaných absorbičností jednotlivých píkov. Na vyhodnotenie a výpočet bola použitá šablóna pripravená v programe Microsoft Excel.

Problém nastal pri vyhodnocovaní výsledkov a spočíval v tom, že pri nástreku KR 1 bola odozva detektoru pre niektoré píky taká nízka, že z chromatogramu nebolo možné zaznamenať výšku daných píkov. Keďže na zostrojenie kalibračnej krivky je požadovaných aspoň päť bodov, tak linearita bola určená iba pre píky s RT 16,7; 23,7; 32,0; a 32,5 minút. Nie príliš šťastným bolo aj to, že rozdiel koncentrácie medzi KR 4 a KR 7 bol príliš veľký.

Namerané hodnoty a parametre kalibračnej krivky pre píky, u ktorých bola linearita stanovovaná sú zhrnuté v nasledujúcich tabuľkách.

Hodnota korelačného koeficientu ani u jedného píku nedosiahla liekopisom požadovanú hodnotu 0,99.

Tabuľka 29 Namerané hodnoty pre pík s RT 16,7 minút

Koncentrácia (µg/mL)	Nástrek č.1 (mA)	Nástrek č.2 (mA)	Nástrek č.3 (mA)	Priemer (mA)	RSD
5,25	39,1	39,9	39,4	39,47	0,84%
10,5	62,5	69,1	57,5	63,03	7,54%
26,0	80,2	104	103,4	95,87	11,56%
52,5	253,8	232,8	235,4	240,67	3,88%
150,5	361,9	360,9	326,8	349,87	4,66%

Tabuľka 30 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s RT 16,7 minút

Štatistické parametre pre regresiu : $y = a + bx$		
Počet bodov	n = 5	Odhad chyby
Smernica	b = 0,433391	± 0,093
Absolútny člen	a = -19,8804	± 18,337
Korelačný koeficient	r = 0,937546	
Reziduálna odchýlka	s = 24,664	

Tabuľka 31 Namerané hodnoty pre pík s RT 23,8 minút

Koncentrácia (µg/mL)	Nástrek č.1 (mA)	Nástrek č.2 (mA)	Nástrek č.3 (mA)	Priemer (mA)	RSD
5,25	35,5	22,3	19,6	25,80	26,93%
10,5	20,7	16,6	9,5	15,60	29,66%
26,0	14,5	18,3	17,3	16,70	9,63%
52,5	37,6	33,9	34,4	35,30	4,64%
150,5	104,3	82,1	56,9	81,10	23,88%

Tabuľka 32 Štatistické parametre kalibračnej krivky pre pík s RT 23,8 minút

Štatistické parametre pre regresiu : $y = a + bx$		
Počet bodov	n = 5	Odhad chyby
Smernica	b = 2,208042	± 0,309
Absolútny člen	a = -28,5607	± 13,137
Korelačný koeficient	r = 0,971781	
Reziduálna odchýlka	s = 16,725	

Tabuľka 33 Namerané hodnoty pre pík s RT 32,0 minút

Koncentrácia (µg/mL)	Nástrek č.1 (mA)	Nástrek č.2 (mA)	Nástrek č.3 (mA)	Priemer (mA)	RSD
5,25	49,3	47,1	45,5	47,30	3,29%
10,5	65,2	59,1	48,2	57,50	12,23%
26,0	60,2	84,9	86,1	77,07	15,49%
52,5	156,0	138,3	122,6	138,97	9,82%
150,5	274,2	212,5	192,5	226,40	15,36%

Tabuľka 34 Štatistické parametre kalibračnej krivky pre pík s RT 32,0 minút

Štatistické parametre pre regresiu : $y = a + bx$		
Počet bodov	n = 5	Odhad chyby
Smernica	b = 0,804823	± 0,105
Absolútny člen	a = -39,5852	± 13,405
Korelačný koeficient	r = 0,975566	
Reziduálna odchýlka	s = 15,578	

Tabuľka 35 Namerané hodnoty pre pík s RT 32,5 minút

Koncentrácia ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nástrek č.1 (mA)	Nástrek č.2 (mA)	Nástrek č.3 (mA)	Priemer (mA)	RSD
5,25	16,5	14,6	15,0	15,37	5,32%
10,5	20,6	22,0	21,9	21,50	2,97%
26,0	16,3	25,0	25,0	22,10	18,56%
52,5	59,5	55,2	52,7	55,80	5,03%
150,5	83,6	68,7	69,6	73,97	9,22%

