

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Sekvenční injekční chromatografie

–

Pokročilé separace bioflavonoidů v potravních doplňcích

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Kristýna Pavelková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové

Kristýna Pavelková

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli panu doc. PharmDr. Petru Chocholoušovi za vedení mé práce, za trpělivost a pomoc při jejím vypracování.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Analytické chemie

Kandidát: Kristýna Pavelková

Školitel: doc. PharmDr. Petr Chocholouš, PhD.

Název diplomové práce: Sekvenční injekční chromatografie – pokročilé separace bioflavonoidů v potravních doplňcích

V práci byla vyvinuta metoda sekvenční injekční chromatografie s UV detekcí pro separaci bioflavonoidů rutinu, diosminu a hesperidinu. Byl vytvořen postup pro úpravu dat z detektoru, který umožňuje zvýšení citlivosti metody.

Pro separaci byla použita chromatografická kolona YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μ, 8 nm. Mobilní fázi tvořila směs acetonitrilu s kyselinou fosforečnou pH 2,0 v poměru 25:75. Byla zvolena izokratická eluce; průtoková rychlost 10 μl/s a celková délka analýzy byla 7,9 minut.

Pro analýzu byl použit systém pro sekvenční injekční chromatografii a software SIAsoft. Pro zpracování a úpravu dat byly použity programy Microsoft Excel a Origin Pro 9.

Vyvinutou metodou se nepodařilo kvantifikovat obsah flavonoidů Hemostopu Probio MAX. Metoda úpravy dat přinesla významné snížení LOD a LOQ.

Klíčová slova: flavonoidy, rutin, diosmin, hesperidin, sekvenční injekční chromatografie, Savitzky-Golay filtr, potravní doplňky.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: Kristýna Pavelková

Supervisor: doc. PharmDr. Petr Chocholouš, PhD.

Title of diploma thesis: Sequential injection chromatography – advanced separations of bioflavonoids in food supplements

Two methods were developed in the thesis. A primary method of sequential injection chromatography with UV detection was developed for separation of bioflavonoids rutin, hesperidin and diosmin. A second method was developed for adjustment data, which enables to increase sensitivity of first developed method.

Chromatographic column YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4.6 mm; 5 μ, 8 nm was used for separation. The mobile phase consisted of a mixture of acetonitrile with phosphoric acid solution pH 2.0 prepared in a ratio of 25:75. Isocratic elution was chosen; flowrate was 10 μl/s and total length of analysis was 7.9 minutes.

Sequential injection chromatography system and computer software SIAsoft was used for analysis. Programs Microsoft Excel and Origin Pro 9 were used for processing and adjustment of data.

Developed method was not successful in quantification of amount of flavonoids in Hemostop Probio MAX. Method for data adjustment enabled significant reduction of LOD and LOQ.

Keywords: flavonoids, rutin, diosmin, hesperidin, sequential injection chromatography, Savitzky-Golay filter, food supplements.

Seznam zkratk

2D-SIC	dvojdimenzionální sekvenční injekční chromatografie
AcetA	kyselina octová
DMSO	dimethylsulfoxid
ESI-MS	elektrosprejová ionizace – hmotnostní spektrometrie
FDA	Food and Drug Administration; Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KR ₁	kalibrační roztok o koncentraci 5 µg/ml
KR ₂	kalibrační roztok o koncentraci 10 µg/ml
KR ₃	kalibrační roztok o koncentraci 15 µg/ml
KR ₄	kalibrační roztok o koncentraci 25 µg/ml
KR ₅	kalibrační roztok o koncentraci 40 µg/ml
KR ₆	kalibrační roztok o koncentraci 60 µg/ml
KR ₇	kalibrační roztok o koncentraci 100 µg/ml
KR ₈	kalibrační roztok o koncentraci 150 µg/ml
LOD	limit detekce
LogP	rozdělovací koeficient
LOQ	limit kvantifikace
PhosA	kyselina fosforečná
pK _A	disociační konstanta
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SIA	sekvenční injekční analýza
SIC	sekvenční injekční chromatografie
SPE-HPLC	extrakce na tuhou fázi, ve spojení s HPLC
SST	systém suitability test; test vhodnosti systému
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	ultrafialové – viditelné záření

Obsah

1	Úvod	10
2	Cíl práce	11
3	Teoretická část.....	12
3.1	Bioflavonoidy	12
3.1.1	Rutin	14
3.1.2	Diosmin.....	16
3.1.3	Hesperidin.....	18
3.1.4	Rešerše prací popisující stanovení bioflavonoidů	19
3.2	Sekvenční injekční chromatografie	21
3.2.1	Uspořádání přístroje.....	22
3.2.2	Kolony	23
3.3	Odstranění šumu signálu detektoru.....	24
3.3.1	Savitzky-Golay filtr.....	24
3.4	Validace analytické metody	25
3.4.1	Přesnost metody	25
3.4.2	Preciznost metody.....	25
3.4.3	Linearita a rozsah metody	26
3.4.4	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	27
3.4.5	Selektivita metody.....	27
3.4.6	Robustnost.....	28
3.4.7	Test způsobilosti systému	28
4	Experimentální část	30
4.1	Použité přístroje a pomůcky	30
4.2	Použité chemikálie.....	30
4.3	Příprava roztoků	31

4.3.1	Roztok kyseliny fosforečné.....	31
4.3.2	Příprava kyseliny octové	31
4.3.3	Roztok mobilní fáze	31
4.3.4	Roztok hydroxidu sodného	33
4.3.5	Roztok 20 % acetonitrilu	33
4.3.6	Zásobní roztok rutinu.....	33
4.3.7	Zásobní roztok diosminu.....	33
4.3.8	Zásobní roztok hesperidinu.....	33
4.3.9	Pracovní roztoky	33
4.3.10	Kalibrační roztoky	33
4.4	Použité vzorky	34
4.4.1	Vzorek z tobolek	34
4.4.2	Vzorky pro určení výtěžnosti	35
4.5	Parametry měření.....	35
4.5.1	Popis přístroje SIC.....	35
4.5.2	Nastavení přístroje a programu	36
5	Výsledky a diskuze	38
5.1	Vývoj analytické metody.....	38
5.1.1	Výběr stacionární fáze	38
5.1.2	Výběr mobilní fáze.....	38
5.1.3	Příprava vzorku	40
5.1.4	Nastavení detektoru	40
5.1.5	Průtoková rychlost.....	41
5.1.6	Objem nástřiku.....	42
5.1.7	Nastavení programu Origin Pro 9	43
5.2	Parametry hodnocení metody	45

5.2.1	Kalibrace a linearita	45
5.2.2	Limit detekce a limit kvantifikace.....	51
5.2.3	Opakovatelnost	52
5.2.4	Výtěžnost	56
5.2.5	Ostatní validační parametry.....	58
5.2.6	Stanovení vzorků	59
6	Závěr	64
7	Citovaná literatura	65
8	Seznam obrázků	70
9	Seznam tabulek	72

1 Úvod

V této práci jsem se zaměřila na analýzu bioflavonoidů obsažených v přípravku Hemostop Probio MAX. Mezi účinky bioflavonoidů se řadí účinky protizánětlivé, gastroprotektivní, antioxidační a venoprotektivní. Pro venoprotektivní vlastnosti se využívá rutin, hesperidin a diosmin.

Pro analýzu byla využita sekvenční injekční chromatografie (SIC). Jedná se o poměrně novou separační analytickou metodu, rozvíjenou zejména na katedře analytické chemie FaF UK. Metoda vznikla zapojením monolitické kolony do přístroje pro sekvenční injekční analýzu (SIA). Dalšími úpravami vznikl přístroj SICromTM II, s kterým jsem pracovala.

SIC dosahuje s využitím stejných kolon podobné separační účinnosti a citlivosti jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). SIC vyniká rychlostí separace, nižší cenovou náročností a nižší spotřebou činidel. Hlavní nevýhodou SIC je málo sofistikované zpracování dat. Software neumožňuje přímé vyhodnocení chromatogramu jako je tomu u HPLC. Data je třeba zpracovat a vyhodnotit v jiném programu, například v MS Excel. V rámci diplomové práce byly vytvořeny postupy pro snazší vyhodnocení dat a pro dosažení nižšího LOD a LOQ. Pro úpravu dat byl použit program Origin Pro 9, který ke korekci šumu používá Savitzky-Golay filtr.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat metodu SIC separaci bioflavonoidů rutinu, hesperidinu a diosminu; následně tuto metodu aplikovat pro analýzu těchto bioflavonoidů obsažených v potravním doplňku Hemostop Probio MAX.

Druhým cílem bylo vytvořit postup pro jednodušší úpravu a vyhodnocení dat získaných prostřednictvím SIC. Díky pokročilejšímu zpracování dat by měla být zvýšena i citlivost a preciznost metody, zároveň by úprava dat měla snížit LOD a LOQ a tím umožnit hodnocení i při velmi malých koncentracích analytu.

Třetím cílem bylo ověřit vhodnost použití SIC systému i při velmi malých koncentracích a při nízkých objemech nástřiku vzorku.

3 Teoretická část

3.1 Bioflavonoidy

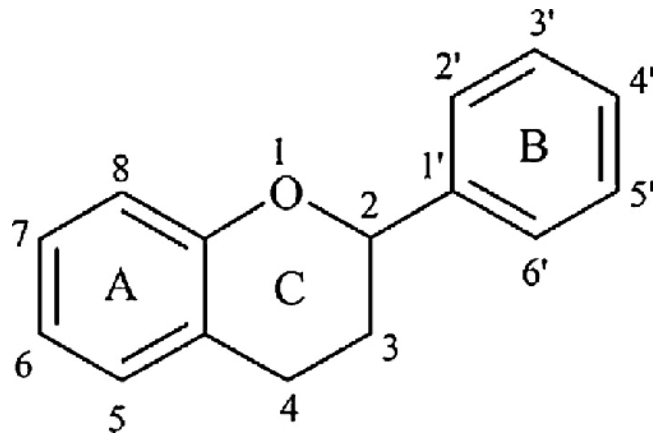
Bioflavonoidy neboli flavonoidy jsou rostlinné sekundární metabolity s širokým spektrem strukturních typů a účinků. Základní strukturou je 2-fenylchroman, který je oxidován za vzniku dalších struktur, konkrétně se jedná o flavony, flavonoly, flavanoly, dihydroflavanoly, flavan-3-oly, flavan-3,4-dioly, chalkony a aurony. Mezi flavonoidy řadíme přes 4000 látek a patří mezi nejrozšířenější sekundární metabolity. Vyskytují se nejčastěji ve formě glykosidů [1–3].

Flavonoidy mají řadu pozitivních účinků na lidský organismus. Působí anfilogisticky, diuretický, některé mohou snižovat krevní tlak a dilatovat cévy. Dále mohou působit spasmolytický, choleretický a cholagogický. Mezi velmi významné vlastnosti patří jejich antioxidační a chelatační působení. Schopnost eliminovat volné kyslíkové radiály a reaktivní formy kyslíku (ROS) má podíl na kardioprotektivním a neuroprotektivním účinku. ROS mají vliv také například na buněčné stárnutí nebo mutagenezi buněk, lze tedy hovořit i o ochraně proti nádorovým onemocněním. Bráněním oxidace lipidů chrání kardiovaskulární systém před oxidačním poškozením. Studie ukazují, že dostatečný příjem flavonoidů snižuje riziko mortality ICHS a incidence IM u starších mužů [1, 2, 4, 5].

Terapeuticky lze flavonoidy využít při infekčních onemocnění jako podpůrné prostředky. Inhibují hyaluronidázu, čímž brání rozšiřování mikrobiálních toxinů a potencují účinek vitamínu C. Hlavním terapeutickým využitím flavonoidů je léčba žilních onemocnění, jako jsou křečové žíly a hemoroidy. Normalizují permeabilitu membrán, odstraňují lomivost kapilár a mají hemoragický a antiedematézní účinek [5]. Těmito vlastnostmi disponují i flavonoidy rutin, diosmin a hesperidin, kterými se v práci zabývám.

Bioflavonoidy podávané perorálně mají obvykle nízkou biodostupnost, která je způsobena jejich velmi malou rozpustností ve vodě a také nestabilitou v kyselém prostředí žaludku, kde dochází k hydrolýze glykosidických vazeb. Zvýšení biodostupnosti lze dosáhnout snížením velikosti částic – mikronizací, a řízeným uvolňováním látky z lékové formy. Výhodnou formou jsou pelety a granuláty, obalené acidorezistentní látkou [6]. Mezi registrované léčivé přípravky využívající mikronizovanou formu

flavonoidů patří například Detralex, Devenal nebo Flebazol. Přípravky obsahují mikronizovaný diosmin a hesperidin [7].



Obrázek 1 – Vzorec 2-fenylchromanu [8]

3.1.1 Rutin

Sumární vzorec: $C_{27}H_{30}O_{16}$

Registrační číslo CAS: 153-18-4

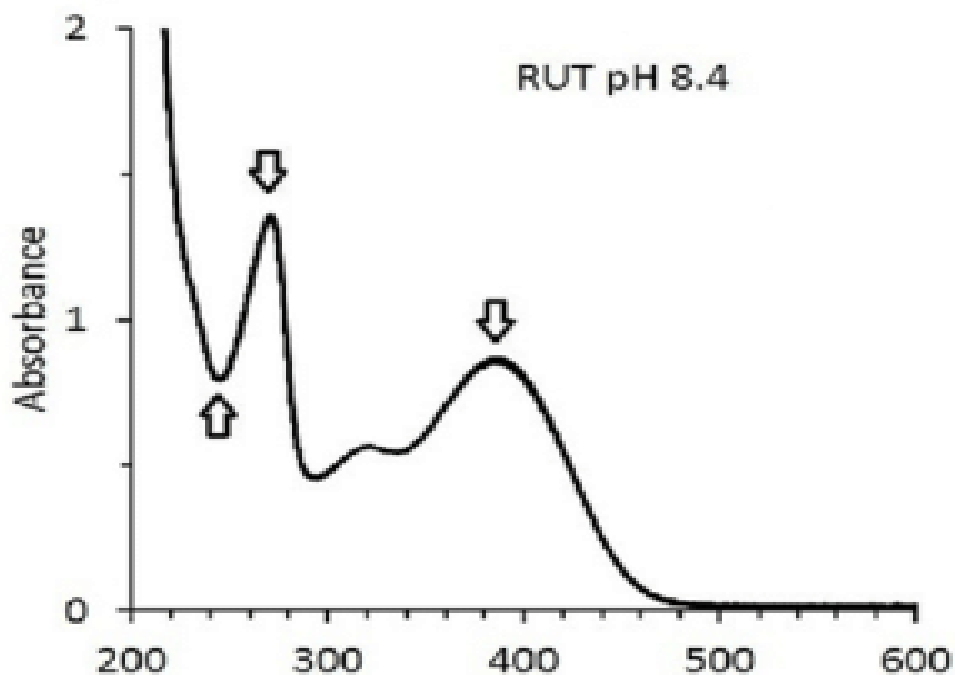
Molární hmotnost: 610,5

Vzhled: Žlutý nebo zelenožlutý krystalický prášek.

pK_A : 6,37; -3,7

LogP: -0,87

Absorpční spektrum: absorpční maximum při 256 nm a 356 nm (pH 3), 271 nm a 385 nm (pH 8,4)

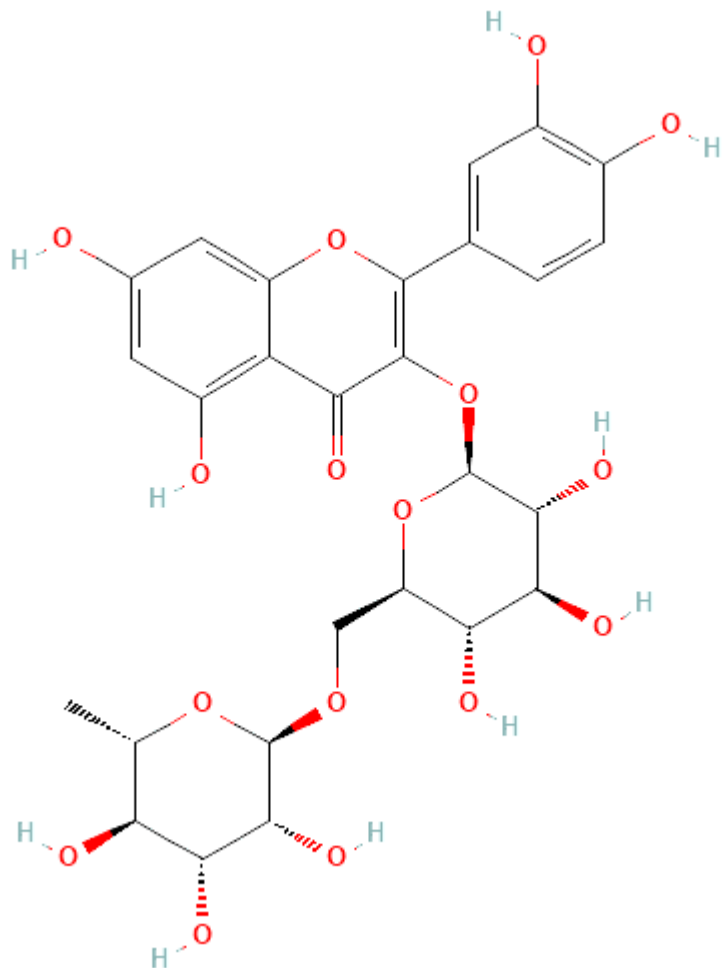


Obrázek 2 – Absorpční spektrum rutinu (upraveno) [9]

Rozpustnost: Prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v methanolu, mírně rozpustný v ethanolu 96 %, prakticky nerozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů [10–12].

