

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

VÝVOJ KAPILÁRNĚ ELEKTROFORETICKÉ METODY  
PRO ZJIŠŤOVÁNÍ ILEGÁLNÍCH PŘÍMĚSÍ  
V DOPLŇCÍCH STRAVY NA PODPORU HUBNUTÍ

Diplomová práce

Školitel diplomové práce: doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Konzultant diplomové práce: PharmDr. Klára Petruš, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2016

ALENA VRŠKOVÁ

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, 1. 5. 2016

Alena Vršková

Poděkování:

Velmi ráda bych poděkovala své konzultantce diplomové práce PharmDr. Kláře Petřů, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, ochotu a trpělivost a také panu doc. RNDr. Miroslavu Poláškov, CSc. za celkovou revizi této práce.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Alena Vršková

Školitel: Doc. RNDr. Miroslav Polášek, Csc.

Konzultant: PharmDr. Klára Petřů, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj kapilárně elektroforetické metody pro zjišťování ilegálních příměsí v doplňcích stravy na podporu hubnutí

Obezita, která je mimo jiné spojena s konzumací potravinových doplňků podporujících hubnutí se stává světovým problémem. S tím souvisí zvýšená spotřeba těchto produktů a bohužel také přítomnost nedeklarovaných příměsí v doplňcích stravy. Byla vyvinuta a validována kapilárně elektroforetická metoda s bezkontaktní vodivostní detekcí pro současné stanovení 1,3-dimethylamylamin (DMAA), synefrinu a hordeninu v doplňcích stravy na podporu hubnutí a následně aplikována na stanovení těchto látek v přípravku Synephrine – REDUKT. Analýza byla prováděna na křemenné 58 cm dlouhé kapiláře o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  v prostředí 15 mM  $\alpha\text{-CD}$  v 2 M kyselině octové. Vložené napětí bylo 30 kV a teplota při analýze byla udržována na 25°C. Vzorky byly analyzovány nástřikem na krátký konec kapiláry. Pomocí vyvinuté metody byl stanoven obsah synefrinu v přípravku Synephrine-REDUKT a bylo v něm zjištěno asi o 50% více látky, než je deklarováno, což upozorňuje na fakt, že je důležité tyto přípravky sledovat.

Klíčová slova: kapilární elektroforéza, DMAA, synefrin, hordenin, příměsí, doplňky stravy

## ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Alena Vršková

Supervisor: doc. RNDr. Miroslav Polášek, CSc.

Consultant: PharmDr. Klára Petrů, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Development of capillary electrophoretic method for detection of illegal adulterants in weight loss food supplement

Obesity, which is among others associated with the consumption of weight-reduction dietary supplements becomes a global problem. This is related with increased consumption of these products and unfortunately also with the presence of undeclared adulterants in food supplements. Capillary electrophoretic method with contactless conductivity detection for simultaneous determination of 1,3-dimethylamylamine (DMAA), synephrine and hordenine in slimming products was developed and validated and then applied to the assay of these analytes in the Synephrine - REDUCT product. The analysis was performed on silica capillary 58 cm long with internal diameter 50  $\mu\text{m}$  and the BGE was 15 mM  $\alpha$ -CD in 2 M acetic acid. The applied voltage was 30 kV and the temperature during analysis was maintained at 25  $^{\circ}\text{C}$ . The samples were analyzed by injection at the short end of the capillary. The content of of synephrine in Synephrine-REDUKT was determined by the method devised. It was found that the content of synephrine in the analysed product exceeds the declared content by more than 50%. This finding supports necessity of analytical control of such food supplements.

Keywords: capillary electrophoresis, DMAA, synephrine, hordenine, adulterants, food supplements

## OBSAH

Seznam použitých zkratek.....	9
1. Úvod .....	11
2. Cíl a popis zadání práce.....	12
3. Teoretická část .....	13
3.1. Problematika adulterace doplňků stravy.....	13
3.2. DMAA.....	14
3.2.1. Účinky DMAA na lidský organismus: .....	15
3.3. Náhrada za DMAA- synephrine, hordenin .....	16
3.3.1. Účinky na lidský organismus:.....	17
3.4. Kapilární elektroforéza.....	17
3.4.1. Základní fyzikální principy elektroforézy- elektroforetická pohyblivost ..	18
3.4.2. Elektroosmotický tok .....	19
3.4.3. Migrační čas.....	20
3.4.4. Instrumentace CZE .....	21
3.4.5. Nástřik na krátký konec kapiláry .....	25
3.5. Rešerše metod pro stanovení DMAA, synepfrinu a hordeninu .....	26
3.6. Cyklodextriny .....	29
3.6.1. Chirální separace kapilární elektroforézou.....	30
3.7. Validace analytické metody .....	31
3.7.1. Selektivita.....	31
3.7.2. Přesnost.....	31
3.7.3. Správnost.....	31
3.7.4. Linearita .....	32
3.7.5. Limit detekce a mez stanovitelnosti .....	32
3.7.6. Rozsah.....	33
3.7.7. Robustnost.....	33

3.7.8. Test vhodnosti systému .....	33
4. Experimentální část .....	36
4.1. Materiál, přístroje, pomůcky .....	36
4.1.1. Přístroje:.....	36
4.1.2. Kapilára:.....	36
4.1.3. Pomůcky: .....	36
4.1.4. Chemikálie: .....	36
4.2. Pracovní podmínky .....	37
4.2.1. Kondicionace kapiláry .....	37
4.3. Příprava roztoků .....	38
4.3.1. Příprava zásobních roztoků standardů .....	38
4.3.2. Příprava pracovních roztoků standardů .....	38
4.3.3. Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu.....	39
4.3.4. Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu .....	39
4.3.5. Příprava roztoků elektrolytů pro optimalizaci metody .....	40
4.3.6. Příprava pracovních roztoků pro kalibraci .....	42
4.3.7. Příprava pracovního roztoku vzorku .....	42
4.3.8. Robustnost.....	43
5. Výsledky a diskuze .....	45
5.1. Optimalizace metody .....	45
5.1.1. Výběr detekce .....	45
5.1.2. Optimalizace základního elektrolytu .....	45
5.1.3. Vliv přídavku cyklodextrinů.....	49
5.1.4. Výběr vnitřního standardu .....	51
5.1.5. Optimalizace teploty .....	52
5.1.6. Optimalizace vkládaného napětí .....	54

5.1.7. Optimální podmínky .....	55
5.2. Validace analytické metody .....	56
5.2.1. Test vhodnosti systému .....	56
5.2.2. Linearita .....	58
5.2.3. Opakovatelnost migračních časů a ploch píků .....	62
5.2.4. Přesnost.....	63
5.2.5. Správnost.....	64
5.2.6. Robustnost.....	65
5.2.7. Analýza potravinových doplňků-stanovení obsahu účinných látek.....	68
6. Závěr .....	70
7. Literatura .....	72
8. Seznam obrázků.....	77
9. Seznam tabulek.....	78



## Seznam použitých zkratk

$\alpha$ -CD	alfa-cyklodextrin
$\beta$ -CD	beta-cyklodextrin
$\gamma$ -CD	gama-cyklodextrin
ACN	acetonitril
$A_s$	faktor asymetrie píku
BACE	bioafinitní kapilární elektroforéza
BGE	základní elektrolyt
CCD	bezkontaktní vodivostní detekce
CE	kapilární elektroforéza
CEC	kapilární elektrochromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace
CITP	kapilární izotachoforéza
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DAD	detektor s diodovým polem
DMAA	1,3-dimethylamylamin
EOF	elektroosmotický tok
FA	kyselina mravenčí
GC	plynová chromatografie
HP- $\beta$ -CD	hydroxypropyl beta cyklodextrin
HP- $\gamma$ -CD	hydroxypropyl gama cyklodextrin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC	iontová chromatografie

IS	vnitřní standard
LC	kapalinová chromatografie
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MAO-B	Monoaminoxidasa B
MCE	mikročipová kapilární elektroforéza
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MeOH	metanol
MS	hmotnostní spektrometrie
N	počet teoretických pater
Ri	výtěžnost
Rs	rozlišení píků
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SDS-PAGE	elektroforéza v kapalných síťovacích médiích
THF	tetrahydrofuran
UV/VIS	ultrafialové-viditelné záření

# 1. Úvod

Analytické metody mají široké uplatnění a jsou hojně využívány napříč obory. S tím ovšem souvisí zvyšující se požadavky a nároky na konkrétní analytické procesy. Stále je vyvíjena snaha nalézt jednoduché, rychlé, robustní a levné metody s optimálními podmínkami analýzy.

Mezi hojně využívané analytické metody v současnosti patří např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie či kapilární elektroforéza. Jsou to metody univerzální a jsou využívány k analýze velkého množství látek, mezi něž patří i potravinové doplňky.