Tabuľka 36 Štatistické parametre kalibračnej krivky pre pík s RT 32,5 minút

Štatistické parametre pre regresiu : $y = a + bx$		
Počet bodov	n = 5	Odhad chyby
Smernica	b = 2,192596	± 0,544
Absolútny člen	a = -34,2632	± 24,064
Korelačný koeficient	r = 0,918665	
Reziduálna odchýlka	s = 28,009	

### 7.2.2.2 Limit detekcie a limit kvantifikácie

Rovnakým spôsobom ako pri stanovovaní LOD a LOQ u 1D-SIC metódy sa postupovalo aj pri vyhodnocovaní daných parametrov u vyvinutej 2D-SIC metódy. Pomer výšky píku a výšky šumu bol sledovaný na chromatografických záznamoch kalibračných roztokov získaných v priebehu stanovovania linearitu odozvy 2D-SIC metódy.

Na základe spôsobu vyhodnocovania sú ako pre 1D-SIC metódu, tak aj pre 2D-SIC metódu hodnoty LOD a LOQ jednotlivých píkov len orientačné. Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 37 LOD a LOQ pre 2D-SIC

Retenčný čas (min)	2,7 (1)	9,7 (2)	16,7 (3)	23,7 (4)	25,4 (5)	32,0 (6)	32,5 (7)
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	10	10	5	5	10	5	5
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	30	30	15	15	30	15	15



### 7.2.2.3 Opakovateľnosť

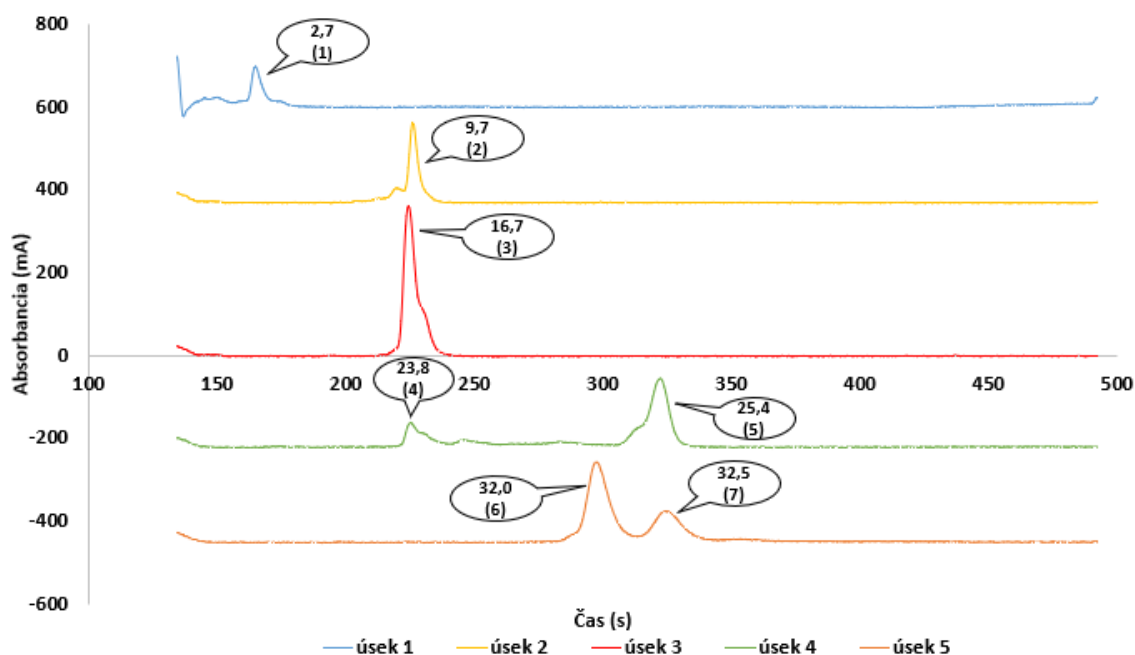
Na hodnotenie opakovateľnosti vyvinutej metódy bol použitý KR 7, u ktorého bolo päť krát, za finálnych podmienok, realizované meranie. Pri vyhodnocovaní bol kladený dôraz na parametre charakterizujúce jednotlivé píky, a to retenčný čas, plocha pod píkom a absorbančia. Z nameraných hodnôt sa vypočítal priemer, smerodajná odchýlka a následne relatívna smerodajná odchýlka. Na vyhodnocovanie jednotlivých záznamov bola použitá šablóna pripravená v programe Microsoft Excel.