Rutin se využívá k léčbě žilní nedostatečnosti, mírné hemoragie spojené s lomivostí kapilár, jako adjuvans při léčbě infekčních onemocnění a alergií. Poprvé byl izolován

z routy vonné (*Ruta graveolens*, *Rutaceae*). Významným zdrojem rutinu je jerlín japonský (*Sophora japonica*, *Fabaceae*), pohanka obecná (*Fagopyrum esculentum*, *Fabaceae*) a blahovičník (*Eucalyptus macrorhyncha*, *Myrtaceae*). Dále se vyskytuje například v oplodí pomeranče, v listech černého rybízu nebo v nati violky [1, 5].



Obrázek 3 – Vzorec rutinu [11]

3.1.2 Diosmin

Sumární vzorec: $C_{28}H_{32}O_{15}$

Registrační číslo CAS: 520-27-4

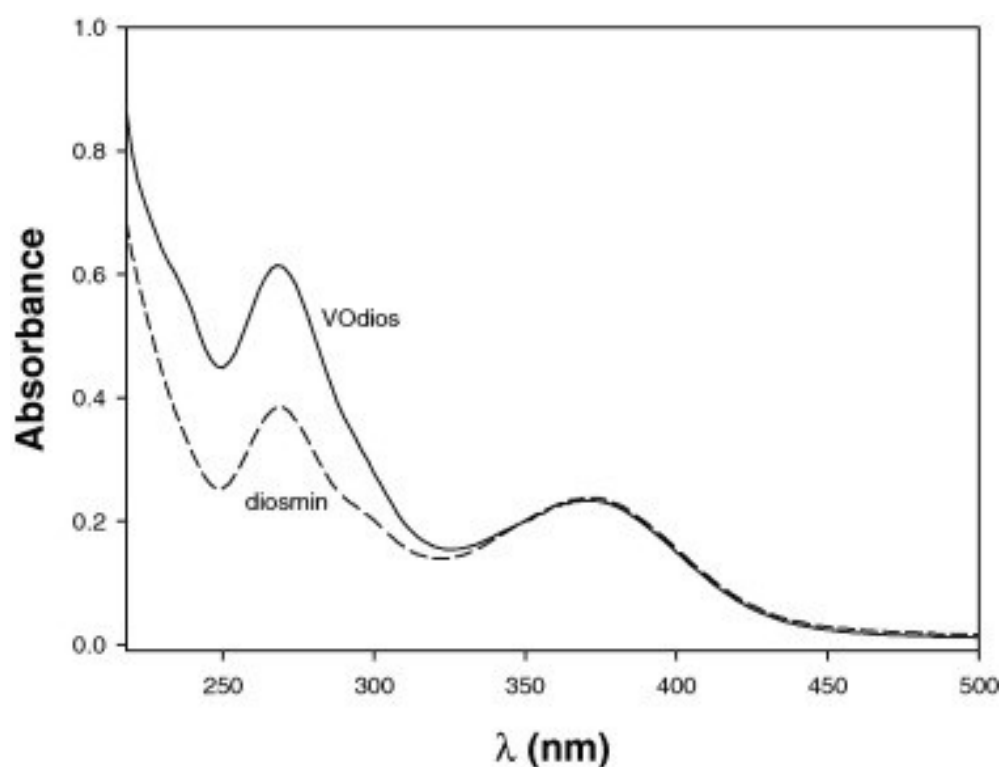
Molární hmotnost: 608,55

Vzhled: Šedožlutý nebo světle žlutý hygroskopický prášek.

pak: 7,31, -3,6

LogP: -0,44

Absorpční spektrum: absorpční maximum při 269 nm a 372 nm

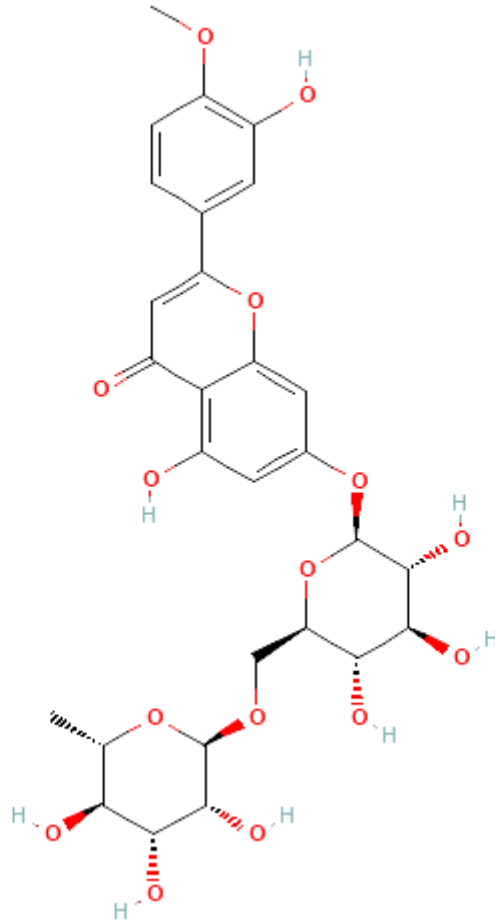


Obrázek 4 – Absorpční spektrum diosminu a jeho komplexu s oxidem vanadičitým [13]

Rozpustnost: Prakticky nerozpustný ve vodě, dobře rozpustný v dimethylsulfoxidu a prakticky nerozpustný v ethanolu 96 %. Rozpouští se ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů [12, 14, 15].

Standardizovaná směs diosminu s hesperidinem se využívá na léčbu žilní nedostatečnosti, lymfatických edémů a hemoroidů. Diosmin se nachází například v kokošce pastuší tobolce (*Capsella bursa pastoris*, *Brassicaceae*) nebo v květu hořkého

pomeranče (*Citrus aurantium*, *Rutaceae*). Z rostlin se diosmin neizoluje, vyrábí se z hesperidinu dehydrogenací [1, 16].



Obrázek 5 – Vzorec diosminu [15]

3.1.3 Hesperidin

Sumární vzorec: $C_{28}H_{34}O_{15}$

Registrační číslo CAS: 520-26-3

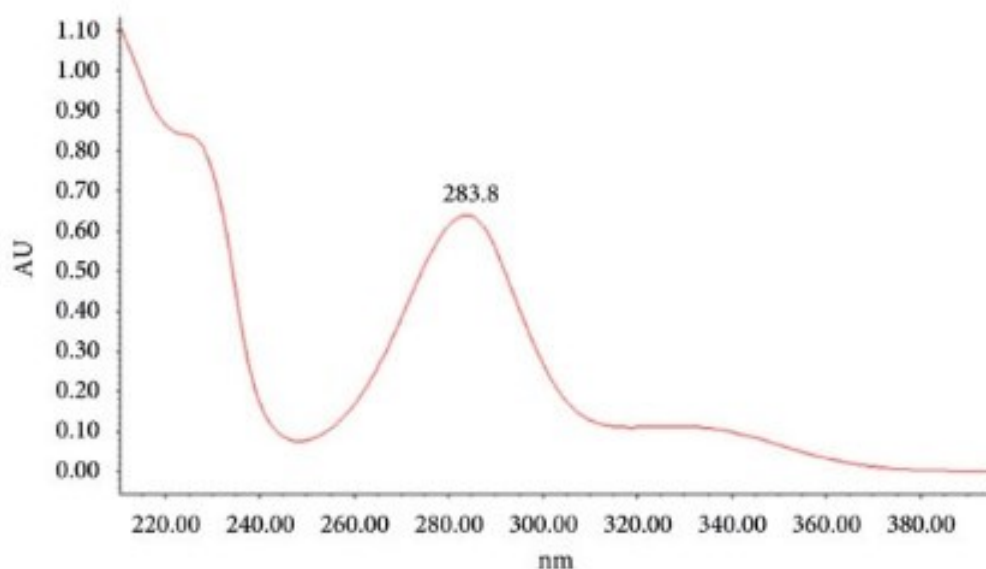
Molární hmotnost: 610,6

Vzhled: Šedožlutý nebo světle žlutý hygroskopický prášek.

pK_A : 8,61, -3,6

LogP: -0,31

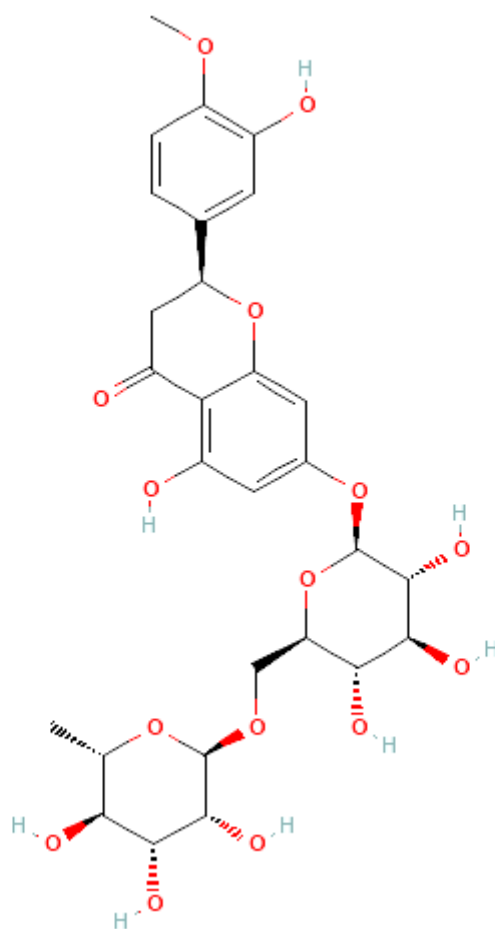
Absorpční spektrum: absorpční maximum při 230 nm a při 283,8 nm



Obrázek 6 – Absorpční spektrum hesperidinu [17]

Rozpustnost: Těžce rozpustný ve vodě a v methanolu [12, 18, 19].

Hesperidin se v kombinaci s vitamínem C využívá na léčbu lomivosti kapilár, při hemoragiích a mírné hypertenzi [1]. Nachází se v oplodí citrusových plodů, konkrétně v oplodí mandarinky (*Citrus reticulata*, *Rutaceae*), hořkého pomeranče (*Citrus × aurantium* L. ssp. *aurantium*, *Rutaceae*) a sladkého pomeranče (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) [16].



Obrázek 7 – Vzorec hesperidinu [19]

3.1.4 Rešerše prací popisující stanovení bioflavonoidů

V tabulce 1 jsou uvedeny příklady metod stanovení flavonoidů rutinu, diosminu a hesperidinu. Kromě HPLC spojené s UV/VIS spektrofotometrií nebo hmotnostní spektrometrií se využívá například elektrochemických metod [20] nebo chemiluminiscence [21].

Rešerše ukázala, že se k separaci často používají kolony s povrchově porézními částicemi, jedná se o kolony s reverzní fází C18 nebo reverzní amidovou fází. Jako mobilní fáze se používá směs metanolu s vodou nebo acetonitrilu s kyselinou mravenčí, octovou nebo fosforečnou. Na základě podmínek z rešerše byla vyvíjena metoda SIC, kdy klíčový byl výběr separační kolony s potřebnou účinností a složení mobilní fáze tak, aby došlo k úplnému rozlišení analytů v co nejmenším čase a s co nejmenší spotřebou mobilní fáze.

Tabulka 1 – Rešerše

Stanov. látky	Přístroj	Kolona	Průtoková rychlost [ml/min]	Mobilní fáze	Detekce	λ [nm]	Zdroj
Diosmin Hesperidin	HPLC	LiChrospher RP-18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μ m)	1,0	A – methanol B – voda 45:55	UV/VIS	280	[22]
Diosmin Hesperidin	SPE- HPLC	Symmetry C18; (250 mm × 3 mm; 5 μ m) předkolona Guard column C18 (5 mm × 4,6 mm)	0,58	Gradientová eluce: A – methanol B – acetonitril C – voda pH 2,5	UV/VIS	285	[23]
Diosmin Hesperidin	HPLC	LiChrospher RP Select B (75 mm × 4 mm, 5 μ m)	1,2	A – kyselina mravenčí pH 4,1 B – methanol 58:42	UV/VIS	280	[24]
Diosmin Hesperidin	HPLC	Symetry R RP-C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μ m)	0,6	A – methanol B – voda 45:55	UV/VIS	346	[25]
Diosmin Hesperidin	HPLC	LiChrosorb RP C18 (250 mm × 4.6 mm, 10 μ m)	1,5	A – methanol B – voda 60:40	UV/VIS	345	[26]
Hesperidin Rutin	HPLC	XBridge BEH C18 (150 mm × 4,6 mm, 3 μ m)	1,0	Gradientová eluce: A – kyselina octová 4% B – acetonitril	UV/VIS	280	[27]
Diosmin Hesperidin Rutin	HPLC	Ascentis Express RP-Amide (100 mm × 3,0 mm, 2,7 μ m)	1,0	A – acetonitril B – acetátový pufr pH 3,0 30:70	UV/VIS	255 283	[28]

Stanov. látky	Přístroj	Kolona	Průtoková rychlost [ml/min]	Mobilní fáze	Detekce	λ [nm]	Zdroj
Diosmin Hesperidin Rutin	HPLC	Kinetex C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μ m)	1,0	A – fosfátový pufr pH 4,0 B – acetonitril 75:25	UV/VIS	275	[29]
Diosmin Hesperidin Rutin	HPLC	Kinetex C18 (50 mm × 2,1 mm, 2,6 μ m)	0,25	Gradientová eluce: A – acetonitril B – kyselina mravenčí (0,1 %)	ESI-MS	-	[30]
Hesperidin Rutin	UHPLC	Chromolith Fast Gradient Monolithic RP-18e (50 mm × 2,0 mm)	1,2; 1,3	Gradientová eluce A – acetonitril B – kyselina trifluoroctová (0,05 %)	UV/VIS	254 280	[31]

3.2 Sekvenční injekční chromatografie

Sekvenční injekční chromatografie je metoda vyvinutá v roce 2003. Vznikla zapojením krátké monolitické kolony do přístroje pro průtokovou metodu sekvenční injekční analýzy SIA. Tato metoda je rozvíjena především na katedře analytické chemie FaF UK.

Základními částmi přístroje jsou obousměrná pístová pumpa, vícecestný selekční ventil, chromatografická kolona a detektor vybavený průtokovou celou.

Principiálně se jedná o metodu s nekontinuálním průtokem, což je hlavní rozdíl proti HPLC. Mobilní fáze i vzorek jsou v několika naprogramovaných krocích (sekvencích) pumpou nasáty do mísící cívky a poté vtlačeny na kolonu a do detekční cely.

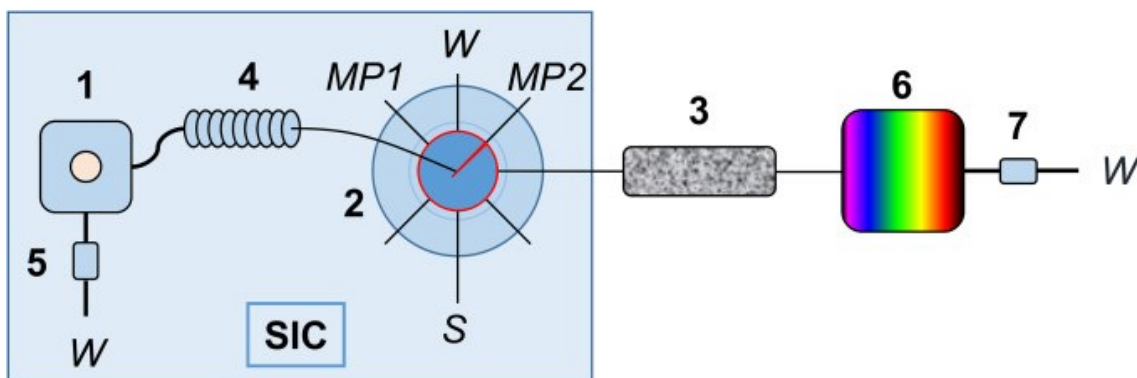
SIC je dobře využitelná pro rychlou chromatografickou analýzu relativně jednoduchých vzorků obsahujících menší počet (2–5) analytů. Přístroj SIC lze využít i pro úpravu vzorku před samotnou chromatografickou separací, pokud vzorek obsahuje nekompatibilní matici nebo nízké koncentrace analytů. Využit můžeme on-line extrakci z kapaliny do kapaliny nebo extrakci na tuhou fázi. Pro další zvýšení selektivity a citlivosti lze využít např. fluorescenční detektor. Přestože byla metoda původně zamýšlena pro jednoduché

analýzy, díky vývoji lze dnes vytvořit podmínky pro gradientovou eluci, nebo získat dvoudimenzionální 2D-SIC zapojením druhé kolony. Díky postupnému vývoji lze do přístroje zapojit delší monolitické, ale i částicové kolony, a tím dále rozšířit separační možnosti.

SIC dosahuje separační účinnosti a citlivosti jako HPLC. Výhodou je rychlost separace, možnost spojení s úpravou vzorku, nízká náročnost na množství vzorku i činidel, miniaturizace, automatizace a relativní jednoduchost (oproti HPLC). Díky nižší spotřebě činidel (a nižší produkci odpadu) se náklady na analýzu mohou snížit až na polovinu. Hlavní nevýhodou metody je nedostatečné uživatelské zázemí pro další vyhodnocení dat. Limitací metody je také síla a objem pumpy, což má vliv na velikost použité kolony a délku analýzy. Také ostatní části přístroje musí být zvoleny tak, aby odolávaly pracovním tlakům minimálně 10 MPa [32–34].

3.2.1 Uspořádání přístroje

Základní součástí přístroje je pístová pumpa a vícecestný ventil. Pumpa pracuje oběma směry, má obvykle objem 4–10 ml a je schopna vyvinout tlak až 1500 psi (10,3 MPa) [33]. Pumpa je napojená na mísící cívku a má pojistný ventil, který chrání pumpu při překročení tlaku 1500 psi. Mísící cívka je dlouhá stočená kapilára s průměrem 0,75 mm a objemem okolo 1 ml. Cívka je napojena na centrální port vícecestného selekčního ventilu. Ventil přepíná mezi několika vedlejšími porty, ze kterých vedou kapiláry do zásobníku s mobilní fází, se vzorky a roztoky standardů, a také do odpadu a do separační kolony. Přes ventil probíhá nasátí mobilní fáze a vzorků na cívku a vtlačení na kolonu. Ventil podle sekvence programu přepíná mezi jednotlivými porty. Na chromatografickou kolonu navazuje průtoková detekční cela ve tvaru Z. Detekce se provádí zpravidla pomocí UV-VIS DAD detektoru [33, 35].