V posledních letech se setkáváme s nárůstem civilizačních chorob, které jsou spojeny se špatným životním stylem. Jedná se především o obezitu a s ní spojené zdravotní problémy. Značná část populace však na toto reaguje, zajímá se o svůj životní styl, o stravování, fyzickou zdatnost a zdraví. Někteří však zacházejí do extrémů, snaží se hubnout, a to tak, že nezdravě pomocí různých doplňků stravy. Ne všechny jsou však bezpečné a skutečně obsahují deklarované látky v uvedeném množství.

Jednou z metod pro stanovení analytů v potravinových doplňcích je kapilární elektroforéza. Je to rychlá a výkonná metoda, s dobrou separační účinností a její velkou výhodou je minimální spotřeba analytu a ostatních reagensů a v neposlední řadě vhodnost pro chirální separace.

V této práci byly zkoumány optimální podmínky kapilárně elektroforetické metody pro stanovení synefrinu, hordeninu a DMAA v potravinových doplňcích na podporu hubnutí. Metoda byla aplikována na stanovení obsahu těchto látek v přípravku Synephrine-REDUKT a rovněž v rámci validace byla testována její robustnost.

## **2. Cíl a popis zadání práce**

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat kapilárně-elektroforetickou metodu pro současné stanovení synefrinu, hordeninu a DMAA a následně ji aplikovat na analýzu potravinových doplňků s deklarovaným obsahem těchto látek. Cílem této práce bylo také v rámci validace metody otestovat její robustnost multivariantním přístupem.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Problematika adulterace doplňků stravy

Obezita se v posledních letech stále častěji stává problémem, který ovlivňuje miliony lidí po celém světě. Hlavním důvodem nárůstu obézních jedinců je především měnící se životní styl, který přináší změnu ve stravování a zejména tendenci stále méně se hýbat. Obezita má pak za následek především negativní dopady na lidské zdraví, jelikož společně s ní se vyskytují srdeční onemocnění, hypertenze, dislipidémie, aj.

Někteří lidé si však naštěstí postupně začínají uvědomovat cenu lidského zdraví, popřípadě jsou ovlivňovány současnými módními trendy propagujícími štíhlost a snaží se problémy řešit. Namísto by pak byly především bezpečné a efektivní metody hubnutí, jako úprava stravování a zvýšená fyzická aktivita, která je pro lidské tělo přirozená. Nicméně mnoho lidí hledá spíše rychlé, krátkodobé a proto neefektivní řešení a sahá tak po potravinových doplňcích určených pro hubnutí, především po takzvané „přírodních“ přípravcích.

Poptávka po alternativních způsobech léčby, tedy po potravinových doplňcích na přírodní bázi, stále roste a důvodem může být i fakt, že mnoho lidí předpokládá, že přírodní produkty nemají žádné vedlejší účinky nebo nemohou lidské zdraví nijak poškodit.

Nicméně, mnohé farmaceutické společnosti reagují na zvýšenou poptávku a požadovaný účinek těchto přípravků nepříliš správnou cestou. Firmy vyrábějící tyto doplňky stravy často neuvádějí na etiketě přesné složení, ale pouze obsah v miligramech u směsi několika látek, což může být zavádějící. V horším případě jsou do produktů přidávány syntetické substance zvyšující jejich hubnoucí účinek.

Nejčastějšími přidanými látkami jsou aditiva ze skupiny anorektik, diuretik, laxativ, anxiolytik či antidepresiv, které však již vedlejší účinky způsobují a mohou být velmi nebezpečné. Anorektika, mezi něž řadíme především deriváty amfetaminu, působí snížením chuti k jídlu, zvýšením energie a také snížením absorpce tuků v trávicím traktu. Diuretika či laxativa způsobí snížení hmotnosti

především ztrátou tekutin a mohou tak způsobit životu nebezpečnou dehydrataci organismu. Benzodiazepiny pak mohou zakrývat některé vedlejší účinky anorektik a jiných látek.

Všechny tyto látky mohou způsobit mírnější příznaky jako bolesti hlavy, palpitace, pocení, nevolnost, ale i závažné nežádoucí účinky v podobě onemocnění srdce, ledvin, kůže či kancerogenezi. Při konzumaci může docházet k interakci s jinými léčivy a vzniku nepředvídaných účinků na lidské tělo. A to vše bez vědomí lékaře či jiného odborníka. [1,2,3,4,5]

Ministerstvo zdravotnictví České republiky vydalo v červenci 2012 varování před konzumací potravin s obsahem 1,3-dimethylamylaminu. V posledních letech, zřejmě jako reakce na zákaz používání efedrinu v potravinových doplňcích, se totiž rozšířilo jeho užívání, jelikož je přidáván především do doplňků stravy pro sportovce. Nejedná se však o látku bezpečnou pro volné užívání, proto FDA vydala důrazné varování pro všechny firmy vyrábějící produkty obsahující DMAA a seznam doplňku stravy s obsahem DMAA, u kterých nebyla prokázána bezpečnost při užívání. Taktéž byli varováni spotřebitelé před konzumací potravin s obsahem tohoto monoaminu. [5,6]

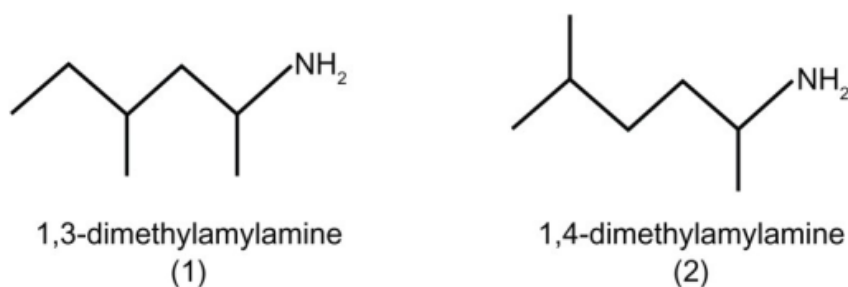
### 3.2. DMAA

DMAA – 1,3-dimethylamylamin, vyskytující se také pod dalšími cca třiceti názvy je alifatický amin přirozeně se vyskytující v rostlinných extraktech (především olejích) Pelargonie vonné (*Pelargonium graveolens*) z čeledi *Geraniaceae*.

Původně byl patentován na počátku čtyřicátých let 20. století jako nosní dekongestant pro jeho vasokonstrikční a další sympatomimetické účinky. Až později začal být užíván, především sportovci, jako součást nutriční podpory či mládeží jako rekreační droga. [7,8]

Vyskytuje se ve dvou formách, a to jako 1,3 - dimethylamylamin a jako 1,4 – dimethylamylamin, jejichž strukturu můžeme vidět na Obrázku 1. 1,3-izomer je chirální sloučenina tvořená směsí čtyřech enantiomerů, zatímco 1,4 –

izomer je tvořen směsí dvou enantiomerů. V literatuře se diskutuje, zda je možné, aby se obě formy vyskytovaly přirozeně či nikoli, a existuje již řada studií dokazujících, že tomu tak není. Syntetické látky by se měly skládat z racemických párů enantiomerů vzniklých asymetrickým syntetickým procesem. Naopak přirozeně se vyskytující chirální sloučeniny jsou obvykle enantiomerně obohaceny, což vede k charakteristickému diastereomernímu poměru.<sup>[9]</sup>



Obr. č. 1 Struktura izomerů: 1,3-dimethylamin (1) a 1,4-dimethylamylamin (2)<sup>[10]</sup>

Dimethylamylamin je lipofilní látka dobře rozpustná v etanolu, chloroformu, etheru a zředěných kyselinách. Ve vodě je rozpustný pouze omezeně.

### 3.2.1. Účinky DMAA na lidský organismus:

Farmakologické účinky dimethylamylaminu vycházejí především z jeho sympatomimetické aktivity a strukturní podobnosti s dalšími monoaminy, jako je např. amfetamin. Mezi nejčastější patří vasokonstrikce a venokonstrikce a následkem toho zvýšení systolického krevního tlaku a tepové frekvence. Dále také můžeme zaznamenat zlepšení soustředění a výkonnosti či pocity euforie, které se však přestávají objevovat po několika prvních dávkách. Důležitým efektem je pak potlačení chuti k jídlu. Účinek DMAA přetrvává obvykle 3-4 hodiny.