Výsledné hodnoty opakovateľnosti u KR 7 sú zhrnuté v tabuľke 38. Hodnoty smerodajných odchýlok neprekročili 1% iba u retenčných časov. Pri porovnaní výsledkov vyvinutých metód bolo dosiahnuté lepších výsledkov u 1D-SIC metódy, kde pri použití KR 7 ani jedna hodnota smerodajnej odchýlky neprekročila 5 %.

Na obrázku 30 je chromatografický záznam tretieho nástreku KR 7. Sú na ňom označené píky, pre ktoré bola opakovateľnosť vypočítaná. Záznam je rozdelený na päť úsekov podľa nástreku frakcií z 1D kolóny na 2D kolónu.

Tabuľka 38 Opakovateľnosť pre KR 7

<b>Retenčný čas (min)</b>	2,7 (1)	9,7 (2)	16,7 (3)	23,8 (4)	25,4 (5)	32,0 (6)	32,5 (7)
<b>SD</b>	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>RSD (%)</b>	<b>0,24</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>	<b>0,04</b>	<b>0,07</b>
<b>Absorbancia (mA)</b>	100,5	174,9	396,5	68,2	167,5	206,6	72,8
<b>SD</b>	12,8	46,3	66,8	21,9	19,6	36,6	5,5
<b>RSD (%)</b>	<b>12,71</b>	<b>26,47</b>	<b>16,86</b>	<b>32,19</b>	<b>11,73</b>	<b>17,70</b>	<b>7,56</b>
<b>Plocha pod píkom</b>	6282,6	7794,9	26143,4	5608,5	16963,5	22239,0	9110,1
<b>SD</b>	739,4	2275,8	3975,7	1673,9	2182,9	4474,4	696,7
<b>RSD (%)</b>	<b>11,77</b>	<b>29,2</b>	<b>15,21</b>	<b>29,85</b>	<b>12,87</b>	<b>20,12</b>	<b>7,65</b>



Obrázok 30 Chromatogram 2D-SIC pre KR 7, nástrek 3

Na obrázku je chromatogram, ktorý vznikol pri nástreku KR7. Chromatogram je rozdelený na úseky podľa frakcií nastrekovaných z 1D do 2D. Pre prvú dimenziu bola použitá kolóna Kinetex® 5 µm EVO C18 (30 x 3,0 mm) a pre druhú Ascentis® Express F5 (30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm), MF tvoril ACN a PhosA 2,0 v pomere 30:70, objem nástreku vzorky bol 10 µL a analýza trvala 35,3 minút. Vyhodnotenie prebehlo pri vlnovej dĺžke 215 nm. V bublinách je RT v minútach a poradové číslo píku.

#### 7.2.2.4 Výťažnosť

Na určenie výťažnosti vyvinutej 2D-SIC metódy bol zvolený rovnaký postup ako pre 1D-SIC metódu. Boli zrealizované merania vzorky z čaju, vzorky z tabliet a vzorky na určenie výťažnosti. Postup prípravy týchto vzoriek je podrobnejšie popísaný v podkapitole 6.3. Pre každú vzorku sa analýza zopakovala dva-krát. Analýza prebiehala za finálnych podmienok, vid' tabuľka 28, a program bol nastavený podľa tabuľky 27.

Pri vyhodnocovaní kvantifikácie 2D-SIC metódy boli dosiahnuté limity súčasného spracovania dát a výsledky výťažnosti sa nepodarilo vyhodnotiť.

#### 7.2.2.5 Ostatné validačné parametre

Rovnako, ako pri 1D-SIC metóde, boli parametre jednotlivých píkov, ako symetria, rozlíšenie a účinnosť chromatografickej kolóny, vyhodnotené aj pre vyvinutú 2D-SIC metódu.