Obrázek 8 – Schéma přístroje SIC [35]

Popis obrázku: 1 – pístová pumpa, 2 – vícecestný selekční ventil, 3 – chromatografická kolona, 4 – mísící cívka, 5 – pojistný ventil pumpy 1500 psi, 6 – detektor, 7 – tlakový ventil 20 psi, MP – mobilní fáze, S – vzorek, W – odpad.

3.2.2 Kolony

Chromatografická kolona využitelná pro separaci sekvenční injekční chromatografií musí generovat nižší zpětný tlak, než kolony běžně používané v HPLC. Tuto podmínku splňují monolitické kolony a kratší kolony s částicemi s tuhým jádrem.

Monolitické kolony byly využívány při vzniku této metody. Jedná se o kolonu tvořenou pevným porézním materiálem, který zaplňuje celý vnitřní prostor kolony. Anorganický monolit obsahuje dva typy pórů: makropóry a mesopóry. Velké póry (makropóry) mají velikost okolo 1 μm . Umožňují rychlou interakci mezi stacionární a mobilní fází. Středně velké póry (mesopóry) s velikostí mezi 2–50 nm mají dostatečně velký povrch a zaručují tak vysokou separační kapacitu. Díky vysoké porositě mají tyto kolony relativně malý odpor a mohou se tak využívat v systémech s nižším tlakem i při vyšších průtokových rychlostech. Monolit může být tvořen také organickým polymerem nebo komprimovaným gelem, ale jejich struktura je tvořena pouze makropóry [36–38].

Kolony s povrchově porézními částicemi, (také core-shell, fused-core nebo solid-core kolony) jsou naplněny částicemi, které jsou tvořeny jádrem a obalem. Jádro je pevné a nepropustné pro mobilní fázi. Je obalené jednou nebo více vrstvami porézního materiálu, který umožňuje interakci s mobilní fází. Velikost částic komerčně dostupných kolon je od 1,3 do 5 μm , poměr velikosti jádra a obalu je různý v závislosti na výrobci. Díky menšímu objemu pórovitého materiálu je převod hmoty mezi stacionární a mobilní

fází rychlejší a dochází tak ke zrychlení analýzy s relativně menším zpětným tlakem [38, 39].

3.3 Odstranění šumu signálu detektoru

Odstranění (filtrování) šumu, neboli vyhlazování, je ve statistice často užívaná metoda určená k úpravě dat. S využitím aproximačních funkcí dochází k zachycení důležitých vzorů, zatímco šum pozadí je snížen/vyhlazen. Funkce vzájemně porovnává hodnoty sousedících signálů a upravuje je. Často využívaným algoritmem je klouzavý průměr, který je vhodný na zachycení dlouhodobých nebo opakujících se jevů. Dalšími metodami jsou například lokální polynomiální regrese, filtr Butterworth, nebo v HPLC často využívaný filtr Savitzky-Golay [40].

3.3.1 Savitzky-Golay filtr

Filtr Savitzky-Golay pracuje na základě polynomiální aproximace metodou nejmenších čtverců. Filtr zachovává šířku (a relativně i výšku) píku původního signálu, při vyhlazení šumu základní linie. Výhodou filtru Savitzky-Golay může být, že nezpůsobuje posun dat při vyhodnocení a nevytváří časové mezery [41].

Pro optimální nastavení parametrů filtru je stěžejní nadefinovat 2 proměnné, které ovlivňují míru vyhlazení grafu. Jedná se o řád polynomu (N) šíře datového okna (M).

Nejvyšší možný řád polynomu je $\frac{1}{2} M$. Čím vyšší řád polynomu je použit, tím věrněji se upravená křivka podobá původní. Dochází tak sice k menšímu zkreslení a chybovosti dat, ale příliš vysoký stupeň může vést k nedostatečnému zjednodušení nebo k neúplnému vyhlazení šumu. Naopak velmi nízký řád může vést k velkému zjednodušení výsledků na úkor přesnosti a zachování profilu původního grafu [41].

Filtr aproximuje data po úsecích $2M + 1$, proto i šíře datového okna ovlivní výsledný graf. Při výběru je třeba pamatovat, že $2M \geq N$. Platí, že čím širší je datové okno (tedy čím více dat je aproximováno), tím většího vyhlazení šumu na základní linii dosáhneme. I v tomto případě může použití filtru změnit profil grafu (například výšku píku), proto není vhodné volit příliš široký úsek [41].

K přesnějšímu zachování profilu píku lze pomoci zvýšením frekvence sběru dat, kdy získáme více záznamů za sekundu. Protože je vrchol píku tvořen více body, při stejném M dojde k nižšímu ovlivnění výšky píku než u záznamu s nižší frekvencí sběru dat.

3.4 Validace analytické metody

Validace je ověřování platnosti analytického postupu. Demonstruje a dokumentuje kvalitu analytické metody stanovením definovaných kritérií a měřením jejich hodnot [42]. Proces validace lze označit za proces, při kterém je určována vhodnost použití daného systému pro získání relevantních dat. Pro správné provedení validace je kritický výběr validačních parametrů [43].

3.4.1 Přesnost metody

Přesnost metody (accuracy), dříve správnost, je těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou. Rozdíl mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou je chyba měření. Rozdíl mezi střední hodnotu výsledků měření (průměr) a přijatou referenční hodnotou je odchylka, neboli bias. Tato odchylka charakterizuje systematickou chybu. Hodnocením správnosti se určuje přítomnost nebo nepřítomnost náhodné soustavné chyby [42]. Uvádí se také výtěžnost v procentech, dle následujícího vzorce:

$$R = \frac{\text{výsledek měření} * 100}{\text{referenční hodnota}} .$$

3.4.2 Preciznost metody

Preciznost metody (precision), dříve přesnost, je definována jako hodnota udávající míru těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky. Závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah k referenční hodnotě. Přesnost metody může být vyjádřena jako opakovatelnost, mezilehlá přesnost nebo reprodukovatelnost [43].

Opakovatelnost metody (repeatability) je definována jako těsnost shody mezi vzájemně nezávislými výsledky při použití téže metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týměž pracovníkem, za použití týchž přístrojů během krátkého časového rozmezí [43].

Opakovatelnost odezvy se vyjadřuje jako odhad relativní směrodatné odchylky RSD v procentech pro řadu následných měření pro nejméně tři nástřiky nebo pro měření porovnávacího roztoku. Vypočítá se podle vzorce:

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

v němž značí:

y_i – jednotlivé hodnoty vyjádřené jako plocha píku, výška píku nebo poměr ploch u metody vnitřního standardu;

\bar{y} – průměr jednotlivých hodnot;

n – počet jednotlivých hodnot [12].

Mezilehlá přesnost metody (intermediate precision) je přesnost měření, které zahrnuje stejný postup měření, stejné místo a opakování měření na stejných/podobných objektech v širším časovém úseku. Obvykle dochází ke změně obsluhy nebo měřicího systému. Hodnotí se relativní směrodatná odchylka [43].

Reprodukovatelnost metody (reproducibility) vyjadřuje těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky získanými měřeními stejného materiálu za různých podmínek (přístroj, místo, čas) se zachováním stejné metody. Hodnotí se relativní směrodatná odchylka [43].

3.4.3 Linearita a rozsah metody

Linearita (linearity) je definována jako schopnost metody poskytnout v daném rozsahu lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu. Je-li předpokládána přímková závislost, je vytvořen kalibrační model a metoda vyhodnocení linearity. Lineární závislost dvou proměnných je vyjádřena vztahem:

$$y = a + bx,$$

kde a je posun na ose y a b je směrnice kalibrační přímky [43].

Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient R . Nabývá hodnot ± 1 , přičemž přímá závislost mezi proměnnými je pravděpodobnější, čím více se koeficient blíží 1 ($R = <0, 1>$). Hodnoty kolem 0 značí, že proměnné lineárně závislé nejsou. Pro hodnocení linearity obvykle platí kritérium $R > 0,9900$ dle Českého lékopisu [43].

Pracovní rozsah je rozmezí hodnot, pro které bylo validací potvrzeno, že je v něm metoda aplikovatelná (byl prokázána přesnost, preciznost, linearita). Provádí se měření vzorků s různou hodnotou obsahu analytu, z dat je vytvořen odpovídající graf, vypočítána

rovnice přímky a korelační koeficient. Rozsah je ohraničen dolní a horní mezí stanovitelnosti [43].

3.4.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (limit of detection, LOD) odpovídá nejnižší koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti (limit of quantification, LOQ) odpovídá koncentraci, při které přesnost a preciznost stanovení dovoluje kvantitativní vyhodnocení. Mez stanovitelnosti musí být vždy součástí lineárního rozsahu metody, obvykle se jedná o první bod kalibrační přímky. LOD a LOQ lze vypočítat například z poměru signálu a šumu, ze směrodatné odchylky odezvy nebo z kalibrační přímky [43]. Pro výpočet z poměru signálu k šumu (S/N) se využívá vzorec:

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

v němž značí:

H – výšku píku odpovídajícího dané složce na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku měřenou od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje ve vzdálenosti rovné nejméně pětinasobku šířky píku v polovině jeho výšky;

h – rozpětí šumu na chromatogramu získaném při slepé zkoušce, sledovaném ve vzdálenosti rovné nejméně pětinasobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného porovnávacího roztoku, a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík [12].

Limit detekce je koncentrace analytu, pro kterou platí $S/N = 3$. Limit kvantifikace je koncentrace poskytující $S/N = 10$ [44].

3.4.5 Selektivita metody

Selektivita (method selectivity) je schopnost metody přesně a precizně analyzovat daný analyt i v přítomnosti interferujících látek, jako jsou příbuzné látky, rozkladné produkty nebo pomocné látky. Je testována porovnáním výsledků měření vzorků standardů a vzorků s maticí [42].

3.4.6 Robustnost

Robustnost (robustness) je míra vlivu proměnných podmínek na výsledek analýzy. Mezi proměnné patří například složení mobilní fáze, použitá kolona nebo stabilita roztoku. Je obtížně hodnotitelná, lze buď slovy vyjádřit poznatky při vývoji nebo hodnotu stanovit experimentálně [43, 44].

3.4.7 Test způsobilosti systému

Test způsobilosti systému (system suitability test, SST) je soubor podmínek, při jejichž splnění platí dříve provedená validace metody. Pokud není uvedeno jinak, SST by měl být proveden vždy na počátku měření, při změně systému nebo při podezření na chybně fungující systém. Měl by obsahovat nejméně dva z následujících parametrů: opakovatelnost nástřiku, rozlišení, faktor symetrie píku, retenční faktor, relativní retence, počet teoretických pater, poměr signálu k šumu [43, 44].

Rozlišení (R_s) popisuje míru separace dvou píků. Vypočítá se podle vzorce:

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

kde $t_{R2} > t_{R1}$,

v němž značí:

t_{R1} a t_{R2} – retenční časy píků;

w_{h1} a w_{h2} – šířky píků v poloviční výšce [12].

Faktor symetrie (A_s) ukazuje symetrii píku. Pakliže je A_s rovna 1, pík je symetrický. Pokud je A_s menší než 1, jedná se o čelní náběh píku, pokud je větší než 1, jedná se o chvostování. Faktor symetrie se vypočítá podle vzorce:

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

v němž značí:

$w_{0,05}$ – šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky;

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky [12].

Počet teoretických pater (N) je parametr pro hodnocení účinnosti kolony. Účinnost kolony ovlivňuje míru rozšiřování elučních zón. Kolona je rozdělena na teoretická patra, v kterých dochází k ustálení rovnováhy mezi analytem navázaným na stacionární fázi a analytem v mobilní fázi. Vyšší počet pater tak umožňuje menší rozmývání zóny píku, a tím značí vyšší účinnost separace. Počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, s kolonou, s teplotou kolony, mobilní fází a retenčním časem. Vypočítá se podle následujícího vzorce:

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

v němž značí:

t_r – retenční čas píku odpovídající dané složce;

w_h – šířku píku v polovině jeho výšky.

Hodnoty t_r a w_h musí být vyjádřeny ve stejných jednotkách [12].

4 Experimentální část

4.1 Použité přístroje a pomůcky

Třepačka Ika M3 basic

Ultrazvuková vana Bandelin Sonorex Digitec

pH metr Shott P1

Analytické váhy Sartorius

Manuálně automatické pipety Brand a Biohit

Magnetická míchačka Ika

Stříkačkové PTFE filtry s průměrem 13 mm, velikost pórů 0,22 μm

Chromatografický systém pro SIC – SICrom II, FIALab

Kolony:

Supelco Ascentis[®] Express F5; 10 cm \times 4,6 mm; 5 μm

Supelco Ascentis[®] Express RP-Amide; 30 mm \times 4,6 mm, 2,7 μm

Merck Chromolith[®] FastGradient RP-18C, 50 mm \times 2 mm

Merck Chromolith[®] HighResolution RP-18C; 50 mm \times 4,6 mm

Phenomenex Kinetex[®] 5 μm EVO C18; 50 \times 4,6 mm

YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm \times 4,6 mm; 5 μm , 8 nm

4.2 Použité chemikálie

Superčistá voda (systém Milli-Q)

Acetonitril LC-MS grade (Merck)

Metanol LC-MS grade (Merck)

Kyselina fosforečná 85 % p.a. (Penta)

Kyselina octová 99 % (Sigma)

NaOH 98 % (Sigma)

DMSO 99,7 % (Sigma)

Rutin 94 % (Sigma)

Diosmin 95 % (Sigma)

Hesperidin 90 % (Fluka)

4.3 Příprava roztoků

4.3.1 Roztok kyseliny fosforečné

Do skleněné lahve s celkovým objemem 500 ml bylo přidáno přibližně 450 ml superčisté vody. Za stálého míchání na magnetické míchačce byla přikapávána kyselina fosforečná, dokud se pH roztoku neustálilo na hodnotě 2,0; respektive na 2,6. Roztok byl skladován při laboratorní teplotě.

4.3.2 Příprava kyseliny octové

Do skleněné lahve s celkovým objemem 500 ml bylo přidáno přibližně 450 ml superčisté vody. Za stálého míchání na magnetické míchačce byla přikapávána kyselina octová, dokud se pH roztoku neustálilo na hodnotě 3,0. Roztok byl skladován při laboratorní teplotě.

4.3.3 Roztok mobilní fáze

Při vývoji metody byly použity 3 druhy mobilní fáze. Příprava mobilní fáze spočívala ve smíchání roztoků uvedených v kapitole 4.3.1 nebo 4.3.2 a acetonitrilu. Každá z těchto mobilních fází byla zkoušena v různých poměrech (rozdílná eluční síla mobilní fáze). Mobilní fáze byla připravována v objemu 200 ml. Poměr složek mobilní fáze a jejich množství použité na přípravu 200 ml mobilní fáze jsou uvedeny v tabulkách 2–4.

Tabulka 2 – Příprava mobilní fáze ACN:PhosA pH 2,0

Poměr ACN a PhosA pH 2,0	Objem použitého roztoku [ml]	
	ACN	PhosA pH 2,0
05:95	10	190
15:85	30	170
18:82	36	164
20:80	40	160
21:79	42	158
22:78	44	156
23:77	46	154
24:76	48	152
25:75	50	150
35:65	70	130
40:60	80	120
50:50	100	100

Tabulka 3 – Příprava mobilní fáze ACN:PhosA pH 2,6

Poměr ACN a PhosA pH 2,6	Objem použitého roztoku [ml]	
	ACN	PhosA pH 2,6
22:78	44	156

Tabulka 4 – Příprava mobilní fáze ACN:AcetA pH 3,0

Poměr ACN a AcetA pH 3,0	Objem použitého roztoku [ml]	
	ACN	AcetA pH 3,0
18:82	36	164

4.3.4 Roztok hydroxidu sodného

Roztok hydroxidu sodného byl připraven o molární koncentraci 0,1 mol/l rozpuštěním 0,2 g NaOH v 50 ml superčisté vody. Roztok byl skladován v plastové zkumavce za laboratorní teploty.

4.3.5 Roztok 20 % acetonitrilu

Acetonitril byl smísen se superčistou vodou v poměru 20:80. Roztok byl uchováván v plastové zkumavce za laboratorní teploty.

4.3.6 Zásobní roztok rutinu

Zásobní roztok rutinu byl zhotoven v koncentraci 1 mg/ml. 1 mg rutinu byl rozpuštěn v 1 ml 100 % metanolu. Zásobní roztok byl uchováván ve skleněné vialce v lednici.

4.3.7 Zásobní roztok diosminu

Zásobní roztok diosminu byl zhotoven v koncentraci 2 mg/ml. 2 mg diosminu byly rozpuštěny v 1 ml 0,1 molárním nebo 1,0 molárním hydroxidu sodném.

Zásobní roztok (D₂ – D₅) byl zhotoven v koncentraci 1, 2, 5, 10 mg/ml rozpuštěním příslušné navážky diosminu v 1 ml dimethylsulfoxidu.

Zásobní roztoky byly uchovávány ve skleněné vialce v ledničce.

4.3.8 Zásobní roztok hesperidinu

Zásobní roztok hesperidinu byl zhotoven v koncentraci 1 mg/ml. 1 mg hesperidinu byl rozpuštěn v 1 ml 100 % metanolu. Zásobní roztok byl uchováván ve skleněné vialce v ledničce.

4.3.9 Pracovní roztoky

Pracovní roztoky byly připravovány v koncentračním rozmezí 1–150 µg/ml. Roztoky byly připraveny naředěním zásobních roztoků 20 % acetonitrilem. Roztoky byly připraveny vždy v den měření, z důvodu nízké stability flavonoidů.