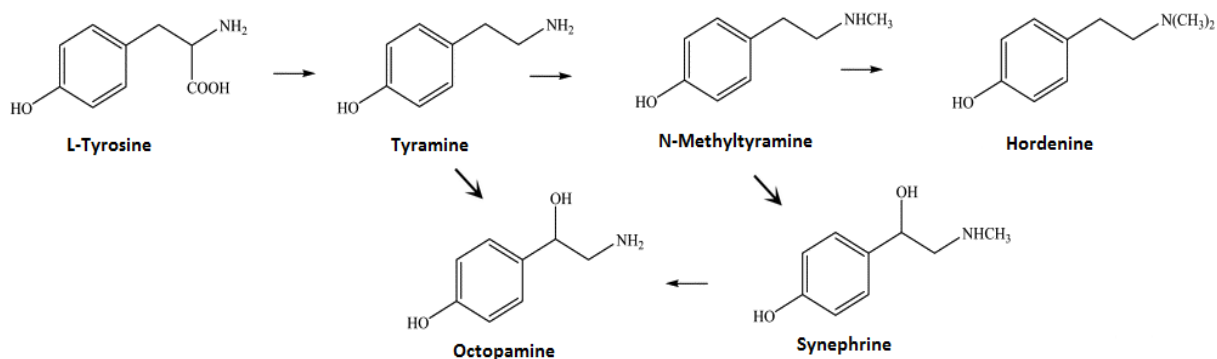
Jako nejčastější vedlejší a nežádoucí účinky jsou uváděny nauzea, zvracení, bolesti hlavy, deprese či suchost sliznic. Zvýšení krevního tlaku může vést k bolestem na hrudi, dechovým obtížím a může dát vzniknout cévní mozkové příhodě popřípadě končit až smrtí. [11,12]

### 3.3. Náhrada za DMAA- synephrine, hordenin

*Citrus aurantium* neboli Hořký pomeranč je rostlina z čeledi *Rutaceae*. Extrakty z jeho plodů se začaly nedávno používat pro léčbu obezity kvůli obsahu biologicky aktivních derivátů fenylethylaminu, z nichž nejčastěji se vyskytující jsou synephrin a hordenin. Nacházejí se především ve slupce plodu a jedlých částech rostliny.

Synephrin je alkaloid, který v rostlinách přirozeně vzniká pravděpodobně biosyntézou z aminokyseliny tyrosinu. Stejně tak hordenin. Biosyntéza obou látek je schematicky znázorněna na Obrázku 2.

Obě látky jsou dobře rozpustné ve vodě a etanolu a spíše nerozpustné v chloroformu či etheru. [13]



Obr. č. 2 Biosyntéza synepfrinu a hordeninu [14]



### 3.3.1. Účinky na lidský organismus:

Díky strukturní podobnosti s efedrinem a dalšími alkaloidy ze skupiny amfetaminu mají farmakologické účinky na sympatický nervový systém.

Synefrin pomáhá redukovat hmotnost tělesného tuku stimulací lipolýzy, zvýšením rychlosti metabolismu a podporou oxidace tukové tkáně zvýšením termogeneze. Díky adrenergnímu účinku také zvyšuje fyzickou výkonnost, zlepšuje centrální i periferní cirkulaci krve, zvyšuje fyzickou výkonnost a potlačuje chuť k jídlu.

Hordenin působí jako inhibitor monoaminoxidasy B (MAO-B), což je enzym katalyzující oxidativní deaminace aminů a také enzym hrající důležitou roli v metabolismu neuroaktivních a vasoaktivních aminů v centrálním nervovém systému i periferních tkáních. Proto je využíván jako stimulant. Hordenin také částečně podporuje uvolňování noradrenalinu, který mimo jiné zvyšuje lipolýzu, a proto je využíván v potravinových doplňcích pro snížení hmotnosti.

Vzhledem ke svojí sympatomimetické aktivitě se však mohou objevit vedlejší účinky většinou spojené s kardiovaskulárním systémem jako arytmie, tachykardie, fibrilace komor či infarkt myokardu. Setkat se však můžeme i s nauzeou, insomnií, změnami nálady či úzkostmi.

V přípravcích je synefrin či hordenin často dáván do kombinace s kofeinem k posílení jeho účinku na organismus. Toto však může být zároveň příčinou častějšího výskytu závažných nežádoucích účinků.

Mimoto je extrakt z hořkého pomeranče experimentálně používán k inhibici cytochromu P450, což je enzym zodpovědný za řadu metabolických přeměn v organismu. Z tohoto vyplývá další potenciální riziko v podobě zvýšených plazmatických hladin některých léčiv. <sup>[13,15,16,17]</sup>

### 3.4. Kapilární elektroforéza

Elektroforéza je analytická elektromigrační separační metoda, která je založená na schopnosti analytů v podobě iontů migrovat v elektrickém poli a

díky rozdílným pohyblivostem se oddělit. K separaci dochází v kapiláře naplněné elektrolytem nebo gelem. Ponořením elektrod, na které je vkládáno napětí, do elektrolytu vzniká elektrické pole.

První elektroforetická metoda byla vyvinuta již na počátku dvacátého století Tiselie, který za ni dokonce získal Nobelovu cenu. Později od padesátých let se postupně začaly vyvíjet další elektroforetické techniky, prostředí a způsoby detekce až do podoby v jaké je známe dnes. [18,19,20]

### 3.4.1. Základní fyzikální principy elektroforézy- elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost neboli mobilita je jedna ze základních veličin všech elektromigračních separačních metod a je chápána jako rychlost pohybu nabitě částice při jednotkové intenzitě elektrického pole, což můžeme vyjádřit Vztahem 1. [18]

$$\mu = \frac{v}{E} \quad (1)$$

$v$ = rychlost,  $E$ = intenzita elektrického pole

Rovnoměrný pohyb iontů ve stejnosměrném elektrickém poli je výsledkem působení několika sil, včetně síly odporové, která je funkcí velikosti a tvaru molekuly a viskozity okolní kapaliny dle Stokesovy rovnice. Z těchto poznatků je pak pro elektroforetickou mobilitu odvozen následující Vztah 2. [18]

$$\mu = \frac{Q}{6 * \pi * \eta * r} \quad (2)$$

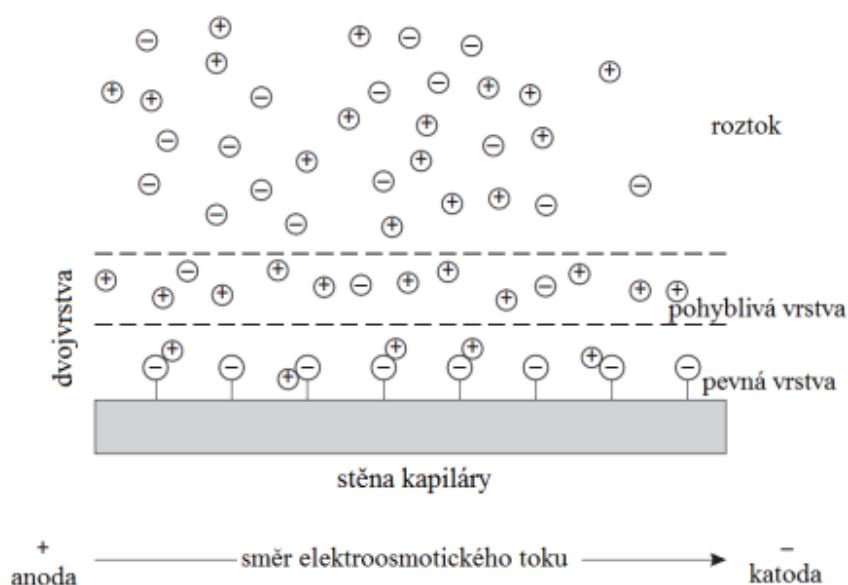
$Q$ =náboj,  $r$ =poloměr molekuly,  $\eta$ =viskozita

Z toho je patrné, že ve stejnosměrném elektrickém poli je rychlost pohybu nabitě částice přímo úměrná jeho náboji a nepřímo úměrná velikosti molekuly a viskozitě elektrolytu. Nejvyšší elektroforetickou mobilitu tedy budou mít ionty velmi malé velikosti s velkým nábojem.

Hodnota elektroforetické mobility je jako konstanta uváděna v tabulkách.

### 3.4.2. Elektroosmotický tok

Elektroosmotický tok (EOF) je pohyb celkového objemu kapaliny v kapiláře při vložení elektrického pole, ke kterému dochází v důsledku přítomnosti záporného náboje na vnitřní stěně kapiláry. Ten vzniká částečnou ionizací silanolových skupin. Kladně nabitě částice elektrolytu jsou potom elektrostatickými silami přitahovány k negativně nabitě stěně kapiláry a zároveň migrují ke katodě a unášejí s sebou molekuly rozpouštědla, viz Obrázek 3.

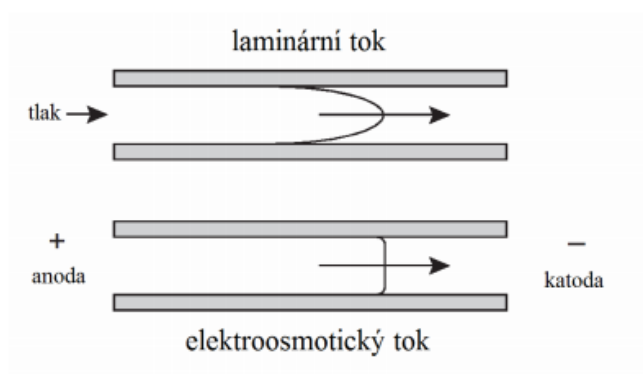


Obr. č. 3 Elektroosmotický tok – schéma <sup>[21]</sup>

Při separaci se pak kladně nabitě ionty pohybují rychleji, záporně nabitě jsou naopak zpomalovány a neutrální molekuly jsou unášeny spolu s elektroosmotickým tokem.