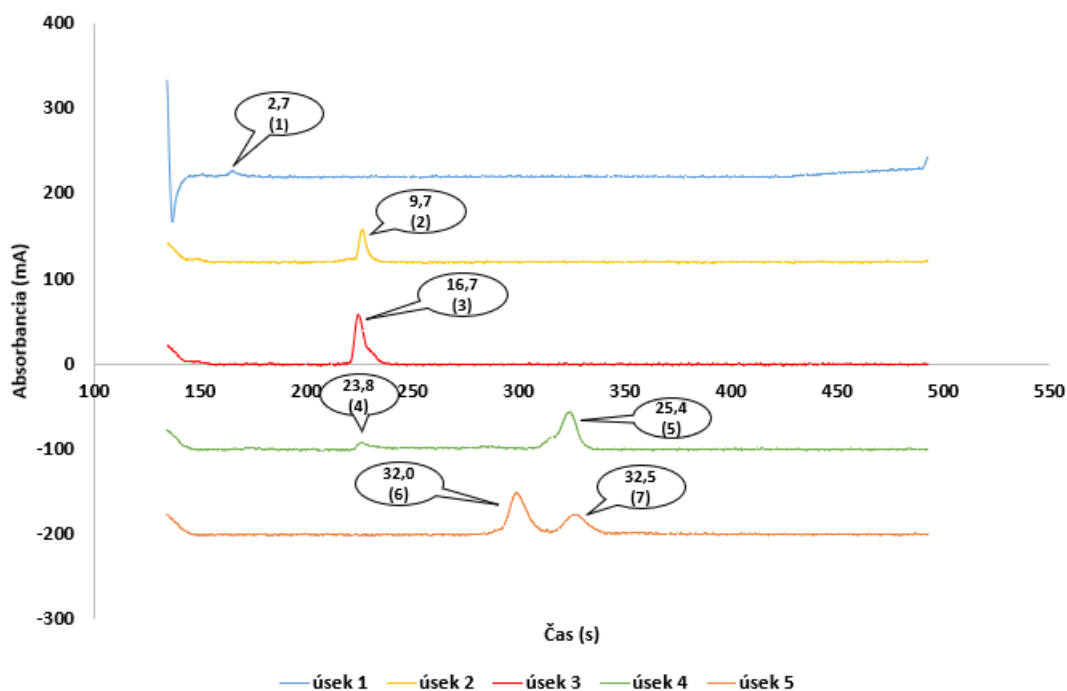
Jednotlivé parametre boli hodnotené pri finálnych podmienkach, ktoré sú zhrnuté v tabuľke 28 a program analýzy bol nastavený podľa tabuľky 27. Na výpočet jednotlivých parametrov bola použitá šablóna pripravená v programe Microsoft Excel.

V nasledujúcej tabuľke sú vypočítané hodnoty symetrie pík, rozlíšenie a počet teoretických etáží pre jednotlivé píky vyvinutej 2D-SIC metódy. Výsledné hodnoty boli získané z chromatografického záznamu, ktorý je na obrázku 31.

Pozitívnym zistením bolo, že rovnako ako u 1D-SIC metódy, tak aj u 2D-SIC vyvinutej hodnoty jednotlivých parametrov spĺňujú požiadavky FDA. Jediná hodnota ktorá nespĺňa limit je rozlíšenie píku s RT 32,0 minút.

Tabuľka 39 Parametre 2D-SIC

Retenčný čas (min)	2,7(1)	9,7 (2)	16,7 (3)	23,8 (4)	25,4 (5)	32,0 (6)	32,5 (7)
Symetria píku	0,95	1,4	1,97	1,87	0,80	1,13	1,06
Počet teoretických etáží	3798	11693	6080	1925	5299	3548	2942
HETP	7,90	2,57	4,93	15,58	5,66	8,45	10,20
Rozlíšenie	68,8	61,0	36,6	6,7	27,0	1,6	----



Obrázok 31 Chromatogram 2D-SIC pre KR 2

Na obrázku je chromatogram, ktorý vznikol pri nástreku KR2. Chromatogram je rozdelený na úseky podľa frakcií nastrekovaných z 1D do 2D. Pre prvú dimenziu bola použitá kolóna Kinetex® 5 µm EVO C18 (30 x 3,0 mm) a pre druhú Ascentis® Express F5 (30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm), MF tvoril ACN a PhosA 2,0 v pomere 30:70, objem nástreku vzorky bol 10 µL a analýza trvala 35,3 minút. Vyhodnotenie prebehlo pri vlnovej dĺžke 215 nm. V bublinách je RT v minútach a poradové číslo píku.