4.3.10 Kalibrační roztoky

Roztoky byly připraveny za účelem určení linearity, meze detekce a meze stanovitelnosti metody. Kalibrační křivka byla tvořena osmi roztoky s následující koncentrací flavonoidů: 5 (KR₁), 10 (KR₂), 15 (KR₃), 25 (KR₄), 40 (KR₅), 60 (KR₆), 100 (KR₇) a 150 (KR₈) µg/ml. Pro

ověření vlivu korekce šumu byl vytvořen roztok o koncentraci 1 µg/ml. Na přípravu roztoků byly použity zásobní roztoky jednotlivých flavonoidů, ředěné 20 % acetonitrilem.

Příprava jednotlivých roztoků probíhala do mikrozkušavek s celkovým objemem 1 ml, tímto postupem: při přípravě KR₈ (150 µg/ml) napipetováno 150 µl zásobního roztoku rutinu, 150 µl zásobního roztoku hesperidinu, 75 µl zásobního roztoku diosminu a 625 µl 20 % acetonitrilu. V tabulce 5 je zaznamenána příprava kalibračních roztoků KR₁ až KR₇. Kalibrační roztoky byly připraveny v den měření a byly uchovány v ledničce.

Tabulka 5 – Ředění kalibračních roztoků KR₁ – KR₇

Připravované KR a jeho koncentrace [µg/ml]	Objem koncentrovanějšího KR [ml]	Objem 20 % acetonitrilu [ml]
KR ₇ ; 100	667 KR ₈	333
KR ₆ ; 60	600 KR ₇	400
KR ₅ ; 40	667 KR ₆	333
KR ₄ ; 25	625 KR ₅	375
KR ₃ ; 15	600 KR ₄	400
KR ₂ ; 10	667 KR ₃	333
KR ₁ ; 5	500 KR ₂	500

4.4 Použité vzorky

4.4.1 Vzorek z tobolek

Pro přípravu vzorku byly použity tobolky Hemostop Probio MAX, vyráběné společností Simply You Pharmaceuticals a.s. Balení obsahuje 90 tobolek, jedna tobolka obsahuje 450 mg diosminu/hesperidinu (90:10), 20 mg rutinu. Dále obsahuje 60 mg inulinu, 60 mg vitamínu C, 15 mg sušené nati/listu dobromysli (*Origanum vulgare*) a 4,5 mg vitamínu E. Hmotnost obsahu jedné tobolky je průměrně 0,71 g.

Obsah tří tobolek byl důkladně smíchán, ze směsi bylo naváženo 6 navážek po 50 mg. Každá navážka byla rozmíchána v 2,5 ml 0,1 M hydroxidu sodného, vložena do ultrazvukové vany po dobu pěti minut. Poté bylo přidáno 2,5 ml 100 % metanolu a opět vloženo na pět minut do ultrazvukové vany. Roztok byl přefiltrován pomocí injekční

stříkačky, na jejíž konec byl umístěný PFTE filtr s velikostí pórů 0,22 μm . Filtráty byly připraveny v den měření a byly uchovány v ledničce.

4.4.2 Vzorky pro určení výtěžnosti

Pro určení výtěžnosti bylo potřeba připravit roztok standardů, roztok vzorku z tobolek a roztok obsahující standardy i vzorek z tobolek.

Roztok standardů byl připraven v koncentraci 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ze zásobních roztoků jednotlivých flavonoidů (kapitoly 4.3.6–4.3.8) naředěním 20 % acetonitrilem.

Roztok vzorku z tobolek (filtrát) byl připraven postupem popsáním v kapitole 4.4.1. 20 μl filtrátu bylo zředěno do objemu 1 ml 20 % acetonitrilem.

Směs roztoku standardů a roztoku vzorku z tobolek byla připravena smícháním výše uvedených roztoků v poměru 1:1.

Všechny vzorky byly připraveny v den měření a byly skladovány v ledničce.

4.5 Parametry měření

4.5.1 Popis přístroje SIC

Metoda byla vyvinuta na chromatografickém přístroji pro SIC, SICrom II (FIALab). Přístroj je tvořen injekční pumpou NeMESYS 1000N s celkovým objemem 5,0 ml, mísící cívkou tvořenou PEEK kapilárou s vnitřním průměrem 0,75 mm, vícecestnými ventily VICI Cheminert a detektorem. Využívaný vícecestný ventil má 8 portů, na které byly napojeny PEEK kapiláry. Port číslo 1 vedl do odpadu, port 2 a 3 vedl do zásobníku s mobilními fázemi (pro potřeby této práce byl využit pouze port 2), port 4 a 5 byl určen pro vzorek (pro potřeby této práce byl využit pouze port 5), port 7 vedl mobilní fázi do kolony a port 8 byl zaslepen. Výstup z kolony je PEEK kapilárou (100 mm \times 0,25 mm) napojen na průtokovou detekční Z-celu s délkou 10 mm a vnitřním objemem 6 μl . Do přístrojového uspořádání byl zapojen spektrofotometrický FLAME-T-UV-VIS detektor (Ocean Optics) a jako zdroj záření UV-VIS sloužil DH-200 (Ocean Optics). Záření bylo přenášené optickým kabelem s jádrem o průměru 600 μm . Systém byl řízen počítačovým softwarem SIAsoft (FIALab).

4.5.2 Nastavení přístroje a programu

Výsledné podmínky použité pro současnou separaci flavonoidů rutinu, diosminu a hesperidinu jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6 – Výsledné podmínky validované metody

Kolona	YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm
Mobilní fáze	Acetonitril a kyselina fosforečná pH 2,0; 25:75
Nastavení detektoru	Vlnové délky 215, 226, 250, 280, 350; frekvence sběru dat 20 Hz
Průtoková rychlost	10 μl/s
Objem nástřiku	5 μl
Délka analýzy	7,88 min

Program SIAsoft umožňuje naprogramování sekvencí analýzy. Je možné upravovat parametry jako jsou rychlost nástřiku a objem mobilní fáze, rychlost nástřiku a objem vzorku, rychlost průtoku, vlnová délka detektoru a prodleva mezi úlohami. Výsledné nastavení programu je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 7 – Výsledné nastavení programu SIAsoft

Úloha	Jednotka	Parametry úlohy
Nasávání mobilní fáze	Ventil 1 Pumpa	Port č. 2 – zásobník MF Rychlost 70 $\mu\text{l/s}$ Objem 4000 μl Prodleva 4 sekundy
Nasávání vzorku	Ventil 1 Pumpa	Port č. 5 – zásobník MF Rychlost 10 $\mu\text{l/s}$ Objem 5 μl
Separace	Ventil 1 Pumpa Detektor	Port č. 7 - kolona Rychlost 10 $\mu\text{l/s}$ Objem 4005 μl Vlnové délky 215, 226, 250, 280, 350 nm

Nastavení programu Origin Pro 9 bylo následující: polynom řádu $N = 2$; šíře datového okna $M = 25$.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Vývoj analytické metody

5.1.1 Výběr stacionární fáze

Mezi testovanými kolonami byly kolony monolitické i kolony s povrchově porézními částicemi. Jako nejvhodnější se ukázala kolona *YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm*, která byla dostatečně účinná a vykazovala úplnou separaci analytů s minimálním prodloužením doby analýzy oproti ostatním kratším kolonám.

Monolitické kolony *Merck Chromolith® FastGradient RP-18C; 50 mm × 2 mm* a *Merck Chromolith® HighResolution RP-18C; 50 mm × 4,6 mm* neposkytovaly dostatečnou separační účinnost pro separaci rutinu a diosminu.

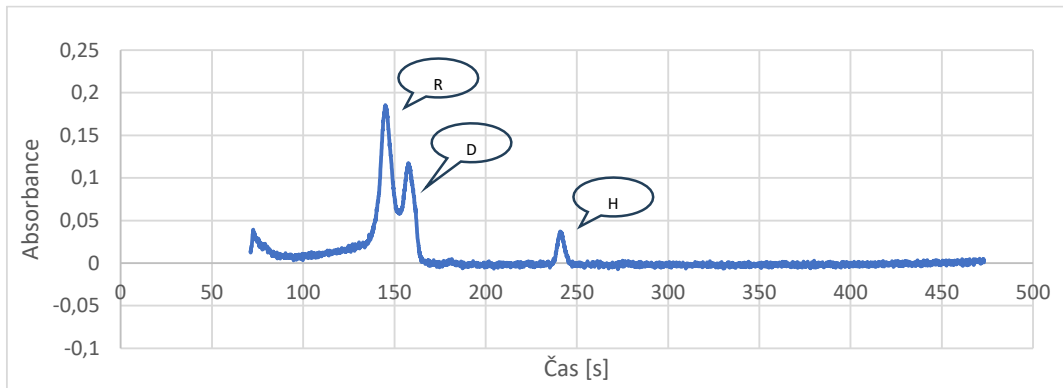
Kolona *Phenomenex Kinetex® 5 μm EVO C18; 50 × 4,6 mm* nevykazovala žádné rozlišení píku diosminu a hesperidinu. Kolona *Supelco Ascentis® Express RP-Amide; 30 mm × 4,6 mm, 2,7 μm* byla zkoušena kvůli selektivitě k fenolickým látkám. Úplná separace píku rutinu a hesperidinu nebyla dosažena. Kolona byla zkoušena při analýze s dimethylsulfoxidem, který ovlivnil průběh analýzy. Aby se snížil vliv píku dimethylsulfoxidu (který se eluoval jako první), byly zkoušeny delší kolony. Při zkoušení kolony *Supelco Ascentis® Express F5; 10 cm × 4,6 mm; 5 μm* se výrazně prodloužil čas analýzy (15 minut), analyty se eluovaly první polovině analýzy a hesperidin s diosminem nebyly dostatečně separovány.

5.1.2 Výběr mobilní fáze

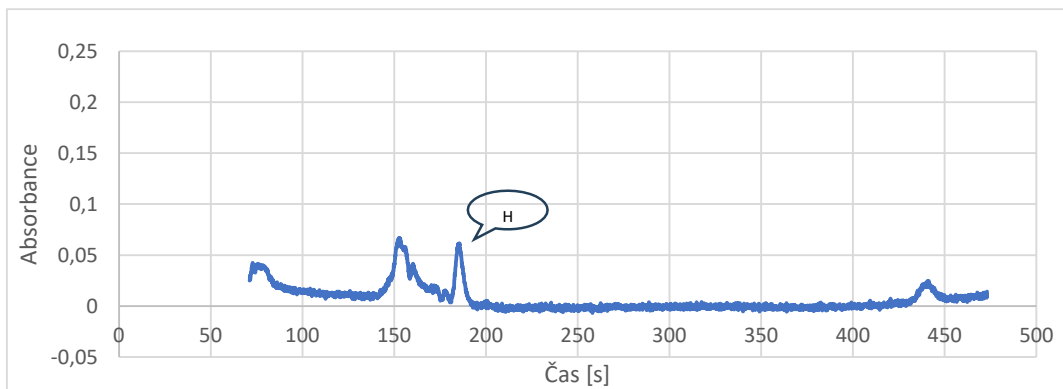
Při optimalizaci byly zkoušeny mobilní fáze složené z kyseliny fosforečné nebo octové a acetonitrilu v poměrech uvedených v kapitole 4.3.3. Kyselina fosforečná byla připravena s hodnotou pH 2,0 a 2,6. Při zvýšení pH kyseliny fosforečné došlo k minimálnímu opoždění eluce (10 sekund při celkové délce analýzy 9,5 minut), rozlišení píků se neměnilo. Při použití kyseliny octové pH 3,0 došlo k mírnému zvýšení retence píků (25 sekund, při délce analýzy 9,5 minuty) oproti kyselině fosforečné pH 2,0.

Eluční síla mobilní fáze byla za výsledných podmínek testována v rozsahu od 20:80 do 50:50. Při vyšším obsahu acetonitrilu se analyty eluovaly blízko mrtvému času, nebyly dostatečně separované. Při použití slabší mobilní fáze (např 21:79) byly analyty eluovány ve vysokém retenčním času (ke konci analýzy) a píky byly širší. Následující

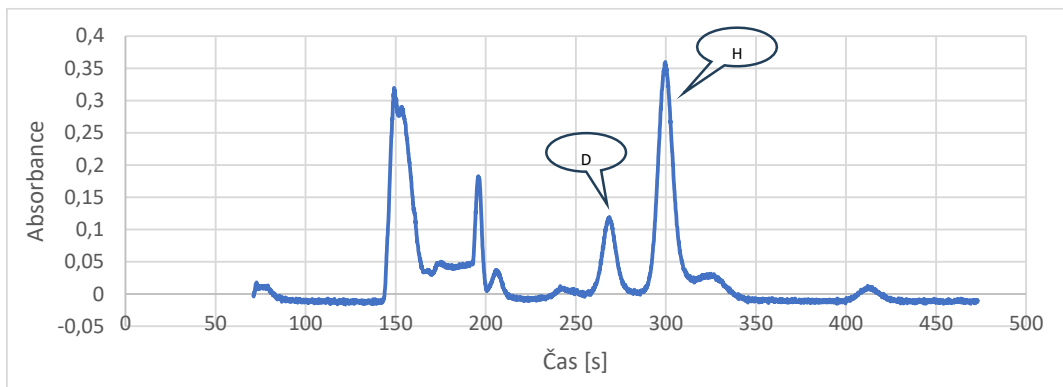
chromatogramy ukazují vliv eluční síly mobilní fáze na retenční časy analytů. Jako nejvhodnější byla zvolena mobilní fáze acetonitrilu s kyselinou fosforečnou pH 2,0 v poměru 25:75.



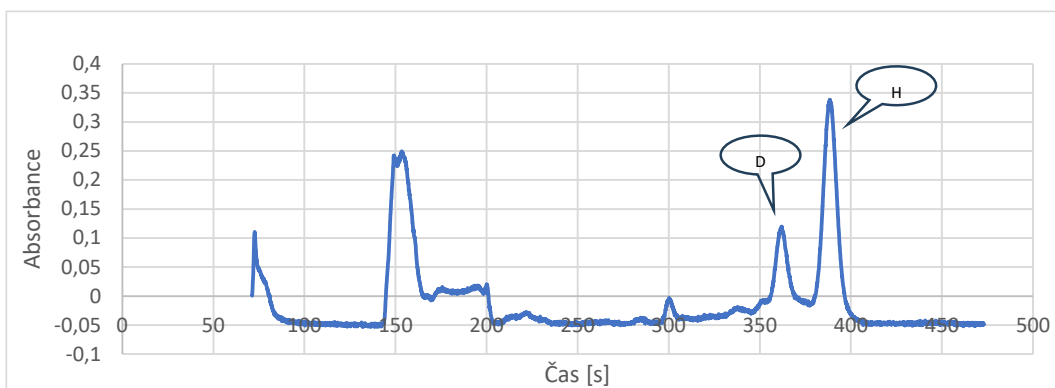
Obrázek 9 – Roztok o koncentraci 10 µg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 50:50; nástřik 5 µl; $\lambda = 215$ nm



Obrázek 10 – Roztok o koncentraci 10 µg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 35:65; nástřik 5 µl; $\lambda = 215$ nm



Obrázek 11 – Roztok o koncentraci 100 µg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 µl; $\lambda = 215$ nm



Obrázek 12 – Roztok o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm \times 4,6 mm; 5 μm , 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 21:79; nástřik 5 μl ; $\lambda = 215 \text{ nm}$

5.1.3 Příprava vzorku

Rutin lze rozpustit v metanolu, acetonitrilu nebo v alkalickém roztoku hydroxidu. Metanol byl zvolen jako rozpouštědlo nejbližší separačním podmínkám.

Diosmin může být snadno rozpuštěn v dimethylsulfoxidu. Ale DMSO významně ovlivňuje průběh analýzy tím, že tvoří pík v mrtvém čase separace. Ulpívá v kapilárách i na koloně a velmi špatně se vymývá. Významně absorbuje až do 268 nm, a tím také vytváří zvýšené pozadí základní linie. Zvýšení koncentrace zásobního roztoku (1, 2, 5, 10 mg/ml), a tím i snížení objemu DMSO ve výsledném vzorku, nesnížilo míru vlivu. V methanolu ani acetonitrilu se diosmin nerozpouští. Jako nejvhodnější byl vybrán roztok hydroxidu sodného. Pro rozpuštění byla dostačující koncentrace 0,1 M, která oproti 1 M roztoku méně zatěžuje kolonu a přístroj.

Hesperidin je možné rozpustit v metanolu i acetonitrilu.

5.1.4 Nastavení detektoru

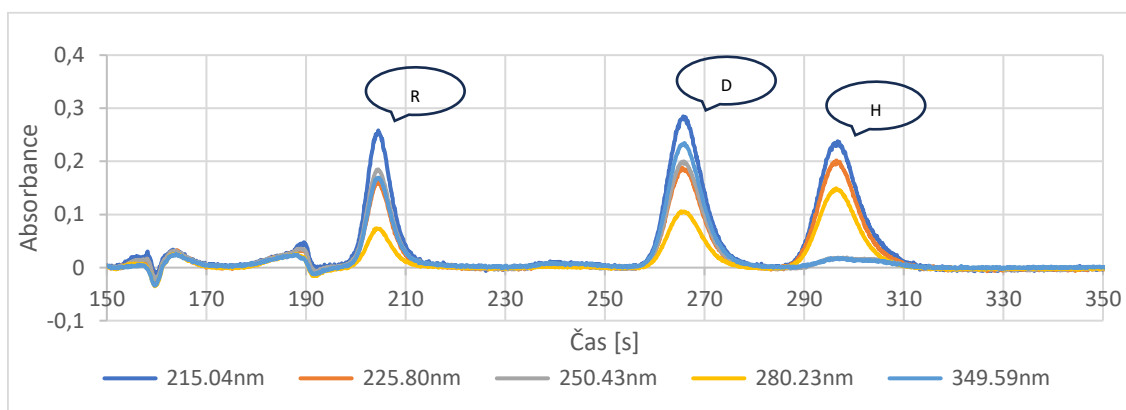
Vlnová délka pro detekci byla volena dle absorpčních maxim a minim tak, aby byla možná současná detekce a identifikace všech analytů. Byly zvoleny tyto vlnové délky: 215 nm, 226 nm, 250 nm, 280 nm, 350 nm. Frekvence zaznamenávání byla 8 Hz nebo 20 Hz. Zvýšením frekvence bylo dosaženo přesnějšího záznamu.