Velikost EOF je ovlivňována hodnotou pH, intenzitou elektrického pole (E), teplotou a také přítomností organického rozpouštědla.

Velkou výhodou EOF je plochý profil toku (Obrázek 4). Na rozdíl od laminárního proudění zde dochází k minimálnímu rozmývání zón, což se pozitivně projevuje na účinnosti separace.



Obr. č. 4 Srovnání elektroosmotického toku s laminárním prouděním <sup>[21]</sup>

### 3.4.3. Migrační čas

Migrační čas můžeme definovat jako dobu potřebnou k migraci rozpuštěného analytu k detekční cele. Je dán mírou pohyblivosti analytu a migrační vzdáleností, což můžeme vidět v následujícím Vztahu 3. <sup>[19]</sup>

$$t_m = \frac{l}{\mu_a * E} = \frac{l * L}{\mu_a * V} \quad (3)$$

$t_m$  = migrační čas,  $\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF}$ ,  $l$  = efektivní délka kapiláry,  $L$  = celková délka kapiláry,  $E$  = intenzita el. pole,  $V$  = vložené napětí

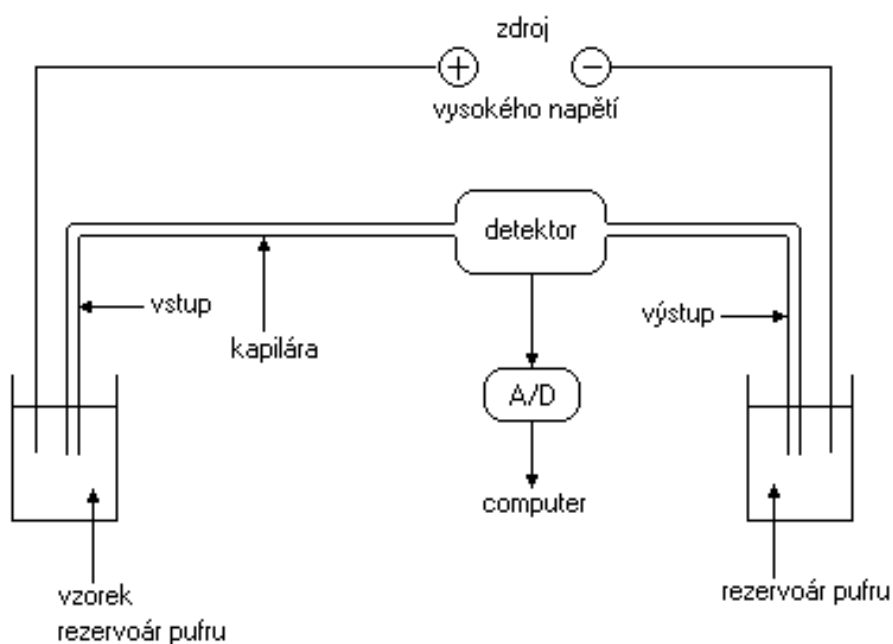
V předchozím vztahu jsou popsány dvě různé délky kapiláry. Celková a efektivní, která vyjadřuje délku kapiláry od počátku, kde je nastříkván vzorek, k detekční cele. Efektivní délka kapiláry bývá obvykle kratší podle toho, kde je umístěn detektor. Taktéž je důležité si uvědomit, že skutečná rychlost analytu je součtem pohyblivosti vlastní elektroforetické pohyblivost a pohyblivosti elektroosmotického toku.

Vysokoučinná kapalinová elektroforéza realizovaná v kapilárním instrumentálním formátu má dnes několik podob, mezi něž patří např. Kapilární zónová elektroforéza (CZE), Izotachoforéza (CITP), Izoelektrická fokusace (CIEF), Kapilární gelová elektroforéza (CGE), Bioafinitní elektroforéza (BACE), Elektroforéza v kapalných síťovacích médiích (SDS-elektroforéza bílkovin, SDS-PAGE), Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) či Kapilární elektrochromatografie (CEC).

Různé separační módy v kapilární elektroforéze se navzájem liší použitím různých elektrolytů, separačním prostředím, použitím tenzidu, apod. Nejužívanější z nich je kapilární zónová elektroforéza, která byla použita i pro tento experiment. [18,19,20]

#### **3.4.4. Instrumentace CZE**

Základní instrumentace kapilární elektroforézy se skládá ze zdroje vysokého napětí, dvou elektrod, separační kapiláry, zásobníků základních elektrolytů, automatického dávkovače vzorku (autosampleru), detektoru a zařízení pro záznam signálu. Základní instrumentální uspořádání CZE je schematicky znázorněno na Obrázku 5.



Obr. č. 5 Schéma kapilární elektroforézy [22]

#### 3.4.4.1. Zdroj vysokého napětí

Zdroj vysokého napětí vkládá na kapiláru napětí obvykle o hodnotě 30 kV a hodnoty proudu řádově v desítkách  $\mu\text{A}$ . Stálá regulace napětí je nezbytná k dosažení reprodukovatelnosti migračního času. Důležitá je také schopnost změnit polaritu, například při obráceném elektroosmotickém toku.

#### 3.4.4.2. Kapilára

Kapiláry jsou obvykle křemenné, jelikož splňují všechny požadavky na ideální materiál pro separaci. Jsou chemicky i elektricky inertní, transparentní, flexibilní, mohou být různě dlouhé a nejsou drahé. Jsou pokryty tenkou ochrannou vrstvou polyimidu, který jim dodává pružnost a usnadňuje manipulaci. Setkat se můžeme i s kapilárami skleněnými či teflonovými. Komerčně dostupné a používané jsou kapiláry s efektivní délkou 10-100 cm a vnitřním průměrem 10-200  $\mu\text{m}$  (nejčastěji 25-75  $\mu\text{m}$ ). Kapiláry jsou upevněny

v kazetě, aby se zabránilo pohybu v detekční cele a zjednodušila se manipulace.

#### **3.4.4.3. Vzorek**

Vzorek je na kapiláru dávkován ve velmi malých množstvích, většinou o objemech okolo 1-10  $\mu$ l. Dávkování se provádí nejčastěji hydrodynamickým vstřikováním pod tlakem, méně často pak elektrokineticky.

#### **3.4.4.4. Kontrola teploty**

Účinná kontrola teploty kapiláry je důležitá pro reprodukovatelnost metody, vzhledem k silné závislosti viskozity na teplotě. To se projeví především při nástřiku vzorku a na migračním čase. Temperování je pak prováděno vysokorychlostním prouděním vzduchu nebo chladicí kapalinou.

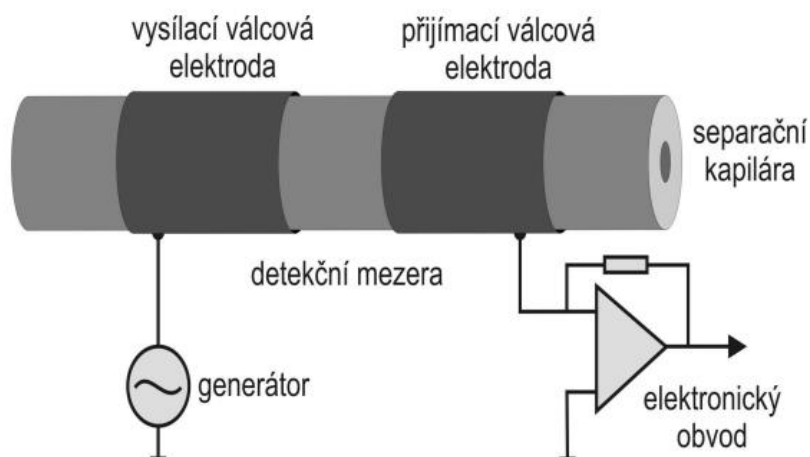
#### **3.4.4.5. Detekce**

Detekce v kapilární elektroforéze může být obtížnější či komplikovanější, vzhledem k malým rozměrům kapiláry a minimálnímu množství nastříkovaného vzorku. Často se proto můžeme setkat s relativně koncentrovanými roztoky vzorku či různými metodami zakoncentrování a čištění vzorku a je nezbytné používat citlivé metody detekce. Nejčastější používanou a univerzální detekční metodou, podobně jako u HPLC, je UV-VIS, popřípadě DAD detekce, používaná především pro biologickou matici. Dále se můžeme setkat s vysoce citlivou LIF detekcí, amperometrií, hmotnostní spektrometrií či vodivostní detekcí. [18,19,20]

## Bezkontaktní vodivostní detekce

Bezkontaktní vodivostní detekce je univerzální metoda. Vhodná je především pro spektrofotometricky obtížně detekovatelné sloučeniny, jako například anorganické ionty, nebo pro sloučeniny neobsahující chromofory, které tak můžeme stanovit bez nutnosti derivatizace. Také minimální množství objemů požadovaných pro detektor není žádnou překážkou pro dosažení nízkých detekčních limitů. [23,24,25]

Bezkontaktní vodivostní detektor je tvořen dvěma elektrodami, vysílací a přijímací, vyrobenými z nerezové oceli, které obklopují kapiláru, ale nejsou v přímém kontaktu se zásobním elektrolytem. Mezera mezi elektrodami je nazývána detekční celou. Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru je na Obrázku 6.