## 8 Záver

Aby bolo možné splniť prvý cieľ práce bola vyvinutá, optimalizovaná a validovaná 1D-SIC a 2D-SIC metóda určená na separáciu látok obsiahnutých v silymaríne. Silymarín predstavuje zmes flavonoligánov, ktorú tvorí SB<sub>A</sub>, SB<sub>B</sub>, ISB<sub>A</sub>, ISB<sub>B</sub>, SC<sub>A</sub>, SC<sub>B</sub> a SD. V priebehu vývoja bola zvolená vhodná mobilná a stacionárna fáza a taktiež bolo optimalizované nastavenie programu analýzy.

K analýze 1D-SIC metódou bola použitá dlhá kolóna Ascentis® Express F5 (10 cm x 4,6 mm, 5 µm) a predkolóna opti-guard® C18 (1mm). Režim analýzy bol zvolený izokratický o dĺžke analýzy 16,3 minút s prietokovou rýchlosťou 5 µL/s. Ako mobilná fáza bola použitá zmes ACN s PhosA 2,0 pripravená v pomere 27:73.

Pri analýze 2D-SIC metódou bola v prvej dimenzii použitá kolóna Kinetex® 5 µm EVO C18 (30 x 3,0 mm) a pre druhú dimenziu bola zvolená kolóna Ascentis® Express F5 (30 mm x 4,6 mm, 2,7 µm). V 2D-SIC systéme bola ešte pred prvú kolónu zaradená predkolóna opti-guard® C18 (1mm). Režim analýzy bol zvolený izokratický o dĺžke 35,3 minút s prietokovou rýchlosťou 10 µL/s. Ako mobilná fáza bola použitá zmes ACN s PhosA 2,0 pripravená v pomere 30:70.

V priebehu 1D-SIC analýzy boli látky obsiahnuté v štandarde silymarínu separované do piatich pík. U vyvinutej 2D-SIC metódy boli separované látky premietnuté do siedmych pík, ktoré boli rozložené v piatich úsekoch podľa frakcií nastrekovaných z 1D kolóny na 2D kolónu. Vzhľadom k tomu, že v priebehu práce neboli použité štandardy látok obsiahnutých v silymaríne nedošlo k identifikácii jednotlivých pík.

Pre jednotlivé píky boli, z dát získaných počas analýzy, stanovené validačné parametre ako symetria, rozlíšenie, počet teoretických etáží, linearita, LOD a LOQ, opakovateľnosť a výťažnosť. Po vyhodnotení jednotlivých parametrov sa dá konštatovať, že vyvinutá 2D-SIC metóda dosahuje porovnateľné výsledky s 1D-SIC metódou v parametroch ako je symetria píku, rozlíšenie, počet teoretických etáží a opakovateľnosť retenčných časov. V ostatných parametroch však 2D-SIC metóda výrazne zaostáva. Výťažnosť sa u 2D-SIC metódy nepodarilo ani vyhodnotiť, kde sa ukázali limity súčasného spracovávania dát.

Z dôvodu chýbajúceho softvéru na vyhodnocovanie nameraných dát pre SIC boli všetky výsledky spracované za pomoci programu Microsoft Excel. V tomto programe bola pripravená šablóna, v ktorej došlo ku korekcii šumu detektoru a následne k vypočítaniu jednotlivých validačných parametrov. Vďaka takto pripravenej šablóne bolo vyhodnocovanie jednotlivých chromatografických záznamov výrazne zrýchlené.