Rutin vykazoval absorpční maxima při 226 nm, 250 nm a 350 nm; sníženou absorbanci při 280 nm.

Diosmin vykazoval absorpční maxima při 250 nm a 350 nm; sníženou absorbanci při 225 nm a 280 nm.

Hesperidin vykazoval absorpční maxima při 226 nm a 280 nm; minimum při 250 nm a 350 nm.

Pro optimalizaci, validaci a kvantifikaci byla zvolena vlnová délka 215 nm, při které vykazovaly absorbanci všechny analyty. Ostatní vlnové délky byly zvoleny pro snazší identifikaci píků.



Obrázek 13 – Absorbance analytů při vybraných vlnových délkách; roztok o koncentraci 100 µg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 µl; chromatogram byl upraven pro lepší znázornění, celková délka analýzy byla 7,9 minut.

5.1.5 Průtoková rychlost

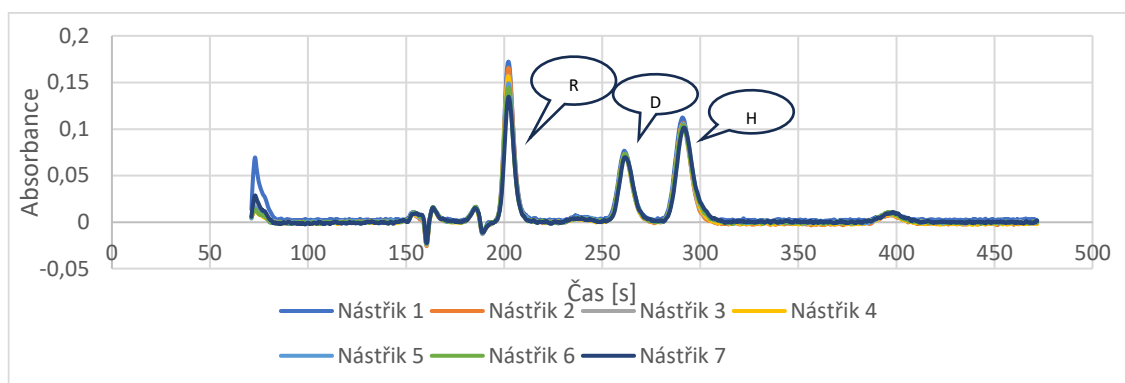
Nastavení průtokové rychlosti se odvíjí od typu a délky použité kolony. Pro monolitické kolony může být použita vyšší průtoková rychlost. Díky tomu je celková délka analýzy kratší. Nastavení průtokové rychlosti pro jednotlivé kolony je v tabulce 8.

Tabulka 8 – Nastavení průtokové rychlosti kolon

Kolona	Průtoková rychlost [$\mu\text{l}/\text{sec}$]
Merck Chromolith® FastGradient RP-18C; 50 mm \times 2 mm	15
Merck Chromolith® HighResolution RP-18C; 50 mm \times 4,6 mm	15
Supelco Ascentis® Express F5; 10 cm \times 4,6 mm; 5 μm	8; 5
Supelco Ascentis® Express RP-Amide; 30 mm \times 4,6 mm, 2,7 μm	8
Phenomenex Kinetex® 5 μm EVO C18; 50 \times 4,6 mm	8
YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm \times 4,6 mm; 5 μm , 8 nm	10

5.1.6 Objem nástřiku

Při vývoji metody byly zkoušeny objemy nástřiku 10 μl , 5 μl , 3 μl , 2 μl a 1 μl . Pro objem nástřiku 2 μl byla změřena opakovatelnost nástřiku při koncentraci 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$. Byla prokázána velmi dobrá opakovatelnost i při malém objemu nástřiku. Relativní směrodatná odchylka rutinu odpovídala jeho rozkladu v čase. Opakovatelnost pro výsledný zvolený objem nástřiku (5 μl) je uvedena v kapitole 5.2.3.



Obrázek 14 – Opakovatelnost objemu nástřiku 2 μl ; překryv chromatogramů KR₇; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm \times 4,6 mm; 5 μm , 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl ; $\lambda = 215 \text{ nm}$

Tabulka 9 – Opakovatelnost pro objem nástřiku 2 μ l, koncentrace 100 μ g/ml

KR ₇ (100 μ g/ml)	Rutin	Diosmin	Hesperidin
Retenční čas	3,37	4,36	4,86
SD	0,0013	0,0044	0,0024
RSD (%); n = 7	0,04	0,10	0,05
Plocha pod píkem	9,1648	6,2508	10,295
SD	0,7414	0,2693	0,3372
RSD (%); n = 7	8,09	4,22	3,28
Výška píku	0,1543	0,0709	0,1043
SD	0,0119	0,0013	0,0029
RSD (%); n = 7	7,69	1,89	2,77

5.1.7 Nastavení programu Origin Pro 9

Program Origin Pro 9 využívá filtru Savitzsky-Golay ke korekci šumu. Pro úpravu dat byl zvolen řád polynomu $N = 2$; pro šíři datového okna byly zkoušeny hodnoty $M_1 = 25$ a $M_2 = 50$.

V tabulkách 10 a 11 jsou porovnány hodnoty vypočítané z původních dat a z dat, která prošly korekcí šumu. Pro porovnání byla použita data z měření roztoku standardů o koncentraci 1 μ g/ml, objem nástřiku 10 μ l.

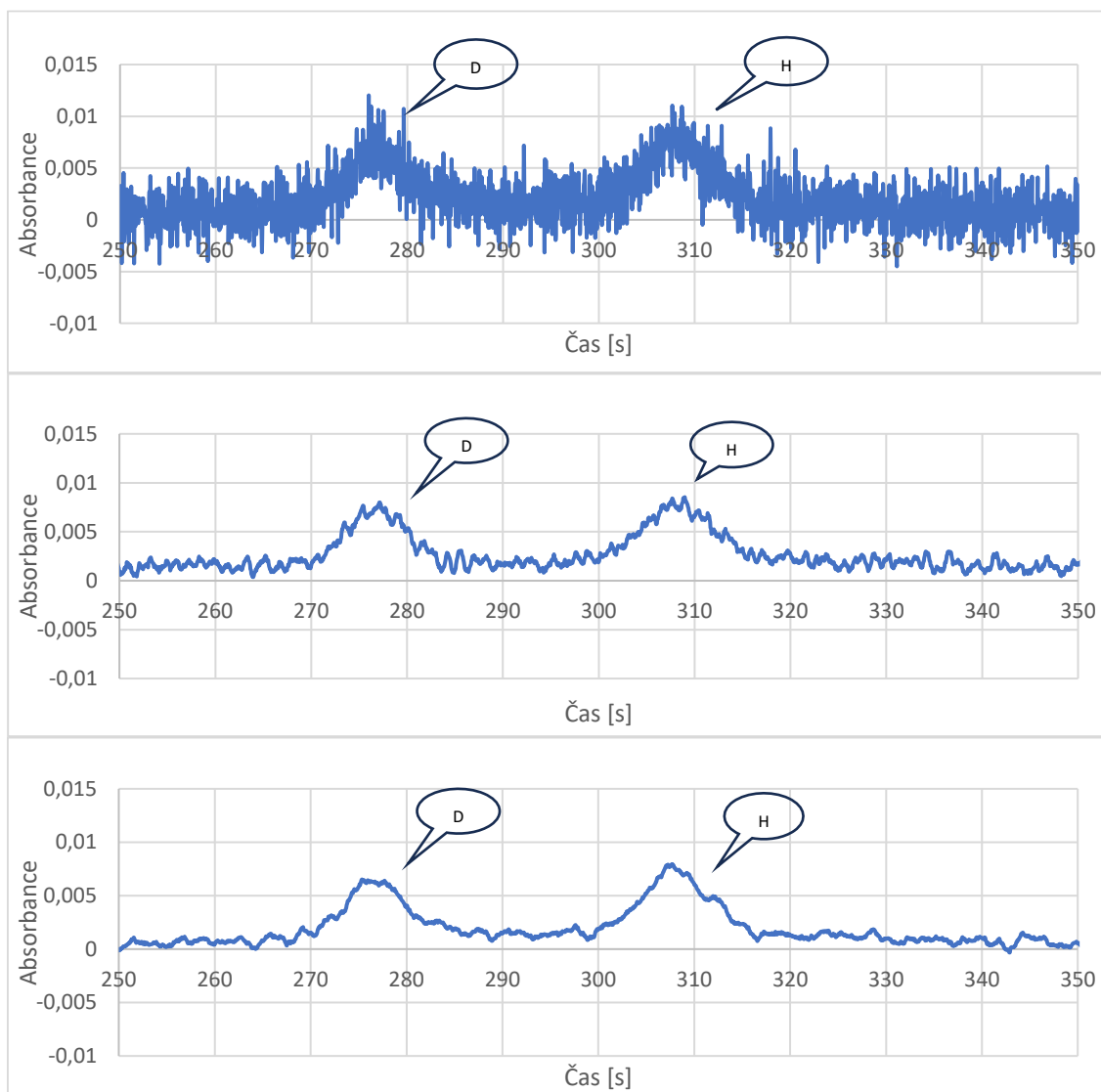
Z hodnot vyplývá, že korekce šumu významně snížila mez kvantifikace. Bylo možné kvantifikovat výsledky, u kterých by to bez korekce šumu nebylo možné. Relativní směrodatná odchylka byla pro M_1 i M_2 velmi dobrá. Pro výsledné nastavení bylo použito $M_1 = 25$, které zpřesní výsledky bez případného snížení výšky píku.

Tabulka 10 – Porovnání hodnot plochy pod píkem pracovních roztoků o koncentraci 1 µg/ml vypočítaných z původních dat a z dat, která prošla korekcí šumu

Plocha pod píkem	Rutin (3,44 min)	Diosmin (4,61 min)	Hesperidin (5,14 min)
Průměr (původní data)	0,2699	1,1026	1,5012
SD (původní data)	0,1951	0,2562	0,3010
RSD; n = 3 (původní data)	72,30 %	23,23 %	20,05 %
Průměr (M ₁ = 25)	0,2135	0,8806	1,2118
SD (M ₁ = 25)	0,0118	0,0713	0,1039
RSD; n = 3 (M₁ = 25)	5,51 %	8,09 %	8,57 %
Průměr (M ₂ = 50)	0,3817	1,1456	1,5096
SD (M ₂ = 50)	0,0268	0,0115	0,0218
RSD; n = 3 (M₂ = 50)	7,02 %	1,01 %	1,44 %

Tabulka 11 – Porovnání hodnot výšky píků pracovních roztoků o koncentraci 1 µg/ml vypočítaných z původních dat a z dat, která prošla korekcí šumu

Výška píku	Rutin (3,44 min)	Diosmin (4,61 min)	Hesperidin (5,14 min)
Průměr (původní data)	0,070	0,0102	0,0115
SD (původní data)	0,0011	0,0023	0,0011
RSD; n = 3 (původní data)	15,26 %	22,79 %	20,05 %
Průměr (M ₁ = 25)	0,0037	0,0062	0,0069
SD (M ₁ = 25)	0,0002	0,0003	0,0003
RSD; n = 3 (M₁ = 25)	6,44 %	5,50 %	4,80 %
Průměr (M ₂ = 50)	0,0042	0,0054	0,0061
SD (M ₂ = 50)	0,0003	0,0003	0,0003
RSD; n = 3 (M₂ = 50)	6,15 %	6,43 %	5,02 %



Obrázek 15 – Porovnání původního chromatogramu (první shora) a chromatogramů získaných korekcí šumu $M_1 = 25$ (druhý shora) a $M_2 = 50$ (spodní); roztok o koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$; YMC-Triart C18 ExRS; $100 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$, 8 nm ; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik $10 \mu\text{l}$; $\lambda = 215$; chromatogramy byly upraveny (výřez) pro lepší znázornění, celková délka analýzy byla 7,9 minut.

5.2 Parametry hodnocení metody

5.2.1 Kalibrace a linearita

Kalibrační křivka musí být tvořena alespoň pěti body. Kalibrační křivka byla vytvořena výsledky měření KR₁ až KR₈, tedy $5 \mu\text{g/ml}$ až $150 \mu\text{g/ml}$. Každá koncentrace byla měřena třikrát. Odezvy získané v programu SIAssoft byly upraveny v programu Origin Pro 9, který

využívá k úpravě dat filtr Savitzsky-Golay. Upravená data byla zpracována a vyhodnocena v programu Microsoft Excel.

Kalibrační roztoky byly připraveny ze zásobních roztoků s přesnou koncentrací: rutin 0,99 mg/ml, diosmin 1,98 mg/ml a hesperidin 1,05 mg/ml.

Tabulka 12 – Přesné koncentrace kalibračních roztoků

KR	Koncentrace rutinu [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace diosminu [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Koncentrace hesperidinu [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
KR ₁	4,95	4,95	5,25
KR ₂	9,90	9,90	10,50
KR ₃	14,85	14,85	15,75
KR ₄	24,75	24,75	26,25
KR ₅	39,60	39,60	42,00
KR ₆	59,40	59,40	63,00
KR ₇	99,00	99,00	105,00
KR ₈	148,50	148,50	157,50

Rutin se eluoval jako první z analytů, v čase 3,40 minuty. Korelační koeficient r splňuje podmínku $r \geq 0,99$, konkrétně $r = 0,9952$ pro plochu pod píkem a $r = 0,9951$ pro výšku píku.

Kalibrační křivka rutinu byla tvořena kalibračními body KR₁ až KR₅. Bylo tak zvoleno z důvodu zvýšení linearitu v nízkých koncentracích, v kterých se rutin v hodnoceném vzorku pohyboval.

Tabulka 13 – Vypočítané hodnoty plochy pod píkem rutinu (retenční čas 3,40 min)

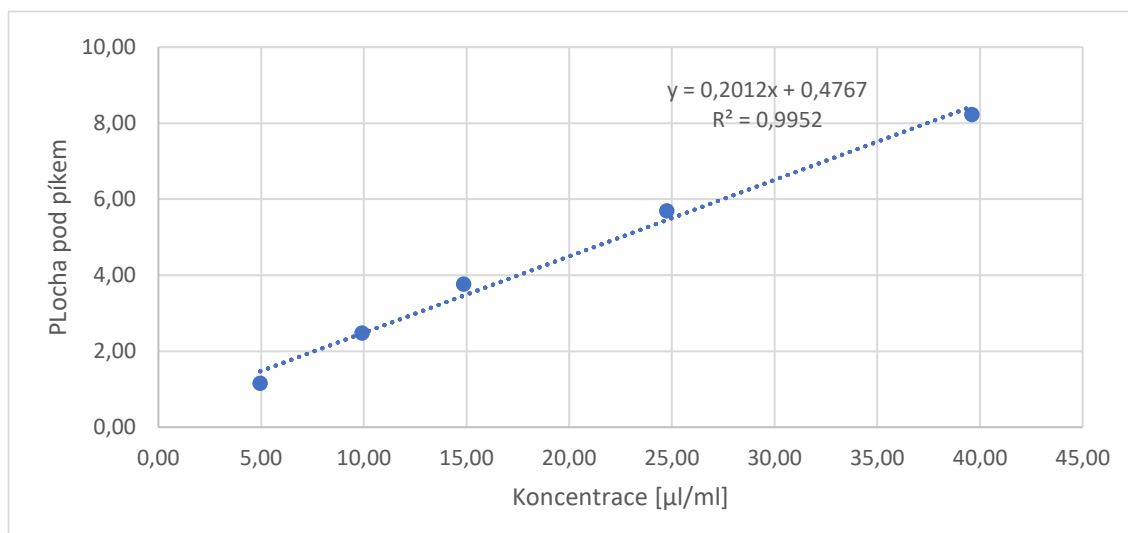
Koncentrace [µg/ml]	Nástřik 1 (plocha)	Nástřik 2 (plocha)	Nástřik 3 (plocha)	Nástřik průměr (plocha)	RSD (%) n = 3
4,95	1,2020	1,2264	1,0306	1,1530	7,56
9,90	2,5221	2,4270	2,4759	2,4750	1,57
14,85	3,7299	3,7391	3,8204	3,7631	1,08
24,75	5,7194	5,9782	5,3772	5,6916	4,32
39,60	8,2630	8,1663	8,2366	8,2220	0,50

Tabulka 14 – Vypočítané hodnoty výšky píku rutinu (retenční čas 3,40 min)

Koncentrace [µg/ml]	Nástřik 1 (výška)	Nástřik 2 (výška)	Nástřik 3 (výška)	Nástřik průměr (výška)	RSD (%) n = 3
4,95	0,0199	0,0196	0,0178	0,0191	4,93
9,90	0,0415	0,0414	0,0419	0,0416	0,53
14,85	0,0623	0,0635	0,0636	0,0631	0,98
24,75	0,0974	0,0993	0,0937	0,0968	2,38
39,60	0,1419	0,1385	0,1370	0,1391	1,45

Tabulka 15 – Parametry pro regresivní přímku – pík rutinu (retenční čas 3,40 min)

	Plocha pod píkem	Výška píku
Parametry pro regresní přímku	$y = a + bx$	
Počet bodů křivky	n = 5	n = 5
Směrnice	b = 0,20119	b = 0,00342
Odhad chyby	± 0,01142	± 0,000020
Absolutní člen	a = 0,47675	a = 0,000758
Odhad chyby	± 002566	± 0,000442
Korelační koeficient	r = 0,9952	r = 0,9951



Obrázek 16 – Kalibrační křivka vypočtená z hodnot plochy pod píkem pro pík rutinu

Diosmin se eluoval v čase 4,42 minut. Korelační koeficient splňuje podmínku Českého lékopisu, konkrétní hodnoty byly $r = 0,99980$ pro plochu pod píkem a $r = 0,99991$ pro výšku píku.