Obr. č. 6 Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru [26]

Hlavním principem této detekce je přenos střídavého napětí určité frekvence a amplitudy z jedné elektrody na druhou. Při průchodu detekční celou se střídavé napětí mění na střídavý proud, který je snímán na sběrné elektrodě, převeden zpět na střídavé napětí, veden do zesilovače a následně změřen. Hodnota proudu snímaného na sběrné elektrodě je podle vzorce  $I=G \cdot U$  přímo



úměrná vkládanému napětí a také vodivosti roztoku v detekční cele. Pokud tedy bude vloženo napětí konstantní, můžeme měřením proudu zjistit změnu vodivosti. Z toho také vyplývá, že výsledná analýza závisí na vlastnostech analytu a velice důležitá je volba vhodného elektrolytu.

Výhody bezkontaktní vodivostní detekce jsou tedy zřejmé: tzv. on-line detekce analytu přímo v kapiláře, žádný kontakt s obsahem kapiláry a zabránění případné kontaminace či znečištění kapiláry, vysoká citlivost a nižší limity detekce (ppm → ppb), možnost kombinace s ostatními detekčními systémy jako UV, LIF, MS, kompatibilní se všemi typy kapilár (křemenná, skleněná, teflonová) i s potaženou kapilárou, levná a komerčně dostupná metoda, jednoduchá údržba.

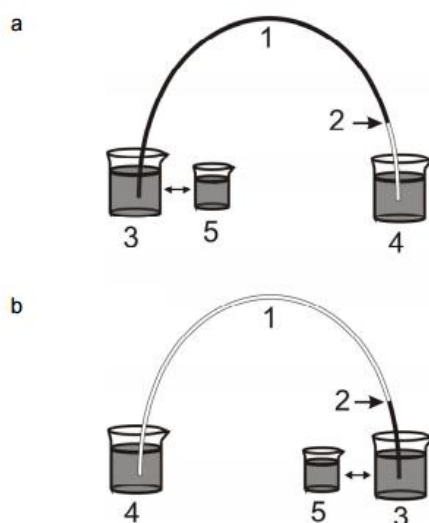
Nevýhodou je pak především vysoká citlivost na změnu teploty, která negativně ovlivňuje hodnoty vodivosti a může způsobit nestability v signálu či vysokou úroveň šumu. [23,24,25]

### **3.4.5. Nástřik na krátký konec kapiláry**

Dobu analýzy je možné významně snížit zkrácením dráhy analytu, tedy snížením délky kapiláry. Minimální délka separační kapiláry se obvykle pohybuje kolem 30 cm, ale většina přístrojů pro kapilární elektroforézu umožňuje nástřik vzorku z detekčního konce kapiláry, také zvaného krátký konec. V tomto případě je pak pro separaci využita pouze dráha mezi tímto koncem a detektorem, což v případě přístroje Agilent CE 7100 činí 8 cm.

Při nástřiku na krátký konec kapiláry je na elektrody vkládáno záporné napětí, čímž se změní jejich polarita a také směr elektroosmotického toku. [27]

Nástřik na krátký konec kapiláry je schematicky znázorněn na následujícím Obrázku 7.



Obr. č. 7 Schematické znázornění nástřiku na dlouhý (a) a krátký (b) konec kapiláry, 1-kapilára, 2-detektor, 3,4-zásobníky elektrolytu, 5-vzorek<sup>[27]</sup>

### 3.5. Rešerše metod pro stanovení DMAA, synefrinu a hordeninu

Je třeba brát na vědomí potenciální ohrožení lidského zdraví, a proto bylo v minulých letech vyvinuto několik metod nejen pro stanovení ilegálních syntetických příměsí v „přírodních“ potravinových doplňcích.

Je popsáno několik metod zabývajících se stanovením dimethylamylaminu v potravinových doplňcích a stejně tak značné množství metod pro stanovení synefrinu, hordeninu a jim příbuzných látek v extraktech hořkého pomeranče i farmaceutických produktech. Nejčastěji se v literatuře setkáme s použitím HPLC s UV-VIS a fluorescenční detekcí, GC, či CE s UV detekcí a CCD.

Obsah DMAA a dalších látek jako kofeinu, L-argininu či kreatinu v doplňku stravy pro sportovce „Jack3d“ popisuje HPLC-UV/LC-MS metoda. Kombinace dvou detekčních metod je nezbytná jelikož některé z analytů neabsorbují UV záření. Vzhledem k vysoké polaritě analytů nebyla použita běžná reverzní, nýbrž normální vodná fáze a silikagelová kolona. Mobilní fáze A byla složena

z vody a 0,1% kyseliny octové (AA) v poměru 1:1, mobilní fáze B pak z acetonitrilu a 0,1% kyseliny octové rovněž v poměru 1:1. Jack3d extrakt byl nastříknut ve zředění 1:200, doba analýzy byla 3 minuty. [28]

Další studie uvádějí stanovení DMAA z extraktu z listů Pelargonie vonné, komerčně dostupného oleje s extrakty z této rostliny a z dalších doplňků stravy s deklarovaným obsahem DMAA tohoto původu. Cílem bylo zjistit, zda DMAA v těchto doplňcích může být skutečně přírodního původu či se jedná o produkt syntetický. Byly použity HPLC a GC metody v obou případech následované hmotnostní spektrometrií. Byla připravena řada vzorků pro kapalinovou i plynou chromatografii, DMAA byl extrahován ze samotného oleje či doplňků stravy, pro GC byl derivatizován. Žádná z analýz však neprokázala výskyt DMAA nad limit detekce, který je 10 ppb (w/w). [7,8]

Pro stanovení synefrinu, tyraminu, hordeninu a tyrosinu v surovém produktu i suchém extraktu hořkého pomeranče a potravinových doplňcích obsahujících tento extrakt byla použita HPLC-DAD metoda na reverzní fázi. Vzorky byly extrahovány metanolem a vodou, popřípadě vodou s acetonitrilem v poměru 30:70 v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Pro současné stanovení analytů bylo testováno množství mobilních fází smíšených v různých poměrech ze čtyř možných rozpouštědel. Nejlepší separace však bylo dosaženo použitím acetonitrilu s 0,1% kyselinou fosforečnou v poměru 30:70 a gradientové eluce (0,5-1,5 ml/min). Analýza trvala 20 minut. Přítomnost těchto aminů v extraktech byla následně potvrzena pomocí MS detekce. [16]

V další metodě, tentokrát kapilárně elektroforetické, pro chirální separaci synefrinu, hordeninu a příbuzných aminů byla použita křemenná kapilára o délce 75 cm a vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ . Vzorky byly nastříkovány tlakem 50 mbar po dobu 5s, vkládané napětí činilo 30 kV a teplota byla 20°C. Jako základní elektrolyt byl použit pufr získaný smísením fosforečnanu draselného (70m M) a sodného (50 mM), 40 mM  $\beta$ -CD a Heptakis $u$ , vytitrovaný hydroxidem sodným a zředěnou kyselinou fosforečnou do výsledného pH 3,1. Roztoky vzorků byly připraveny rozpuštěním rostlinného materiálu a nadrcených tablet či tobolek ve vodě, 20 minut vloženy do ultrazvukové lázně a následně 15 minut

centrifugovány. Všechny vzorky byly před analýzou zfiltrány přes 0,45 µm nylonový filtr. [17]

Vhodnost kapilární elektroforézy jako ideální metody pro stanovení komplikovaných směsí, jako jsou přírodní produkty, potvrzuje následující metoda, která stanovovala množství synefrinu ve slupce citrusových plodů, nezralých plodech a v přípravcích čínské medicíny obsahujících extrakt. Byla použita 60 cm dlouhá křemenná kapilára o vnitřním průměru 75 µm a pufr 50 mM tris(hydroxymetyl)aminometan - 40 mM síran amonný jako základní elektrolyt o výsledném pH 8,9. Aplikované napětí bylo 10 kV, detekce při 254 nm. Surová droga byla extrahována směsí vody, acetonitrilu a kyseliny fosforečné (65:35:0,1). [13]

Uvedeny jsou také enantioselektivní analýzy synefrinu kapilárně elektroforetickými metodami za použití křemenné kapiláry. Použity byly fosforečnanové pufrы s přidavkem HP-β-CD/β-CD o přibližném pH 8. Aplikované napětí bylo 30 kV a detekce při 210 nm. Hlavní složkou byl (-)-synefrin, v extraktech dosahoval obsahu až 32%, v potravinových doplňcích se pak nacházel v koncentracích až 17%. Minoritní složkou byl (+)-synefrin s obsahem do 3,5%. [13]

Stručný přehled metod pro stanovení DMAA, synefrinu a hordeninu je uveden v Tabulce 1.