## 9 Zoznam obrázkov a tabuliek

### 9.1 Zoznam obrázkov

Obrázok 1 Výskyt Pestreca mariánskeho v Európe (vyznačené čiernou farbou) [4] .....	12
Obrázok 2 Pestrec mariánsky ( <i>Silybum marianum</i> ) [6] .....	13
Obrázok 3 <i>Silybi mariani fructus</i> [8] .....	13
Obrázok 4 Štruktúra silibínu A [14] .....	14
Obrázok 5 Štruktúra izosilibínu A [15] .....	14
Obrázok 6 Štruktúra silibínu B [16] .....	14
Obrázok 7 Štruktúra izosilibínu B [17].....	14
Obrázok 8 Štruktúra silichristínu A [18] .....	15
Obrázok 9 Štruktúra silichristínu B [19].....	15
Obrázok 10 Štruktúra silidianínu [20] .....	15
Obrázok 11 Schematické usporiadanie SIC systému .....	19
Obrázok 12 Chromatografická kolóna [33] .....	20
Obrázok 13 Štruktúra monolitu (upravené) [36] .....	21
Obrázok 14 Core-shell častica (upravené) [40] .....	22
Obrázok 15 Bylinný čaj Ostropestrec [48] .....	29
Obrázok 16 Tablety Lipovitan S [49] .....	30
Obrázok 17 Schematické usporiadanie 1D-SIC systému .....	32
Obrázok 18 Usporiadanie 2D-SIC, nástrek na kolónu .....	33
Obrázok 19 Usporiadanie 2D-SIC, separácia .....	33
Obrázok 20 Chromatografický záznam, základná úprava .....	35
Obrázok 21 Chromatogram, test šablóny .....	37
Obrázok 22 Porovnanie vlnových dĺžok.....	40
Obrázok 23 Chromatogram 1D-SIC KR1 .....	42
Obrázok 24 Chromatogram 1D-SIC KR2 .....	45
Obrázok 25 Opakovateľnosť KR 4 .....	47
Obrázok 26 Opakovateľnosť KR 7 .....	48
Obrázok 27 Chromatogram 1D-SIC vzorka z čaju.....	49
Obrázok 28 Chromatogram 1D-SIC vzorky z tabliet .....	50
Obrázok 29 Chromatogram KR 4 .....	51
Obrázok 30 Chromatogram 2D-SIC pre KR 7, nástrek 3 .....	58
Obrázok 31 Chromatogram 2D-SIC pre KR 2 .....	59

## 9.2 Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Rešerš .....	16
Tabuľka 2 Rešerš .....	17
Tabuľka 3 Príprava mobilnej fázy .....	28
Tabuľka 4 Hodnoty pre výpočet korekcie šumu [50; 51].....	36
Tabuľka 5 Test šablóny na korekciu šumu .....	37
Tabuľka 6 Testované kolóny .....	39
Tabuľka 7 MP použitá na testovanie gradientu .....	39
Tabuľka 8 Nastavenie programu pre 1D-SIC .....	41
Tabuľka 9 Základná charakteristika metódy pre 1D-SIC .....	41
Tabuľka 10 Namerané hodnoty pre pík s retenčným časom 6,5 minút .....	43
Tabuľka 11 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s retenčným časom 6,5 minút .....	43
Tabuľka 12 Namerané hodnoty pre pík s retenčným časom 8,1 .....	43
Tabuľka 13 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s retenčným časom 8,1 minút .....	43
Tabuľka 14 Namerané hodnoty pre pík s retenčným časom 8,6 .....	44
Tabuľka 15 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s retenčným časom 8,6 minút .....	44
Tabuľka 16 Namerané hodnoty pre pík s retenčným časom 14,0 .....	44
Tabuľka 17 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s retenčným časom 14,0 minút .....	44
Tabuľka 18 Namerané hodnoty pre pík s retenčným časom 15,5 minút .....	45
Tabuľka 19 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s retenčným časom 15,5 minút .....	45
Tabuľka 20 LOD a LOQ 1D-SIC .....	46
Tabuľka 21 Opakovateľnosť pre KR 4 .....	47
Tabuľka 22 Opakovateľnosť pre KR 7 .....	48
Tabuľka 23 Výťažnosť 1D-SIC vzorka z čaju.....	49
Tabuľka 24 Výťažnosť 1D-SIC vzorka z tabliet .....	50
Tabuľka 25 Parametre 1D-SIC .....	51
Tabuľka 26 Kombinácia kolón pre 2D-SIC metódu.....	52
Tabuľka 27 Nastavenie programu pre 2D-SIC .....	53