Tabulka 16 – Vypočítané hodnoty plochy pod píkem diosminu (retenční čas 4,42 min)

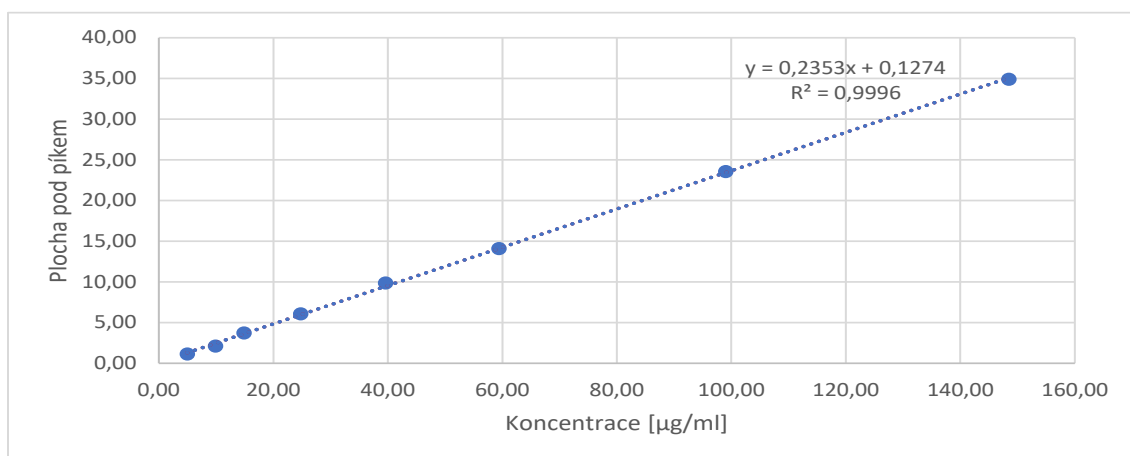
Koncentrace [µg/ml]	Nástřik 1 (plocha)	Nástřik 2 (plocha)	Nástřik 3 (plocha)	Nástřik průměr (plocha)	RSD (%) n = 3
4,95	1,2251	1,2179	0,9072	1,1167	13,27
9,90	2,4389	2,0237	1,8400	2,1009	11,92
14,85	3,7557	3,6721	3,6851	3,7043	0,99
24,75	6,0933	6,3700	5,7525	6,0719	4,16
39,60	9,9045	9,7125	9,9434	9,8535	1,02
59,40	14,2586	14,1355	13,8384	14,0775	1,25
99,00	23,8004	23,5615	23,3242	23,5620	0,83
148,50	35,3491	34,8956	34,3952	34,8800	1,12

Tabulka 17 – Vypočítané hodnoty výšky pro pík disominu (retenční čas 4,42 min)

Koncentrace [µg/ml]	Nástřik 1 (výška)	Nástřik 2 (výška)	Nástřik 3 (výška)	Nástřik průměr (výška)	RSD (%) n = 3
4,95	0,01140	0,01152	0,01123	0,0114	1,05
9,90	0,02486	0,01984	0,01770	0,0208	14,43
14,85	0,03900	0,035673	0,03871	0,0378	3,98
24,75	0,06964	0,0663	0,06574	0,0672	2,57
39,60	0,11151	0,10964	0,11023	0,1105	0,71
59,40	0,1664	0,16435	0,16758	0,1661	0,81
99,00	0,28112	0,28141	0,27862	0,2804	0,45
148,50	0,42144	0,41432	0,41565	0,4171	0,74

Tabulka 18 – Parametry pro regresivní přímku píku diosminu (retenční čas 4,42 min)

	Plocha pod píkem	Výška
Parametry pro regresivní přímku	$y = a + bx$	
Počet bodů křivky	n = 8	n = 8
Směrnice	b = 0,23530	b = 0,00285
Odhad chyby	± 0,00194	± 0,000016
Absolutní člen	a = 0,12737	a = - 0,00386
Odhad chyby	± 0,13267	± 0,00109
Korelační koeficient	r = 0,99980	r = 0,99991



Obrázek 17 – Kalibrační křivka vypočítaná z plochy pod píkem pro pík diosminu

Hesperidin byl eluován v čase 4,93 minuty. Korelační koeficient splňuje podmínku Českého lékopisu, konkrétní hodnoty byly $r = 0,99859$ pro plochu pod píkem a $r = 0,99944$ pro výšku píku.

Tabulka 19 – Vypočítané hodnoty plochy pod píkem hesperidinu (retenční čas 4,93 min)

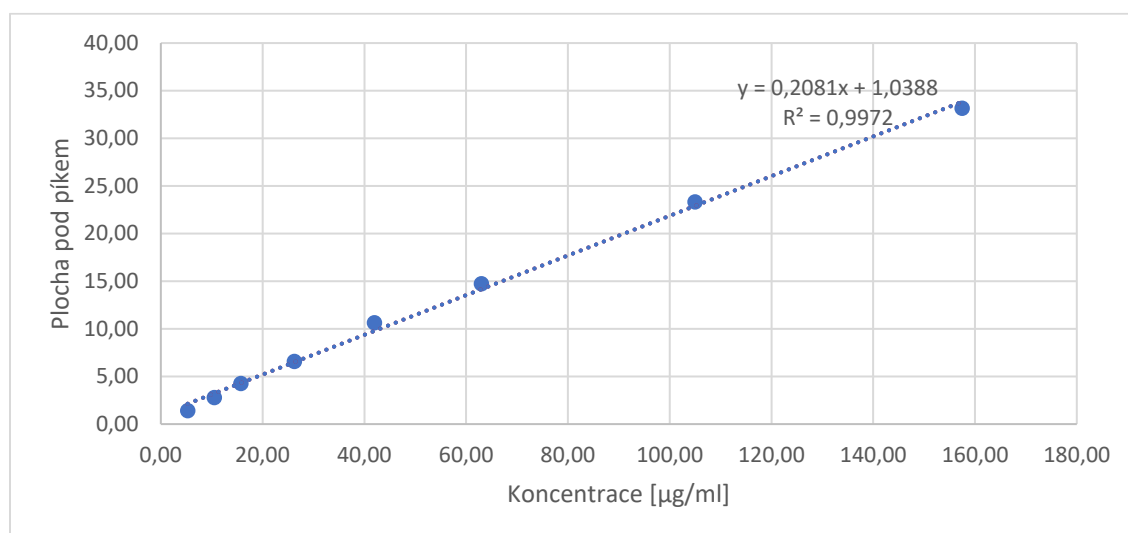
Koncentrace [µg/ml]	Nástřík 1 (plocha)	Nástřík 2 (plocha)	Nástřík 3 (plocha)	Nástřík průměr (plocha)	RSD (%) n = 3
5,25	1,5333	1,4229	1,2429	1,3997	8,55
10,50	2,8170	2,7564	2,7762	2,7832	0,91
15,75	4,2298	4,1137	4,4245	4,2560	3,01
26,25	6,5693	6,9482	6,2019	6,5731	4,63
42,00	10,7935	10,3817	10,7414	10,6389	1,72
63,00	15,0189	14,6708	14,5033	14,7310	1,46
105,00	23,2025	23,6812	23,0175	23,3004	1,20
157,50	33,9937	33,0613	32,3414	33,1321	2,04

Tabulka 20 – Vypočítané hodnoty výšky pro pík hesperidinu (retenční čas 4,93 min)

Koncentrace [µg/ml]	Nástřík 1 (výška)	Nástřík 2 (výška)	Nástřík 3 (výška)	Nástřík průměr (výška)	RSD (%) n = 3
5,25	0,0122	0,0135	0,0131	0,0129	4,33
10,50	0,0258	0,0264	0,0246	0,0256	2,93
15,75	0,0398	0,0401	0,0393	0,0397	0,81
26,25	0,0639	0,0639	0,0642	0,0640	0,24
42,00	0,1003	0,0992	0,1008	0,1001	0,67
63,00	0,1494	0,1452	0,1457	0,1468	1,27
105,00	0,2331	0,2339	0,2360	0,2343	0,52
157,50	0,3466	0,3365	0,3364	0,3398	1,41

Tabulka 21 – Parametry pro regresivní přímku píku hesperidinu (retenční čas 4,93 min)

	Plocha pod píkem	Výška
Parametry pro regresivní přímku	$y = a + bx$	
Počet bodů křivky	n = 8	n = 8
Směrnice	b = 0,20812	b = 0,00215
Odhad chyby	± 0,00452	± 0,00003
Absolutní člen	a = 1,03890	a = 0,00628
Odhad chyby	± 0,32965	± 0,00213
Korelační koeficient	r = 0,99859	r = 0,99944



Obrázek 18 – Kalibrační křivka vypočtená z hodnot plochy pod píkem pro pík hesperidinu

5.2.2 Limit detekce a limit kvantifikace

Pro určení LOD a LOQ byly porovnávány výšky píku s výškou šumu jednotlivých chromatogramů kalibračních roztoků. Při koncentraci 5 µl/ml byla u upravených chromatogramů výška všech píků alespoň desetkrát vyšší než výška šumu, tím byla určena hodnota LOQ. Hodnota LOD byla určena ze vztahu $LOQ = 3,3 \times LOD$. Pro původní data bylo zjištěno, že při koncentraci 5 µl/ml je výška píků alespoň třikrát větší než výška šumu; pro koncentraci 15 µl/ml platí, že je výška píků alespoň desetkrát větší než výška šumu.

Využitím filtru na odstranění šumu bylo dosaženo výrazného zlepšení LOQ.

Určování LOD a LOQ touto metodou lze obtížně validovat, protože je silně ovlivněna zkušeností pracovníka. Jedná se o orientační hodnoty.

Tabulka 22 – Hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé píky

	Rutin 3,40 min	Diosmin 4,42 min	Hesperidin 4,93 min
LOD [$\mu\text{g/ml}$]; původní data	5	5	5
LOQ [$\mu\text{g/ml}$]; původní data	15	15	15
LOD [$\mu\text{g/ml}$]; korekce šumu	1,51	1,51	1,51
LOQ [$\mu\text{g/ml}$]; korekce šumu	5	5	5

5.2.3 Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti byly určeny KR_1 (5 $\mu\text{l/ml}$), KR_2 (10 $\mu\text{l/ml}$) a KR_7 (100 $\mu\text{l/ml}$). Každý kalibrační roztok byl měřen 7x (Český lékopis uvádí alespoň tři opakování, obvykle se provádí šest opakování). Dále byla změřena opakovatelnost pro nižší koncentrace, než které tvoří koncentrační křivku. Jako reprezentativní zástupce byla vybrána koncentrace 1 $\mu\text{l/ml}$. Tato koncentrace byla měřena 3x.

Pro vyhodnocení opakovatelnosti se využívá relativní směrodatná odchylka, hodnocenými parametry byly retenční čas, plocha pod píkem a výška píku.

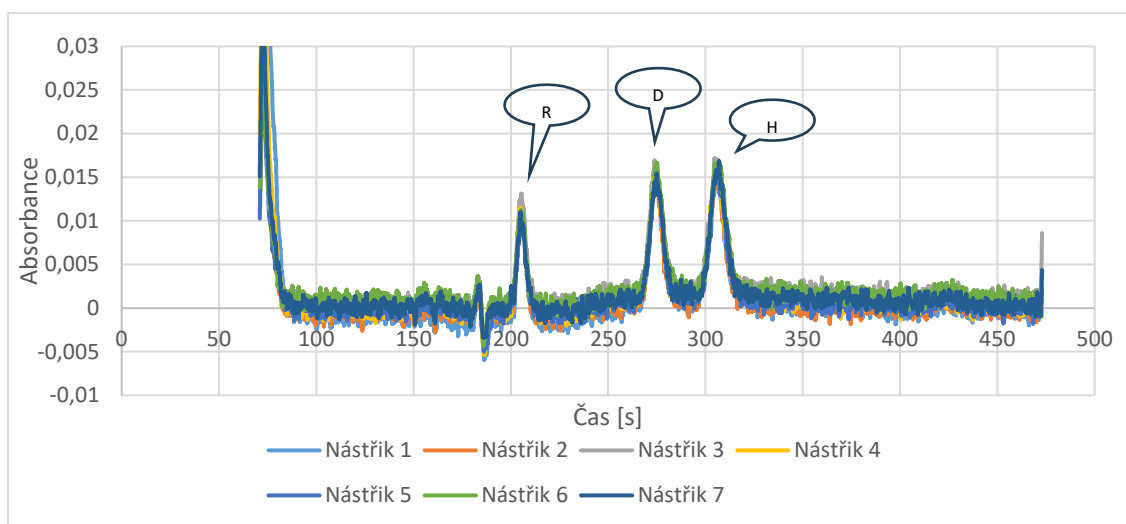
Relativní směrodatná odchylka pro retenční čas byla vždy velmi nízká, pod 1 %. Pro koncentraci 100 $\mu\text{l/ml}$ byly jiné retenční časy než pro ostatní koncentrace, což bylo s největší pravděpodobností dáno faktem, že byla tato koncentrace měřena v jiný den než ostatní.

Nejhorší opakovatelnost (největší relativní směrodatnou odchylku) vykazoval pík rutinu, a to při vyhodnocování plochy pod píkem i výšky píku všech koncentrací. Bylo to zřejmě způsobeno rozkladem rutinu v čase (docházelo ke štěpení glykosidické vazby) a tím se při každém dalším nástřiku snižovala jeho detekovaná koncentrace. Snižování výšky píku je dobře znatelné na obrázku 21. V dalších závěrech této kapitoly proto nebyly výsledky píku rutinu brány v potaz.

Při porovnávání výsledků bylo patrné, že pro měření nižších koncentrací je vhodnější využít hodnoty výšky píků. Pro vyšší koncentrace lze použít obě možnosti, opakovatelnost prokázala velmi dobrou shodu. Vyšší koncentrace vykazovaly lepší opakovatelnost.

Tabulka 23 – Opakovatelnost pro KR₁

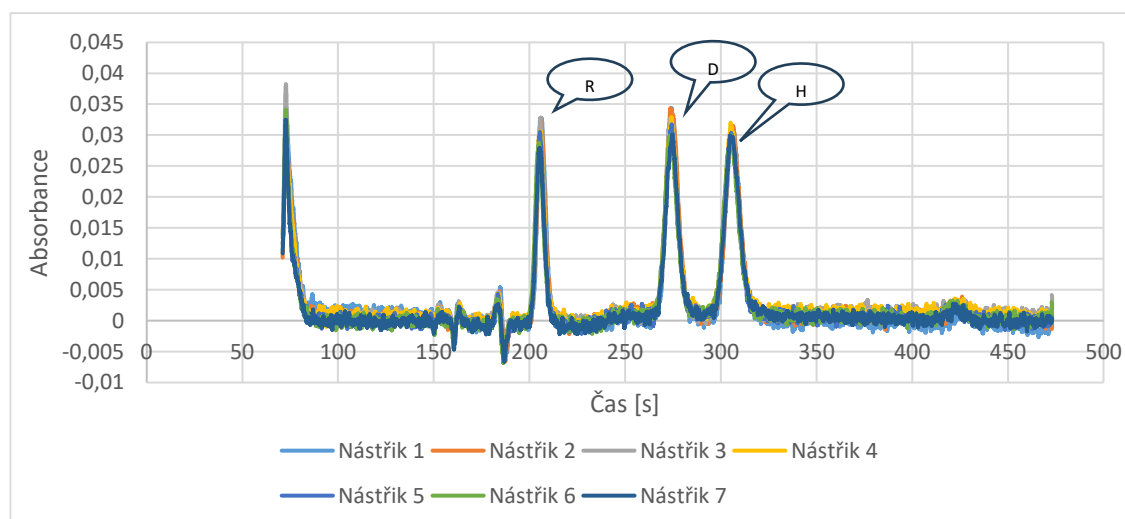
KR ₁ (5 µg/ml)	Rutin	Diosmin	Hesperidin
Retenční čas (min)	3,42	4,57	5,09
SD	0,0056	0,0094	0,0115
RSD (%), n = 7	0,16	0,21	0,23
Plocha pod píkem	1,1890	2,6013	3,2452
SD	0,1850	0,2307	0,3125
RSD (%), n = 7	15,56	8,87	9,63
Výška píku	0,0117	0,0143	0,0150
SD	0,0008	0,0001	0,0003
RSD (%), n = 7	6,96	5,60	2,05



Obrázek 19 – Opakovatelnost, překryv chromatogramů KR₁; YMC Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 µl; λ = 215 nm

Tabulka 24 – Opakovatelnost pro KR₂

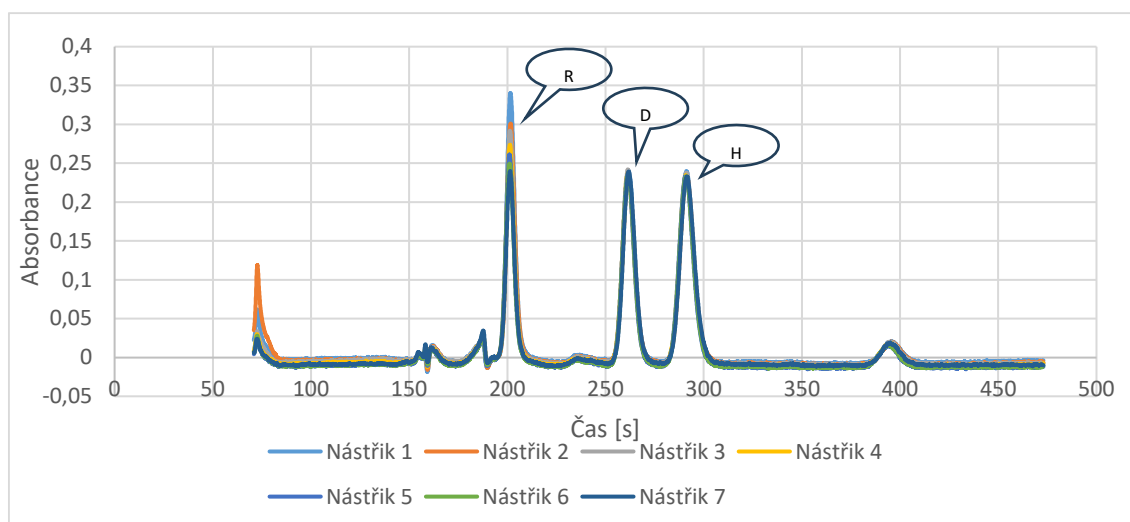
KR ₂ (10 µg/ml)	Rutin	Diosmin	Hesperidin
Retenční čas (min)	3,43	4,57	5,09
SD	0,0058	0,0046	0,0099
RSD (%), n = 7	0,17	0,10	0,19
Plocha pod píkem	3,1954	5,1934	5,9374
SD	0,2337	0,2704	0,1577
RSD (%), n = 7	7,31	5,21	2,66
Výška píku	0,0308	0,0317	0,0298
SD	0,0020	0,0020	0,0012
RSD (%), n = 7	6,42	6,25	5,21