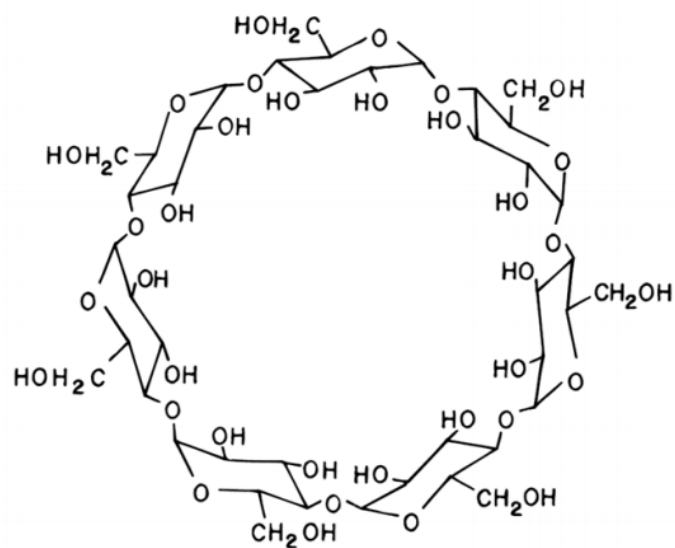
Tab. č. 1 Stručný přehled metod pro stanovení DMAA, synefrinu a hordeninu

Analyty	Metoda	Detekce	Podmínky	LOD/LOQ	Citace
DMAA	HPLC/LC	UV	voda:AA ACN:AA kolona DH18 (MicroSolv Tech., Eatontown, NJ, USA)	–	[28]
7DMAA	HPLC/GC	MS	ACN:AA MeOH:AA Helium kolona LARIHC CF6-P (AZYP. Arlington, TX, USA)	50/ - (ppb)	[7]
DMAA	HPLC	DAD	CH <sub>3</sub> COONa:THF CH <sub>3</sub> COONa:MeOH kolona RP18 (Merck, Darmsatdt, Germany)	0,3/1,56 (µg/ml)	[8]
Synefrin, hordenin	HPLC	DAD/MS	voda:ACN (rychlostní gradient) ACN/THF/MeOH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> kolona RP18 (Thermo scientific, Boston, USA)	1,83/5,53 6,18/18,72 (µg/ml)	[16]
Synefrin, hordenin	CE	UV	křemenná kapilára 75 cm, 30 kV, 20°C, 210 nm, 50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 40 mM HP-β-CD/β- CD, 8,2 mM Heptakis	0,2- 0,5/1,0- 4,0 (µg/ml)	[17]
Synefrin	CE	UV	křemenná kap. 60 cm, 75 µm, 10 kV, 254 nm, 50 mM tris(hydroxymetyl)aminometan - 40 mM síran amonný	–	[13]
Synefrin	CE	UV	křemenná kap. 75 cm, 50 µm, 30 kV, 210 nm, fosforečnanové puřry s přidavkem HP-β- CD/β-CD, Heptakis,	–	[13]

### 3.6. Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy izolované ze škrobu degradovaného glukosyltransferázami bakterie *Bacillus macerans*.

Struktura molekul cyklodextrinů má tvar dutého komolého kuželu s volnými hydroxylovými skupinami na okrajích (Obrázek 8).



Obr. č. 8 Struktura  $\beta$ -cyklodextrinu <sup>[29]</sup>

Hydroxylové skupiny soustředěné na okraji způsobují, že vnitřek dutiny je relativně hydrofobní a nižší polarita uvnitř dutiny přispívá k nejvýraznější vlastnosti cyklodextrinů tvořit inkluzní komplexy s řadou látek, které díky velikosti svých molekul mohou alespoň částečně do dutiny vstoupit. Díky tomu jsou cyklodextriny často využívány jako chirální selektory. <sup>[29,30]</sup>

### 3.6.1. Chirální separace kapilární elektroforézou

Analýza optických isomerů látky jako např. DMAA kapilární elektroforézou je založena na tvorbě diastereoisomerních komplexů analytu s chirálním selektorem, tedy cyklodextrinem. K tvorbě těchto komplexů přispívá celá řada intermolekulárních interakcí mezi selektorem a analytem, například tvorba vodíkových vazeb, interakce  $\pi$ - $\pi$  či dipól-dipól, hydrofobní interakce a další.

Cyklodextriny se velmi často používají především z důvodů jejich snadné rozpustnosti ve vodných prostředích elektrolytů a také z důvodu jejich nízké absorpce v UV oblasti. Důležitým faktorem je i možnost použít derivatizované

cyklodextriny, které potom snadno podléhají ionizaci a díky tomu mohou lépe interagovat s analyty. [29,30]

### 3.7. Validace analytické metody

Validace analytické metody je proces, jehož cílem je zjistit, zda daná metoda je vhodná pro její zamýšlený účel. Validacioní parametry jsou pevně dány a jsou uvedeny v následujících odstavcích. [31,32,33,34]

#### 3.7.1. Selektivita

Selektivita je schopnost odlišit a hodnotit jednoznačně analyt v přítomnosti dalších složek, u kterých předpokládáme výskyt. Jedná se například o nečistoty, rozkladné produkty nebo další složky matrice.

#### 3.7.2. Přesnost

Přesnost analytického procesu vyjadřuje blízkost shody (stupeň rozptylu) mezi jednotlivými měřeními získanými z vícenásobného nástřiku vzorku za předem stanovených podmínek. Přesnost může být stanovována na třech úrovních, a to jako opakovatelnost, mezilehlá přesnost a reprodukovatelnost.

Přesnost je obvykle vyjadřována jako rozptyl, směrodatná odchylka či variační koeficient měření.

#### 3.7.3. Správnost

Správnost analytického procesu vyjadřuje míru shody mezi skutečnou referenční hodnotou koncentrace vzorku a hodnotou změřenou. Někdy je také nazývána pravdivostí či výtěžností a je vyjadřována v % podle následujícího Vztahu 4.

$$R_i = \frac{C_{vz+std} - C_{vz}}{C_{std}} * 100 \quad (4)$$

$C_{vz+st}$  je koncentrace roztoku vzorku s přidavkem standardu,  $C_{vz}$  je koncentrace roztoku vzorku a  $C_{st}$  je koncentrace roztoku.

#### 3.7.4. Linearita

Linearita analytické metody je její schopnost (v rámci určitého rozmezí) získat výsledky měření, které jsou přímo úměrné koncentraci/množství analytu ve vzorku.

Pro stanovení linearity je nezbytné změřit hodnoty analytického signálu pro kalibrační roztoky o minimálně pěti různých koncentračních hladinách, z kterých je následně sestavena kalibrační přímka. [31,32,33,34]

#### 3.7.5. Limit detekce a mez stanovitelnosti

Pro tyto pojmy jsou v literatuře často uváděny také ustálené zkratky. Pro limit (nebo taktéž mez) detekce je to LOD (limit of detection), pro mez stanovitelnosti pak LOQ (limit of quantification). LOD a LOQ jsou závislé hlavně na chybě měření a proto je výpočet jejich hodnoty často upravován pro konkrétní metody. Vzniklá chyba může být vyjádřena např. směrodatnou odchylkou nebo tzv. šumem, který je definován jako časová fluktuace měřeného signálu v nepřítomnosti analytu.

LOD je charakterizován také jako množství (koncentrace) analytu, které způsobí změnu měřeného signálu v rozsahu trojnásobku velikosti šumu, a LOQ jako desetinásobek. Výpočet pro kalibrační závislost lineární povahy je vyjádřen Vztahy 5 a 6. [35]

$$\text{LOD} = \frac{3,3 * SDb}{a} \qquad \text{LOQ} = \frac{10 * SDb}{a} \qquad (5,6)$$



$SD_b$  je průměrná hodnota směrodatných odchylek členu  $b$  (absolutní člen) z rovnic kalibračních přímek,  $a$  je průměrná hodnota členu  $a$  (směrnice přímky) z rovnic kalibračních přímek

### **3.7.6. Rozsah**

Rozsah metody je interval mezi horní a dolní koncentrací analytu ve vzorku, pro který bylo dokázáno, že daná metoda má vyhovující hodnoty přesnosti, správnosti a linearity.

### **3.7.7. Robustnost**

Robustnost analytické metody je mírou její kapacity zůstat nedotčena malými, ale záměrnými odchylkami experimentálních parametrů. Poskytuje tak informace o spolehlivosti metody za běžných podmínek analýzy. [36]

V této práci byl použit pro ověření robustnosti Plackett-Burman design pro osm náhodných kombinací faktorů.