Tabuľka 28 Základne parametre pre 2D-SIC metódu .....	54
Tabuľka 29 Namerané hodnoty pre pík s RT 16,7 minút .....	55
Tabuľka 30 Štatistické parametre pre kalibračnú krivku píku s RT 16,7 minút.....	55
Tabuľka 31 Namerané hodnoty pre pík s RT 23,8 minút .....	55
Tabuľka 32 Štatistické parametre kalibračnej krivky pre pík s RT 23,8 minút.....	55
Tabuľka 33 Namerané hodnoty pre pík s RT 32,0 minút .....	55
Tabuľka 34 Štatistické parametre kalibračnej krivky pre pík s RT 32,0 minút.....	56
Tabuľka 35 Namerané hodnoty pre pík s RT 32,5 minút .....	56
Tabuľka 36 Štatistické parametre kalibračnej krivky pre pík s RT 32,5 minút.....	56
Tabuľka 37 LOD a LOQ pre 2D-SIC .....	56
Tabuľka 38 Opakovateľnosť pre KR 7 .....	57
Tabuľka 39 Parametre 2D-SIC .....	59



## 10 Použitá literatura

1. **Jahodář L.** *Farmakobotanika semenné rostliny*. Praha : Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-2015-2.
2. **Spilková J., a kol.** *Farmakognozie*. Praha : Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
3. **Schonfelder P., Schonfelder I.,** *Liečivé rastliny Ottov sprievodca prírodou*. Praha : OTTOVO NAKLADATELSTVÍ, 2010. ISBN 978-80-7360-589-6.
4. **Abenavoli L., Capasso R., Milic N., Capasso F.** Milk Thistle in Liver Diseases: Past, Present, Future (Review). s.l. : Wiley Online Library, 2010. 24, s. 1423-1432.
5. **Farmer-Knowlesová H.** *Léčivé rostliny od A do Z: nejnovější průvodce světem bylin, stromů a květin: [podrobný přehled květin, stromů a plodů s uzdravovací silou]*. Praha : Metafora, 2011. ISBN978-80-7359-270-7.
6. <https://www.amazon.com/Silybum-marianum-Thistle-Seeds-Approx/dp/B07Z52JP37>. [Online] dostupné 20.6.2022
7. **Český lékopis 2017 - Doplněk 2020**. Praha : Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-271-1757-4.
8. [https://www.pharma4u.de/uploads/tx\\_pflanzendatenbank/Silybi\\_mariani\\_fructus\\_Droge\\_i.jpg](https://www.pharma4u.de/uploads/tx_pflanzendatenbank/Silybi_mariani_fructus_Droge_i.jpg). [Online] dostupné 20.6.2022
9. **Nagy M., Mučaji P., Grančai G.** *Farmakognózia Biologicky aktívne rastlinné metabolity a ich zdroje*. Bratislava : Herba, 2017. ISBN 978-80-89631-64-3.
10. <https://sciencemag.cz/v-olomouci-vznikly-nove-odrudy-ostropestrece/>. [Online] dostupné 23.6.2022
11. **Kvasnička K., Bíba B., Ševčík R., Voldřich M., Krátká J.** Analysis of the active components of silymarin. *Journal of Chromatography A*. 2003.
12. **Abouzid S.** *Silymarin, Natural Flavonolignans from Milk Thistle, Phytochemicals - A Global, Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. s.l. : Dr Venketeshwer Rao, 2012. ISBN: 978-953-51-0296-0.

13. M., Bijak. Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.)-Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*. 2017.
14. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31553#section=2D-Structure>. [Online] dostupné 25.6.2022
15. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11059920#section=2D-Structure>. [Online] dostupné 25.6.2022
16. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1548994#section=2D-Structure>. [Online] dostupné 25.6.2022
17. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10885340#section=2D-Structure>. [Online] dostupné 25.6.2022
18. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441764#section=2D-Structure>. [Online] dostupné 25.6.2022
19. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12442785#section=2D-Structure>. [Online] dostupné 25.6.2022
20. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11982272>. [Online] dostupné 25.6.2022
21. Fibigr J., Šatínský D., Solich P. A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a *Silybum marianum* extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017.
22. Chocholouš P. , Solich P., Šatínský D. An overview of sequential injection chromatography. *Analytica chimica acta*. 2007.
23. Chocholouš P., Šatínský D., Solich P. New generation of sequential injection chromatography: Great enhancement. *Talanta*. 2019.
24. IDRIS A.M. The second five years of sequential injection chromatography: Significant Developments in the Technology and Methodologies. *Critical Reviews in Analytical chemistry*. 2014.