Obrázek 20 – Opakovatelnost, překryv chromatogramů KR₂; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 µl; λ = 215 nm

Tabulka 25 – Opakovatelnost pro KR₇

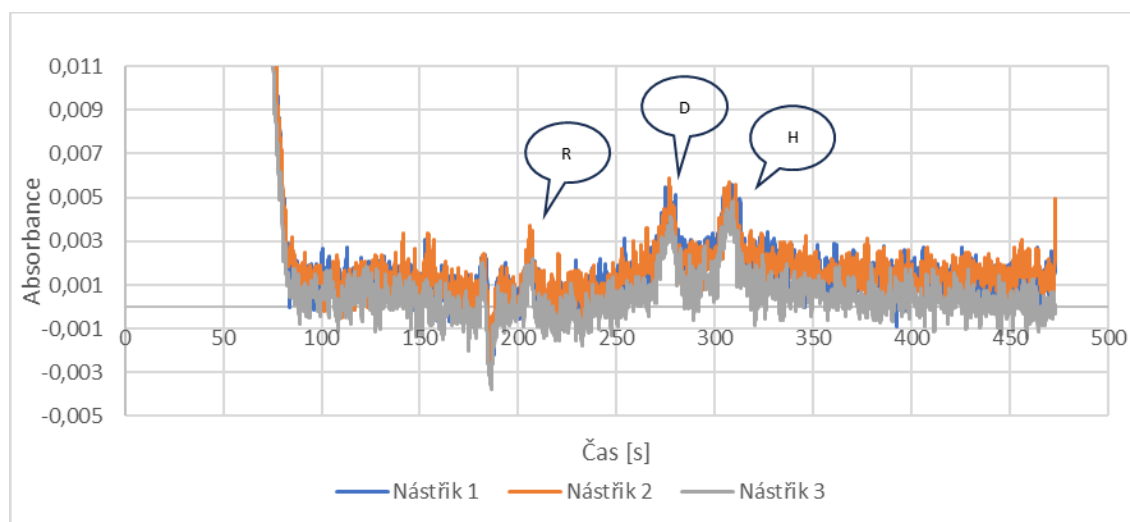
KR ₇ (100 µg/ml)	Rutin	Diosmin	Hesperidin
Retenční čas (min)	3,36	4,36	4,86
SD	0,0039	0,00230	0,0049
RSD (%), n = 7	0,12	0,05	0,10
Plocha pod píkem	28,2230	33,0456	38,9965
SD	3,5366	0,8433	0,7037
RSD (%), n = 7	12,53	2,55	1,80
Výška píku	0,2794	0,2409	0,2424
SD	0,03196	0,0025	0,0020
RSD (%), n = 7	11,44	1,05	0,83



Obrázek 21 – Opakovatelnost, překryv chromatogramů KR₇; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 µl; λ = 215 nm

Tabulka 26 – Opakovatelnost pro koncentraci 1 $\mu\text{l/ml}$

Koncentrace 1 $\mu\text{l/ml}$	Rutin	Diosmin	Hesperidin
Retenční čas (min)	3,44	4,61	5,14
SD	0,0150	0,0220	0,0153
RSD (%), n = 3	0,44	0,48	0,30
Plocha pod píkem	0,1847	0,8329	0,9855
SD	0,0738	0,1295	0,1289
RSD (%), n = 3	39,97	15,55	13,08
Výška píku	0,0028	0,0041	0,0037
SD	0,0004	0,0002	0,0001
RSD (%), n = 3	14,46	5,77	4,02



Obrázek 22 – Opakovatelnost, překryv chromatogramů koncentrace 1 $\mu\text{g/ml}$; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm \times 4,6 mm; 5 μm , 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl ; $\lambda = 215 \text{ nm}$

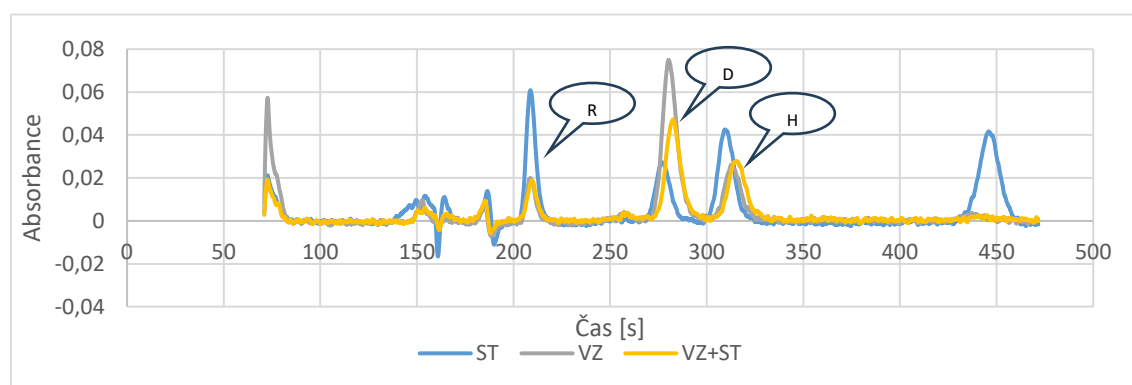
5.2.4 Výtěžnost

Pro určení výtěžnosti byl 3x změřen standard vzorků o koncentraci 15 $\mu\text{g/ml}$. Roztok vzorku Hemostopu Probio MAX byl připraven postupem popsaným v kapitole 4.4.1. Bylo připraveno 6 navážek, každá byla měřena 2x. Roztok standardu a vzorku byl připraven smícháním předchozích roztoků v poměru 1:1, každý roztok byl měřen 2x.

Hodnoty výtěžnosti by se měly co nejvíce blížit 100 %. Výtěžnost rutinu byla podstatně nižší než u ostatních analytů (opět mohlo souviset s nestabilitou). Výtěžnost diosminu i hesperidinu byla velmi dobrá při výpočtu z plochy pod píkem i z výšky píku.

Tabulka 27 – Hodnocení výtěžnosti

Analyt	Rutin	Diosmin	Hesperidin
Retenční čas	3,45	4,63	5,17
Plocha pod píkem			
Standard (průměr)	3,605	2,4359	4,3961
Vzorek (průměr)	1,1664	7,1373	2,7276
Standard + vzorek 1:1 (průměr)	1,2430	4,1189	2,8271
Výtěžnost (%)	47,76	101,54	88,01
Výška píku			
Standard (průměr)	0,0602	0,0255	0,0475
Vzorek (průměr)	0,0167	0,0632	0,0213
Průměr standardu + vzorku (1:1)	0,0231	0,0493	0,0298
Výtěžnost (%)	44,53	97,41	82,59



Obrázek 23 – Překryv chromatogramu vzorku a roztoku standardu a vzorku (1:1); YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl; λ = 215 nm

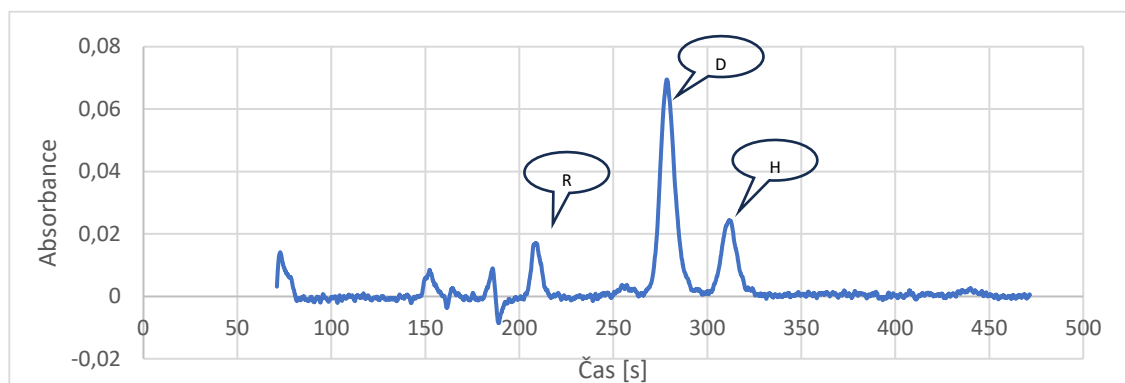
5.2.5 Ostatní validační parametry

Validační parametry byly vypočteny v programu Microsoft Excel při separaci KR₁. Hodnocenými parametry byly symetrie píku, počet teoretických pater (vyjadřující účinnost kolony) a rozlišení píků. Hodnoty symetrie píku diosminu a hesperidinu byly velmi dobré, protože byly blízké hodnotě 1,0. Symetrie píku rutinu byla také v normě ($A_s < 2$). Počet teoretických pater by měl být nejméně 2000. Rozlišení píků by mělo být alespoň 2, podle doporučení FDA.

Parametry všech píků vyhovují limitům potřebným pro validaci.

Tabulka 28 – Ostatní validační parametry, hodnocené na chromatogramu KR₁

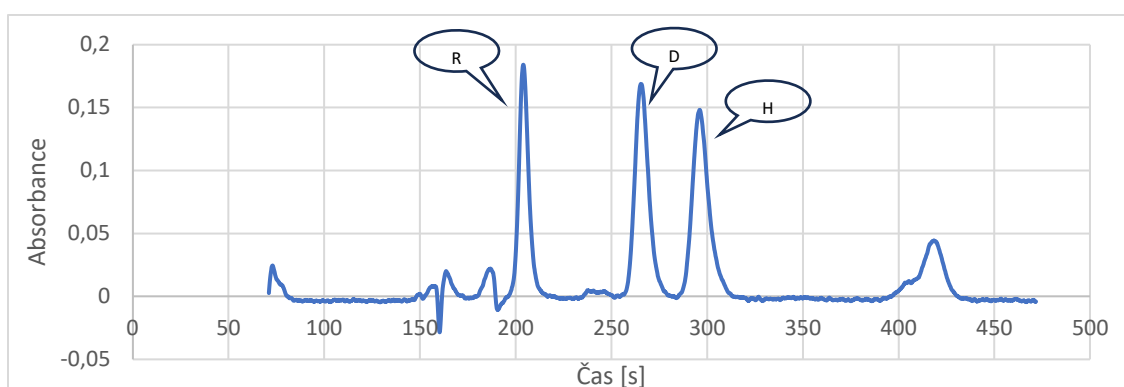
KR ₁ (5 µl/ml)	Rutin	Diosmin	Hesperidin
Retenční čas R _t (min)	3,38	4,42	4,93
Symetrie píku A_s	1,26	1,04	1,06
Počet teoretických pater N	3631,46	3267,60	4147,42
Rozlišení R_s	5,36		2,12



Obrázek 24 – Chromatogram KR₁, ze kterého byly vypočítány validační parametry; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 µl; $\lambda = 215 \text{ nm}$

Tabulka 29 – Ostatní validační parametry, hodnocené na chromatogramu KR₆

KR ₆ (60 µl/ml)	Rutin	Diosmin	Hesperidin
Retenční čas R _t (min)	3,39	4,42	4,93
Symetrie píku A _s	1,17	1,22	1,29
Počet teoretických pater N	3672,23	3710,72	3525,78
Rozlišení R _s	5,53		2,14



Obrázek 25 – Chromatogram KR₆, ze kterého byly vypočítány validační parametry; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 µl; λ = 215 nm

5.2.6 Stanovení vzorků

Pro stanovení vzorků byl použit filtrát ze vzorku Hemostop Probio MAX, jehož příprava byla popsána v kapitole 4.4.1. 20 µl tohoto filtrátu bylo zředěno do 1 ml 20 % acetonitrilem. Měření bylo provedeno na 6 navážkách, každá byla změřena 2x, v tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty. Navážka číslo 6 byla vyjmuta z výpočtu průměru, SD a RSD, protože se významně lišila od ostatních naměřených hodnot. Obsah analytů byl vypočítán z kalibrační křivky.

Hodnoty koncentrace byly vypočítány pomocí příslušných rovnic regresních přímek (kapitola 5.2.1) z dat uvedených v tabulkách 30 a 31. Pro výpočet výsledného obsahu flavonoidů v jedné tobolce byl použit výpočet

$$x = m_{tob} * \frac{c * 250}{m_x};$$

Kde je:

x – obsah v jedné tobolce [mg];

c – koncentrace [mg/ml];

m_x – navážka vzorku [mg];

m_{tob} – hmotnost tobolky [mg];

250 – ředění vzorku.

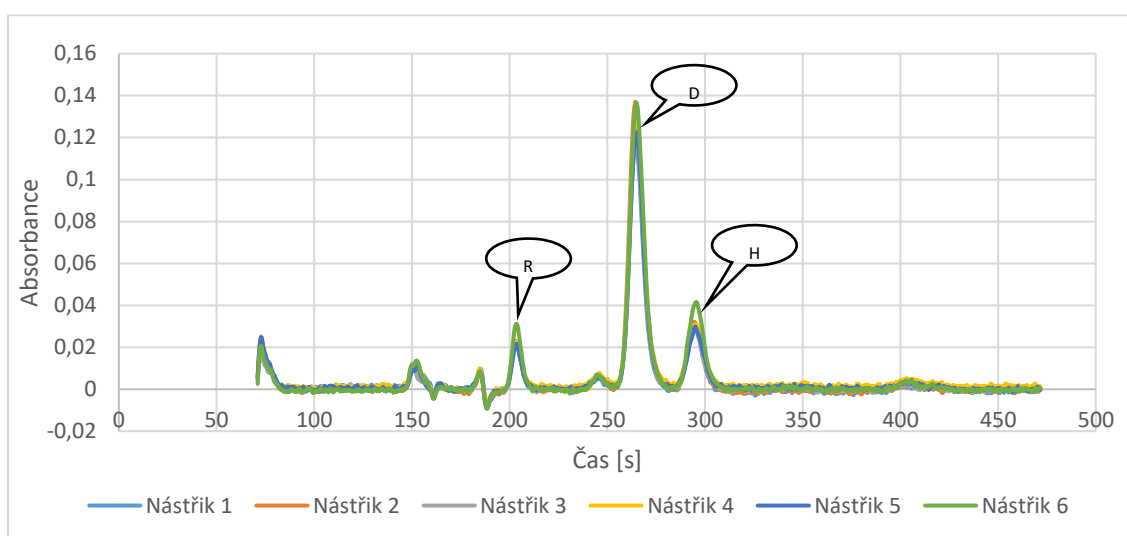
Vypočítané hodnoty obsahu nesouhlasily s deklarovaným obsahem. Nejvíce se lišil obsah diosminu, kdy vypočítaná hodnota odpovídala pouze 40,43, respektive 39,19 % deklarovaného obsahu. Obsah rutinu odpovídal 71,30, respektive 75,30 % a obsah hesperidinu 66,53, respektive 84,75 %. Takto velká odchylka od deklarovaných hodnot mohla být způsobena nedostatečnou extrakcí analytu ze vzorku. Nízká účinnost extrakce se pravděpodobně týkala především diosminu, u kterého se vyskytoval problém s rozpustností. Z výše uvedených důvodů byla snaha najít šetrnější rozpouštědlo, než je DMSO. Přesnost metody se může zvýšit přidáním vhodného vnitřního standardu, jehož koncentrace by odrazila ztráty vzniklé při přípravě vzorku.

Tabulka 30 – Hodnoty plochy pod píkem použité pro výpočet obsahu

	Rutin	Diosmin	Hesperidin
N ₁	1,3032	10,2269	2,6321
N ₂	1,3665	11,7487	2,8366
N ₃	1,2323	10,8735	2,6693
N ₄	1,3392	11,4376	3,0652
N ₅	1,1871	10,6743	2,7749
N ₆	1,7835	11,8996	4,0330

Tabulka 31 – Hodnoty výšky píku použité pro výpočet obsahu

	Rutin	Diosmin	Hesperidin
N ₁	0,0229	0,1158	0,0285
N ₂	0,0235	0,1339	0,0316
N ₃	0,0218	0,1240	0,0285
N ₄	0,0218	0,1254	0,0291
N ₅	0,0207	0,1202	0,0292
N ₆	0,0304	0,1327	0,0407



Obrázek 26 – Překryv chromatogramů vzorků; YMC Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřík 5 μl; λ = 215 nm

Tabulka 32 – Hodnocení obsahu flavonoidů v jedné tobolce Hemostopu Probio MAX
vypočítaného z plochy pod píkem

	Navážka [mg]	Rutin [mg]	Diosmin [mg]	Hesperidin [mg]
N ₁	49,92	14,61	152,61	27,22
N ₂	50,03	15,69	175,22	30,65
N ₃	50,19	13,28	161,51	27,71
N ₄	49,92	15,24	170,90	34,63
N ₅	50,21	12,48	158,45	29,49
N ₆	49,79	23,15	178,35	51,29
Průměr		14,26	163,74	29,94
SD		1,2034	8,2455	2,6465
RSD (%) n = 5		8,44	5,04	8,84

Tabulka 33 – Hodnocení obsahu flavonoidů v jedné tobolce Hemostopu Probio MAX
vypočítaného z výšky píku

	Navážka [mg]	Rutin [mg]	Diosmin [mg]	Hesperidin [mg]
N ₁	49,92	15,84	148,19	36,55
N ₂	50,03	16,53	171,56	41,86
N ₃	50,19	14,66	158,67	36,66
N ₄	49,92	14,74	161,31	37,84
N ₅	50,21	13,53	153,90	37,79
N ₆	49,79	23,81	170,88	57,22
Průměr		15,06	158,72	38,14
SD		1,0371	7,8182	1,9384
RSD (%) n = 5		6,89	4,93	5,08

Tabulka 34 – Porovnání vypočítaného a deklarovaného obsahu v jedné tobolce

Hemostopu Probio MAX

	Rutin	Diosmin	Hesperidin
Deklarovaný obsah [mg]	20	405	45
Stanovený obsah [mg] – plocha pod píkem	14,26	163,74	29,94
Obsah vůči deklarovanému (%)	71,30	40,43	66,53
Stanovený obsah [mg] – výška píku	15,06	158,72	38,14
Obsah vůči deklarovanému (%)	75,30	39,19	84,75

6 Závěr

Prvním cílem práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat SIC metodu pro separaci flavonoidů rutinu, diosminu a hesperidnu. Tento cíl byl splněn vyvinutím metody SIC schopné úplné separace analytů. Optimalizací byly jako nejvhodnější podmínky separace zvoleny: kolona *YMC-Triart C18 ExRS*; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; mobilní fáze acetonitril:kyselina fosforečná pH 2,0 25:75; průtoková rychlost 10 μl; objem nástřiku vzorku 5 μl; nastavení UV-VIS detektoru 215 nm, 226 nm, 250 nm, 280 nm, 350 nm. Pro korekci šumu byly v programu Origin Pro 9 zvoleny parametry N = 2 a M = 25. Metodou se nepodařilo plně kvantifikovat obsah přípravku Hemostop Probio MAX.