Vyhodnocování bylo provedeno dle statistického postupu, jehož autorem je Vander Haden, Y. [36]

### **3.7.8. Test vhodnosti systému**

Test vhodnosti systému je nedílná součást všech analytických procesů a jeho konceptem je hodnocení zařízení, elektroniky, analytických metod a vzorků jako jednotného systému. Parametry jsou vybírány a upravovány podle typu hodnoceného procesu. [31,32,33,34]

#### **3.7.8.1. Účinnost**

Účinnost je hodnocena jako zdánlivý počet teoretických pater kapiláry a lze ji vypočítat podle vztahu 7. [31]

$$N = 5,54 * \left( \frac{t_m}{w_h} \right)^2 \quad (7)$$

$t_m$  = migrační čas,  $w_h$  = šířka píku v polovině jeho výšky

### 3.7.8.2. Faktor symetrie píku

Faktor symetrie píku vyjadřující jeho tvar je počítán dle Vztahu 8. <sup>[31]</sup>

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (8)$$

$w_{0,05}$  = šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky,  $d$  = vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky

### 3.7.8.3. Rozlišení

Rozlišení píků vyjadřuje míru separace dvou sousedních píků na základní linii a lze vypočítat podle vztahu 9. <sup>[31]</sup>

$$R_s = 1,18 * \frac{(t_{m2} - t_{m1})}{(w_{h1} + w_{h2})} \quad (9)$$

$t_{m1}$  = migrační čas prvního analytu,  $t_{m2}$  = migrační čas druhého (sousedního) analytu,  $w_{h1}$  = šířka píku prvního analytu v polovině jeho výšky,  $w_{h2}$  = šířka píku druhého analytu v polovině jeho výšky

#### 3.7.8.4. Opakovatelnost

Opakovatelnost je vyjadřována jako procento relativní směrodatné odchylky ploch píků korigovaných plochou vnitřního standardu dle následujícího Vztahu 10.

$$\text{RSD} = 100 * \frac{s}{\bar{X}} \quad (10)$$

s=směrodatná odchylka, X= průměr hodnot

## **4. Experimentální část**

### **4.1. Materiál, přístroje, pomůcky**

#### **4.1.1. Přístroje:**

Elektroforetický analyzátor Agilent CE 7100 (Agilent Technologies, Německo)  
řízený softwarem Agilent ChemStation, s CCD-ADMET vodivostním detektorem  
(Rev. 5.06, ČR)

Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex digitec

Thermo-Shaker Biosan

IKA Vortex Genius 3

pH metr Sentron, pH elektroda Sentron SI (měřící rozsah pH 0-14)

Analytické mikrováhy Sartorius

Centrifuga Ependorf minispin plus

#### **4.1.2. Kapilára:**

TSP050375-ASNU07AA (Polymicro TECHNOLOGIES), 50  $\mu\text{m}$ , 58 cm

#### **4.1.3. Pomůcky:**

Automatické pipety Biohit a Brand

Injekční stříkačky Norm-Ject

Nylonové filtry 0,45  $\mu\text{m}$  (Agilent)

Laboratorní sklo

#### **4.1.4. Chemikálie:**

Ultračistá voda připravená systémem Milli-Q-System (Millipore, Bedford)

Kyselina octová ledová (Sigma-Aldrich)

Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich)

Kyselina fosforečná (Sigma-Aldrich)

Hydroxid sodný p.a., Penta

NH<sub>4</sub>OH 25 - 27 %; Penta,

α-CD ≥ 98.0 % (Sigma-Aldrich)

Synephrine ≥ 98.0 % (Sigma-Aldrich)

Hordenin ≥ 97.0 % (Sigma-Aldrich)

1,3-DMAA ≥ 97.0 % (Sigma-Aldrich)

## **4.2. Pracovní podmínky**

Pokud není uvedeno jinak, všechny analýzy probíhaly za následujících podmínek. Základním elektrolytem byl 15 mM α-cyklodextrin (α-CD) v 2 M kyselině octové. Všechny roztoky byly temperovány na laboratorní teplotu 25°C a napětí vložené na kapiláru bylo 30 kV.

### **4.2.1. Kondicionace kapiláry**

Pro analýzu byla připravena křemenná kapilára o celkové délce 58 cm a vnitřním průměru 50 μm.

Kondicionace zahrnovala promytí kapiláry methanolem a následně vodou vždy po dobu 5 minut, 1 M hydroxidem sodným a 0,1 M hydroxidem sodným každým po dobu 20 minut. Následovalo promytí pufrům po dobu 10 minut.

Každý den před měřením byla kapilára vždy promývána po dobu 10 minut čerstvě připraveným základním elektrolytem.

### **4.3. Příprava roztoků**

#### **4.3.1. Příprava zásobních roztoků standardů**

##### **4.3.1.1. DMAA-1,3-dimethylamylamin**

Zásobní roztok standardu DMAA o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním navážky přibližně 1 mg DMAA v 1 ml vody v mikrozkuhavce typu Eppendorf.

##### **4.3.1.2. Synefrin**

Zásobní roztok standardu synefrinu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním navážky přibližně 1 mg synefrinu v 1 ml vody v mikrozkuhavce typu Eppendorf.

##### **4.3.1.3. Hordenin**

Zásobní roztok standardu hordeninu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním navážky přibližně 1 mg hordeninu v 1 ml vody v mikrozkuhavce typu Eppendorf.

Všechny zásobní roztoky byly uchovávány v mrazicím boxu.

#### **4.3.2. Příprava pracovních roztoků standardů**

##### **4.3.2.1. DMAA-1,3-dimethylamylamin**

Pracovní roztok standardu DMAA byl připraven pipetováním 100  $\mu$ l zásobního roztoku DMAA do 1 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Roztok byl umístěn na 10 minut do ultrazvukové vodní lázně a následně filtrován přes 0,45  $\mu$ m nylonový filtr.

#### **4.3.2.2. Synefrin**

Pracovní roztok standardu Synefrinu byl připraven pipetováním 100  $\mu$ l zásobního roztoku Synefrinu do 1 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Roztok byl umístěn na 10 minut do ultrazvukové vodní lázně a následně filtrován přes 0,45  $\mu$ m nylonový filtr.

#### **4.3.2.3. Hordenin**

Pracovní roztok standardu Hordeninu byl připraven pipetováním 100  $\mu$ l zásobního roztoku Hordeninu do 1 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Roztok byl umístěn na 10 minut do ultrazvukové vodní lázně a následně filtrován přes 0,45  $\mu$ m nylonový filtr.

### **4.3.3. Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu**

#### **4.3.3.1. Arginin**

Zásobní roztok vnitřního standardu argininu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním navážky přibližně 1 mg argininu v 1 ml vody v mikrozkuhavce typu Eppendorf. Zásobní roztok byl uchováván v mrazáku.

#### **4.3.3.2. Efedrin**

Zásobní roztok standardu efedrinu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním navážky přibližně 1 mg efedrinu v 1 ml vody v mikrozkuhavce typu Eppendorf.

### **4.3.4. Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu**

#### **4.3.4.1. Arginin**

Pracovní roztok vnitřního standardu o koncentraci 0,5 mg/ml byl připraven pipetováním 500  $\mu$ l zásobního roztoku vnitřního standardu do 1 ml odměrné

baňky a doplněn vodou po rysku. Roztok byl umístěn na 10 minut do ultrazvukové vodní lázně a následně filtrován přes 0,45 µm nylonový filtr.

#### **4.3.4.1. Efedrin**

Pracovní roztok standardu Efedrinu byl připraven pipetováním 100 µl zásobního roztoku Efedrinu do 1 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Roztok byl umístěn na 10 minut do ultrazvukové vodní lázně a následně filtrován přes 0,45 µm nylonový filtr.

### **4.3.5. Příprava roztoků elektrolytů pro optimalizaci metody**

#### **4.3.5.1. Kyselina octová**

Zásobní roztok kyseliny octové o koncentraci 20 % (3,5 M) byl připraven pipetováním 10 ml ledové kyseliny octové do skleněné kádinky s vodou o objemu přibližně 20 ml a následně převeden do 50,0 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku. Analogicky byly připraveny i roztoky kyseliny octové o různých koncentracích.

#### **4.3.5.2. Fosfátový pufr**

Zásobní roztok fosfátového pufru o pH 3,1 byl připraven pipetováním 0,1 ml kyseliny fosforečné do skleněné kádinky s přibližným objemem vody 20 ml a následným titrováním 1 M hydroxidem sodným na výsledné pH 3,1. Poté byl kvantitativně převeden do 50,0 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku do celkového objemu.

#### **4.3.5.3. Octanový pufr**

Zásobní roztok octanového pufru o pH 4,7 byl připraven pipetováním 0,086 ml ledové kyseliny octové do skleněné kádinky s přibližným objemem vody 20 ml a následným titrováním 1 M hydroxidem sodným/amonným na



výsledné pH 4,7. Poté byl kvantitativně převeden do 50,0 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

#### **4.3.5.4. Mravenčanový pufr**

Zásobní roztok mravenčanového pufru o pH 3,7 byl připraven pipetováním 0,057 ml kyseliny mravenčí do skleněné kádinky s přibližným objemem vody 20 ml a následným titrováním 1 M hydroxidem sodným na výsledné pH 3,7. Poté byl kvantitativně převeden do 50,0 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

#### **4.3.5.5. Kyselina mravenčí**

Zásobní roztok kyseliny mravenčí byl připraven o dvou koncentracích, a to 10 % a 20 %. Zásobní roztok o koncentraci 10 % byl připraven pipetováním 1,053 ml 95% kyseliny mravenčí do 10,0 ml odměrné baňky s přibližným objemem vody 5 ml a následně doplněn vodou po rysku. Zásobní roztok o koncentraci 20 % byl připraven pipetováním 2,105 ml 95% kyseliny mravenčí do 10,0 ml odměrné baňky s přibližným objemem vody 5 ml a poté doplněn vodou po rysku.