25. Idris A.M., Elgorashe R.E.E. Sequential injection chromatography against HPLC and CE: Application to separation and quantification of amoxicillin and clavulanic acid. *Microchemical Journal*. 2011.
26. Klimeš J. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové : Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015. ISBN: 978-80-260-8175-3.
27. Nováková L., Douša M., a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha : Europrint a.s, 2013. ISBN: 978-80-260-4244-0.
28. Nováková L., Douša M., a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha : Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
29. *Český Lékopis 2017 - Doplněk 2020 1.díl*. Praha : Grada Publishing, 2020.
30. [https://www.fchpt.stuba.sk/buxus/docs/oddelenie\\_analytickej\\_chemie/terminologia.pdf](https://www.fchpt.stuba.sk/buxus/docs/oddelenie_analytickej_chemie/terminologia.pdf). [Online] dostupné 3.7.2022
31. <http://www.hplc.cz/Validace/linearita.html>. [Online] dostupné 3.7.2022
32. Naga Navya CH., Pravallika D., Navya Sri D. A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *IOSR Journal Of Pharmacy*. 2015.
33. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B*. 2009.
34. <https://www.klanem.cz/produkt/2739-dr-max-ostropestrec-bylinny-caj-20x1-5-g>. <https://www.klanem.cz/produkt/2739-dr-max-ostropestrec-bylinny-caj-20x1-5-g>. [Online] dostupné 10.7.2022
35. P. Chocholouš, L. Kosařová, D. Šatínský, H. Sklenářová, P. Solich. Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography – Fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column. *Talanta*. 2011.
36. Snyder L.R., Kirkland J.J., a Dolan J.W. *Introduction to modern liquid chromatography*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
37. <http://hplc.cz/>. [Online] dostupné 22.8.2022
38. [http://www.hplc.cz/Teorie/monolithic\\_columns.htm](http://www.hplc.cz/Teorie/monolithic_columns.htm). [Online] dostupné 22.8.2022

39. Zabka M., Minceva M., Rodrigues A. E. Experimental characterization and modelling of analytical monolithic column. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. Vol. 70, 2007, s. 95-105.
40. Hayes R., Ahmed A., Edge T., Zhang H. Core-Shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1357, 2014, s. 36-52.
41. Gonzáles-Ruiz V., Olives A. I., Martín M. A. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 64, 2015, s. 17-28.
42. Chocholouš P, Vacková J., Šrámková I., Šatínský D. Advantages of core-shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids. *Talanta*. Vol.103, 2013, s. 221-227.
43. <https://www.pcimag.com/articles/98223-core-shell-nanoparticle-metal-oxide-infusion>. [Online] dostupné 22.8.2022
44. <https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%204.1.2.%20Principle.html>. [Online] dostupné 20.8.2022
45. Chocholouš P., Šatínský D., Sklenářová H., Solich P. Two-column Sequential Injection Chromatography - New approach for fast and effective analysis and its comparison with gradient elution chromatography. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 668, 2010, s. 61-66.
46. Wang K., Zhang H., Shen L., Du Q., Li J. Rapid separation and characterization of active flavonolignans of *Silybum marianum* by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 53, 2010, s. 1053-1057.
47. Graf T.N., Cech N.B., Polyak S.J., Oberlies N.H. A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum*) extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol.126, 2016, s. 26-33.

48. Quaglia M.G., Bossu E., Donati E., Mazzanti G., Brandt A. Determination of silymarine in the Extract from the dried silybum marianum fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 19, 1999, s. 435-442.
49. [https://www.drmax.cz/lipovitan-s-tbl-90-15-zdarma?ppcbee-adt-text-variant=Ad%20text%20generator%20%231&gclid=EAIaIQobChMIkdbc-syv-QIVD6h3Ch0NnQeGEAAYASAAEgIArvD\\_BwE](https://www.drmax.cz/lipovitan-s-tbl-90-15-zdarma?ppcbee-adt-text-variant=Ad%20text%20generator%20%231&gclid=EAIaIQobChMIkdbc-syv-QIVD6h3Ch0NnQeGEAAYASAAEgIArvD_BwE). [Online] dostupné 10.7.2022
50. Guiochon G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography (review). *Journal of Chromatography A*. Vol. 1168, 2007, s. 101-168.
51. [http://www.statistics4u.info/fundstat\\_eng/cc\\_savgol\\_coeff.html](http://www.statistics4u.info/fundstat_eng/cc_savgol_coeff.html). [Online] dostupné 8.9.2022
52. Savitzky A., Golay M.J.E., Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry*. Vol. 36, 1964.