Druhým cílem bylo zjednodušit proces úpravy a vyhodnocení dat, které jsou získány v programu SIAsoft. Pro úpravu dat byly použity šablony v programu Microsoft Excel a pro korekci šumu byl zvolen program Origin Pro 9, díky kterému bylo možné zvýšit citlivost a preciznost vyvíjené metody. Použití programu Origin Pro 9 snížilo LOD a LOQ a také zlepšilo hodnoty opakovatelnosti.

Třetím cílem bylo ověřit vhodnost použití SIC systému i při velmi malých koncentracích a při nízkých objemech nástřiku vzorku. Tento cíl byl splněn opakovatelností pro koncentraci 1 μg/ml a opakovatelností pro objem nástřiku 2 μl. Pro splnění tohoto cíle byl klíčový program na korekci šumu a jeho optimální nastavení.

7 Citovaná literatura

- [1] SPILKOVÁ, J. a kol. *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze: Nakladatelství Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3.
- [2] NAGY, M., MUČAJI, P., a GRANČAI, D. *Farmakognózia Biologicky aktivné rostlinné metabolity a ich zdroje*. Bratislava: Herba, 2017. ISBN 978-80-89631-64-3.
- [3] NAGY, M., GRANČAI, D., a MUČAJI, P. *Farmakognózia Biogenéza prírodných látok*. Martin: Osveta, 2011. ISBN 978-80-8063-368-4.
- [4] HEIM K. E., TAGLIAFERRO A. R., a BOBILYA D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002, (vol 13, issue 10).
- [5] TOMKO, J. a kol. *Farmakognózia*. 2. Martin: Osveta, 1999. ISBN 80-8063-014-3.
- [6] SALEHI, H., KARIMI, M., a RAOFIE, F. Micronization and coating of bioflavonoids extracted from Citrus sinensis L. peels to preparation of sustained release pellets using supercritical technique. *J IRAN CHEM SOC*. 2021, (18).
- [7] SÚKL [online]. 24. červenec 2023. Dostupné z: https://prehledy.sukl.cz/prehled_leciv.html#/
- [8] FERREIRA, R., GRECO, R., DELARMELENA, M., a WEBER, K. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. *Electrochimica Acta*. 2015, **163**.
- [9] ŽIVANOVIĆ, S., R. NIKOLIĆ a G. NIKOLIĆ. The Influence of Mg(II) and Ca(II) Ions on Rutin Autoxidation in Weakly Alkaline Aqueous Solutions. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*. 2016, **33**.
- [10] *Go.drugbank* [online]. 10. červenec 2023. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01698>
- [11] *PubChem* [online]. 10. červenec 2023. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280805#section=2D-Structure>
- [12] *Český lékopis 2017*. Praha: Grada Publishing, nedatováno. ISBN 978-80-271-0500-7.

- [13] NASO, L., V. R. MARTÍNEZ, L. LEZAMA, C. SALADO, M. VALCARCEL, E. G. FERRER a P. A. M. WILLIAMS. Antioxidant, anticancer activities and mechanistic studies of the flavone glycoside diosmin and its oxidovanadium(IV) complex. Interactions with bovine serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2016, **24**(18), 4108–4119.
- [14] *Go.drugbank* [online]. 10. červenec 2023. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB08995>
- [15] *PubChem* [online]. 10. červenec 2023. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281613#section=2D-Structure>
- [16] MACÁKOVÁ KATEŘINA. Kardiovaskulární systém. In: . B.m. 10. červenec 2023.
- [17] NIE, Q., Q. ZHANG, Y. ZHU, P. WU, Y. HE a J. WANG. Relationship between the UPLC Fingerprints of Citrus reticulata “Chachi” Leaves and Their Antioxidant Activities. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2022, **2022**, 1–11.
- [18] *Go.drugbank* [online]. 10. červenec 2023. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB04703>
- [19] *PubChem* [online]. 10. červenec 2023. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10621#section=Structures>
- [20] SREEHARSHA, N., M. TELSANG, G. M. BASAVARAJAPPA a S. PUND. Development of simple and accurate voltammetric method based on Surfactant Modified Graphene for the Determination of Rutin. *International Journal of Electrochemical Science*. 2022, **17**(2), 220228.
- [21] LI, S., L. ZHANG, L. CHEN, Y. ZHONG a Y. NI. Determination of rutin by chemiluminescence based on a luminol–potassium periodate–ZnSe system. *Anal. Methods*. 2016, **8**(20), 4056–4063.
- [22] SZYMAŃSKI, M., MŁYNAREK, D., SZYMAŃSKI, A., a MATŁAWSKA, I. Simultaneous Determination of Diosmin and Hesperidin in Pharmaceuticals by RPLC using Ionic Liquids as Mobile Phase Modifiers. *Iranian journal of pharmaceutical research*. nedatováno, **2016**.

- [23] SAMMANI, M.S., S. CLAVIJO, A. GONZÁLEZ a V. CERDÀ. Development of an on-line lab-on-valve micro-solid phase extraction system coupled to liquid chromatography for the determination of flavonoids in citrus juices. *Analytica Chimica Acta*. 2019, **1082**, 56–65.
- [24] PIPONSKI, M., T. B. STOIMENOVA, M. TOPKOSKA, S. STEFOV, M. PIPONSKA a G. T. SERAFIMOVSKA. *Development and validation of a fast and simple RP-HPLC method for the determination of diosmin and hesperidin*. 2018
- [25] ANWER, Md. K., S. JAMIL, M. ANSARI, R. AL-SHDEFAT a M. ABDEL-KADER. A new improved stability-indicating RP-HPLC method for determination of diosmin and hesperidin in combination. *International Research Journal of Biological Sciences*. 2014, **3**, 41–46.
- [26] EL-SHAFAE, A. M. a M. M. EL-DOMIATY. Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2001, **26**(4), 539–545.
- [27] PATIL, J., K. MURTHY, G. JAYAPRAKASHA, M. CHETTI a B. PATIL. Bioactive Compounds from Mexican Lime (*Citrus aurantifolia*) Juice Induce Apoptosis in Human Pancreatic Cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009, **57**, 10933–42.
- [28] ŠATÍNSKÝ, D., K. JÄGEROVÁ, L. HAVLÍKOVÁ a P. SOLICH. A New and Fast HPLC Method for Determination of Rutin, Troxerutin, Diosmin and Hesperidin in Food Supplements Using Fused-Core Column Technology. *Food Analytical Methods*. 2013, **6**(5), 1353–1360.
- [29] IBRAHIM, F., M. SHARAF EL DIN, R. EL-SHAHENY, A. KAMAL EL-DEEN a K. SHIMIZU. Simultaneous determination of four vasoactive phytochemicals in different pharmaceutical preparations by a simple HPLC-DAD method. *Anal. Methods* [online]. 2016, **8**. Dostupné z: doi:10.1039/C5AY03003J
- [30] LLORENT-MARTÍNEZ, E. J., L. MOLINA-GARCÍA, A. RUIZ-MEDINA a P. ORTEGA-BARRALES. Quantitation of Selected Polyphenols in Plant-Based Food Supplements by Liquid Chromatography–Ion Trap Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*. 2014, **7**(10), 2177–2183.

- [31] MAGIERA, S., I. BARANOWSKA a A. LAUTENSZLEGER. UHPLC–UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015, **102**, 468–475.
- [32] CHOCHOLOUŠ, P., SOLICH, P., a ŠÁTINSKÝ, D. An overview of sequential injection chromatography. *Papers presented at the 10th International Conference on Flow Analysis*. 2007, **600**(1), 129–135.
- [33] CHOCHOLOUŠ, P., ŠÁTINSKÝ, D., a SOLICH, P. New generation of sequential injection chromatography: Great enhancement of capabilities of separation using flow analysis. *Talanta*. 2019, **204**, 272–277.
- [34] IDRIS, A. M. a ELGORHASHE, R. E. E. Sequential injection chromatography against HPLC and CE: Application to separation and quantification of amoxicillin and clavulanic acid. *Microchemical Journal*. 2011, **99**(2), 174–179.
- [35] DAVLETBAEVA, P., P. CHOCHOLOUŠ, A. BULATOV, D. ŠÁTINSKÝ a P. SOLICH. Sub–1min separation in sequential injection chromatography for determination of synthetic water-soluble dyes in pharmaceutical formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017, **143**, 123–129.
- [36] IDRIS, A. M. The Second Five Years of Sequential Injection Chromatography: Significant Developments in the Technology and Methodologies. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2014, **44**.
- [37] NOVÁKOVÁ, L. a DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vydání. Praha: Lucie Nováková, Michal Douša, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [38] HAYES, R., AHMED, A., EDGE, T., a ZHANG, H. Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Advanced Materials for Separation Science*. 2014, **1357**, 36–52.
- [39] GONZÁLEZ-RUIZ, V., OLIVES, A. I., a MARTÍN, M. A. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015, **64**, 17–28.

- [40] *Wikipedia* [online]. 28. červenec 2023. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Smoothing>
- [41] SEO, J., MA, H., a SAHA, T. On Savitzky-Golay Filtering for Online Condition Monitoring of Transformer On-Load Tap Changer. *IEEE Transactions on Power Delivery*. 2017.
- [42] *hplc* [online]. 6. srpen 2023. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Validace/definice.html>
- [43] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vydání. Praha: Lucie Nováková, Michal Douša, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [44] KLIMEŠ, Jiří. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové: Jiří Klimeš, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy, 2015. ISBN 978-80-260-8175-3.

8 Seznam obrázků

Obrázek 1 – Vzorec 2-fenylchromanu [8].....	13
Obrázek 2 – Absorpční spektrum rutinu (upraveno) [9].....	14
Obrázek 3 – Vzorec rutinu [11].....	15
Obrázek 4 – Absorpční spektrum diosminu a jeho komplexu s oxidem vanadičitým [13]	16
Obrázek 5 – Vzorec diosminu [15].....	17
Obrázek 6 – Absorpční spektrum hesperidinu [17].....	18
Obrázek 7 – Vzorec hesperidinu [19].....	19
Obrázek 8 – Schéma přístroje SIC [35].....	23
Obrázek 9 – Roztok o koncentraci 10 µg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 50:50; nástřik 5 µl; λ = 215 nm.....	39
Obrázek 10 – Roztok o koncentraci 10 µg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 35:65; nástřik 5 µl; λ = 215 nm.....	39
Obrázek 11 – Roztok o koncentraci 100 µg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 µl; λ = 215 nm.....	39
Obrázek 12 – Roztok o koncentraci 100 µg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 21:79; nástřik 5 µl; λ = 215 nm.....	40
Obrázek 13 – Absorbance analytů při vybraných vlnových délkách; roztok o koncentraci 100 µg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 µl; chromatogram byl upraven pro lepší znázornění, celková délka analýzy byla 7,9 minut.	41
Obrázek 14 – Opakovatelnost objemu nástřiku 2 µl; překryv chromatogramů KR ₇ ; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 µl; λ = 215 nm	42
Obrázek 15 – Porovnání původního chromatogramu (první shora) a chromatogramů získaných korekcí šumu M ₁ = 25 (druhá shora) a M ₂ = 50 (spodní); roztok o koncentraci 1 µg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 µm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 10 µl; λ = 215; chromatogramy byly upraveny (výřez) pro lepší znázornění, celková délka analýzy byla 7,9 minut.....	45
Obrázek 16 – Kalibrační křivka vypočtená z hodnot plochy pod píkem pro pík rutinu ..	48

Obrázek 17 – Kalibrační křivka vypočítaná z plochy pod píkem pro pík diosminu.....	49
Obrázek 18 – Kalibrační křivka vypočtená z hodnot plochy pod píkem pro pík hesperidinu	51
Obrázek 19 – Opakovatelnost, překryv chromatogramů KR ₁ ; YMC Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl; λ = 215 nm	53
Obrázek 20 – Opakovatelnost, překryv chromatogramů KR ₂ ; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl; λ = 215 nm	54
Obrázek 21 – Opakovatelnost, překryv chromatogramů KR ₇ ; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl; λ = 215 nm	55
Obrázek 22 – Opakovatelnost, překryv chromatogramů koncentrace 1μg/ml; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl; λ = 215 nm	56
<i>Obrázek 23 – Překryv chromatogramu vzorku a roztoku standardu a vzorku (1:1); YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl; λ = 215 nm</i>	<i>57</i>
Obrázek 24 – Chromatogram KR ₁ , ze kterého byly vypočítány validační parametry; YMC- Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl; λ = 215 nm	58
Obrázek 25 – Chromatogram KR ₆ , ze kterého byly vypočítány validační parametry; YMC-Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl; λ = 215 nm	59
Obrázek 26 – Překryv chromatogramů vzorků; YMC Triart C18 ExRS; 100 mm × 4,6 mm; 5 μm, 8 nm; acetonitril a kyselina fosforečná pH 2, 25:75; nástřik 5 μl; λ = 215 nm	61

9 Seznam tabulek

Tabulka 1 – Rešerše	20
Tabulka 2 – Příprava mobilní fáze ACN:PhosA pH 2,0.....	32
Tabulka 3 – Příprava mobilní fáze ACN:PhosA pH 2,6.....	32
Tabulka 4 – Příprava mobilní fáze ACN:AcetA pH 3,0.....	32
Tabulka 5 – Ředění kalibračních roztoků KR ₁ – KR ₇	34
Tabulka 6 – Výsledné podmínky validované metody	36
Tabulka 7 – Výsledné nastavení programu SIAssoft.....	37
Tabulka 8 – Nastavení průtokové rychlosti kolon	42
Tabulka 9 – Opakovatelnost pro objem nástřiku 2 µl, koncentrace 100 µl/ml	43
Tabulka 10 – Porovnání hodnot plochy pod píkem pracovních roztoků o koncentraci 1 µg/ml vypočítaných z původních dat a z dat, která prošla korekcí šumu	44
Tabulka 11 – Porovnání hodnot výšky píků pracovních roztoků o koncentraci 1 µg/ml vypočítaných z původních dat a z dat, která prošla korekcí šumu	44
Tabulka 12 – Přesné koncentrace kalibračních roztoků.....	46
Tabulka 13 – Vypočítané hodnoty plochy pod píkem rutinu (retenční čas 3,40 min)	47
Tabulka 14 – Vypočítané hodnoty výšky píku rutinu (retenční čas 3,40 min)	47
Tabulka 15 – Parametry pro regresivní přímku – pík rutinu (retenční čas 3,40 min).....	47
Tabulka 16 – Vypočítané hodnoty plochy pod píkem diosminu (retenční čas 4,42 min) 48	
Tabulka 17 – Vypočítané hodnoty výšky pro pík diosminu (retenční čas 4,42 min)	49
Tabulka 18 – Parametry pro regresivní přímku píku diosminu (retenční čas 4,42 min) .	49
Tabulka 19 – Vypočítané hodnoty plochy pod píkem hesperidinu (retenční čas 4,93 min)	50
Tabulka 20 – Vypočítané hodnoty výšky pro pík hesperidinu (retenční čas 4,93 min) ..	50
Tabulka 21 – Parametry pro regresivní přímku píku hesperidinu (retenční čas 4,93 min)	51
Tabulka 22 – Hodnoty LOD a LOQ pro jednotlivé píky.....	52
Tabulka 23 – Opakovatelnost pro KR ₁	53
Tabulka 24 – Opakovatelnost pro KR ₂	54
Tabulka 25 – Opakovatelnost pro KR ₇	55
Tabulka 26 – Opakovatelnost pro koncentraci 1 µl/ml.....	56
Tabulka 27 – Hodnocení výtěžnosti	57

Tabulka 28 – Ostatní validační parametry, hodnocené na chromatogramu KR ₁	58
Tabulka 29 – Ostatní validační parametry, hodnocené na chromatogramu KR ₆	59
Tabulka 30 – Hodnoty plochy pod píkem použité pro výpočet obsahu	60
Tabulka 31 – Hodnoty výšky píku použité pro výpočet obsahu	61
Tabulka 32 – Hodnocení obsahu flavonoidů v jedné tobolce Hemostopu Probio MAX vypočítaného z plochy pod píkem.....	62
Tabulka 33 – Hodnocení obsahu flavonoidů v jedné tobolce Hemostopu Probio MAX vypočítaného z výšky píku	62
Tabulka 34 – Porovnání vypočítaného a deklarovaného obsahu v jedné tobolce Hemostopu Probio MAX	63