#### **4.3.5.6. Alfa-cyklodextrin v kyselině octové**

Zásobní roztok 15 mM alfa-cyklodextrinu v 2 M kyselině octové byl připraven navážením 0,1459 g  $\alpha$ -CD do 10,0 ml odměrné baňky, přidáním asi 5 ml vody a následným pipetováním 1,145 ml kyseliny octové a doplněním vody po rysku.

Všechny elektrolyty byly před analýzou umístěny na 10 min do ultrazvukové lázně a poté filtrovány přes 0,45  $\mu$ m nylonový filtr. Roztoky byly připravovány vždy čerstvé.

#### 4.3.6. Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Pracovní roztoky pro kalibraci byly připraveny smísením zásobních roztoků standardů a rozpouštědla v poměrech, které jsou uvedeny v Tabulce 2, do odměrných baněk o objemu 5 ml. Bylo připraveno celkem sedm roztoků v rozmezí koncentrací od 1 µg/ml do 40 µg/ml.

Tab. č. 2 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci

Koncentrace (µg/ml)	Objem zás. roztoku IS (µl)	Objem zás. Roztoku DMAA (µl)	Objem zás. Roztoku Hordeninu (µl)	Objem zás. Roztoku Synefrinu (µl)	Objem rozpouštědla - vody (µl)
5	50	50	25	25	4850
10	50	100	50	50	4750
20	50	200	100	100	4550
30	50	300	150	150	4350
40	50	400	200	200	4150

#### 4.3.7. Příprava pracovního roztoku vzorku

##### 4.3.7.1. Přesnost a stanovení obsahu

###### REDUKT-Synefrin

Bylo zváženo deset tablet přípravku Synefrin Redukt a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, a to 0,3023 g. Tablety byly rozdrceny a homogenizovány ve třecí misce. Pro přípravu pracovního roztoku vzorku byla použita asi polovina tablety, tedy přibližně 0,150 g. Naváženo bylo 6 jednotlivých vzorků. Každý byl rozpuštěn v 10,0 ml odměrné baňce a byl k němu přidán 1 ml pracovního roztoku vnitřního standardu. Odměrná baňka byla doplněna vodou po rysku a následně umístěna na 10 minut na ultrazvukovou lázeň a filtrována přes 0,45 µm nylonový filtr. 20 µl vzorku bylo

odměřeno do 1 ml odměrné baňky, opět doplněno vodou po rysku a 100  $\mu$ l tohoto vzorku bylo pipetováno do vialky k analýze.

#### **4.3.7.2. Správnost**

##### REDUKT-Synefrin

Bylo zváženo deset tablet přípravku Synefrin Redukt a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, a to 0,3023 g. Tablety byly rozdrceny a homogenizovány ve třecí misce. Pro přípravu pracovního roztoku vzorku byla použita asi polovina tablety, tedy přibližně 0,150 g. Bylo naváženo 5 jednotlivých vzorků. Každý byl rozpuštěn v 10,0 ml odměrné baňce a byl k němu přidán 1 ml pracovního roztoku vnitřního standardu. Odměrná baňka byla doplněna vodou po rysku a následně umístěna na 10 minut na ultrazvukovou lázeň a filtrována přes 0,45  $\mu$ m nylonový filtr. 40  $\mu$ l vzorku bylo odměřeno do 2 ml odměrné baňky, bylo k němu přidáno 200  $\mu$ l každého standardu a doplněno vodou po rysku. Pro analýzu bylo do vialky pipetováno 100  $\mu$ l tohoto roztoku.

#### **4.3.8. Robustnost**

Byl připraven roztok standardů o koncentraci 0,01  $\mu$ g/ml a roztok vzorku analogicky dle předchozích kapitol. Robustnost navrhované metody byla hodnocena s použitím Plackett-Burman designu pro sedm faktorů, a to pět proměnných (A – E) a dva umělé faktory (F – G) (Tabulka 3).

Tab. č. 3 Plackett-Burman design – plán experimentů

	A	B	C	D	E	F	G
1	1	-1	-1	-1	1	1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	1
3	1	1	1	-1	1	-1	-1
4	-1	1	1	-1	-1	1	1
5	1	-1	1	1	-1	1	-1
6	-1	1	-1	1	1	1	-1
7	-1	-1	1	1	1	-1	1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Pro jednotlivé experimenty byly připraveny základní elektrolyty a nastaveny podmínky analýzy (testované faktory) tak, aby odpovídaly zvoleným extrémním hodnotám -1 a +1 (Tabulka 4). Jednotlivé experimenty byly testovány pro osm kombinací faktorů v náhodném pořadí.

Tab. č. 4 Robustnost metody – testované faktory

Faktor	Jednotky	Hladina (-1)	Hladina (+1)	Nominalní hodnota
Koncentrace $\alpha$ -CD	mM	12	18	15
Koncentrace kys. octové	M	1,78	2,22	2
Teplota	°C	23	27	25
Promývání	min	2	4	3
Nástřik	mBar	45	55	50

## **5. Výsledky a diskuze**

### **5.1. Optimalizace metody**

Cílem optimalizace bylo nalezení vhodných podmínek pro současné stanovení synefrinu, hordeninu a DMAA v potravinových doplňcích. Důležitá byla vhodná volba základního elektrolytu, aby došlo k separaci námi zvolených analytů. Následoval výběr vhodného vnitřního standardu a neméně důležitá byla volba vhodné teploty při analýze a volba vkládaného napětí tak, aby bylo dosaženo co nejkratší doby analýzy při současném vyhovujícím rozlišení. Pro optimalizaci metody byly použity zásobní roztoky elektrolytů pro optimalizaci a zásobní roztoky standardů a vnitřního standardu.

#### **5.1.1. Výběr detekce**

Při výběru detekce bylo přihlédnuto k faktu, že DMAA díky své struktuře neabsorbuje v UV oblasti a tudíž jej nebude možné detekovat spektrofotometricky. Byla proto zvolena bezkontaktní vodivostní detekce, která je dostatečně citlivá a robustní a v poslední době stále častěji využívána ve spojení s elektromigračními metodami.

#### **5.1.2. Optimalizace základního elektrolytu**

Při volbě základního elektrolytu byla zohledněna struktura a vlastnosti zvolených analytů, dané látky byly stanovovány ve formě kationtů. Na základě publikovaných elektroforetických metod s využitím bezkontaktní vodivostní detekce pro stanovení aminů [23,24,25] byly testovány elektrolyty kyselé povahy, a to hydrogenfosforečnan sodný, octan sodný/amonný a mravenčan sodný a dále roztoky kyseliny mravenčí a kyseliny octové.

Roztoky kyselin poskytují dostatečnou tlumivou kapacitu i v nepřítomnosti protiiontu. Zároveň se díky nízké elektrické konduktivitě snižují hodnoty generovaného tepla, a proto jsou běžně používány při analýze kationtů pomocí CE s vodivostní detekcí. Hydroxoniový ion vykazuje vyšší vodivost než většina

analytů, a citlivost detekce je tak vzhledem k rozdílům ve vodivostech vysoká. [37]

Hlavními kritérii pro výběr elektrolytu byly kvalita separace analytů, tvar píků, citlivost detekce a celková doba analýzy. Nejlépe tyto podmínky splňovala kyselina octová (20 %), jejíž koncentrace byla dále optimalizována.

Koncentrace byla testována v rozsahu 1 - 4,5 M.

### 5.1.2.1. Konduktivita

Konduktivita neboli měrná vodivost je veličina, která je ve zředěných roztocích lineární funkcí koncentrace iontů. Její jednotkou je S/m. Konduktivita je ovlivňována koncentrací iontů v roztoku, jejich náboji, pohyblivostí elektrolytu a závisí také na teplotě. Z tohoto důvodu je velice důležité udržování stále teploty po celou dobu analýzy. [37]

Konduktivitu (měrnou vodivost) vypočítáme podle Vztahu 11

$$K = \frac{(I * l)}{(\pi * U * d^2)} \quad (11)$$

$I$  = proud (A),  $l$  = délka kapiláry (m),  $U$  = napětí (V),  $d$  = vnitřní průměr kapiláry (m)

Tůma a spoluautoři poukázali, že modelové a experimentálně zjištěné hodnoty měrné vodivosti korelují pouze pro koncentrace kyseliny kolem 1 M. [37] Z tohoto důvodu byly zjištěny hodnoty konduktivity v závislosti na koncentraci kyseliny experimentálně (Tabulka 5).

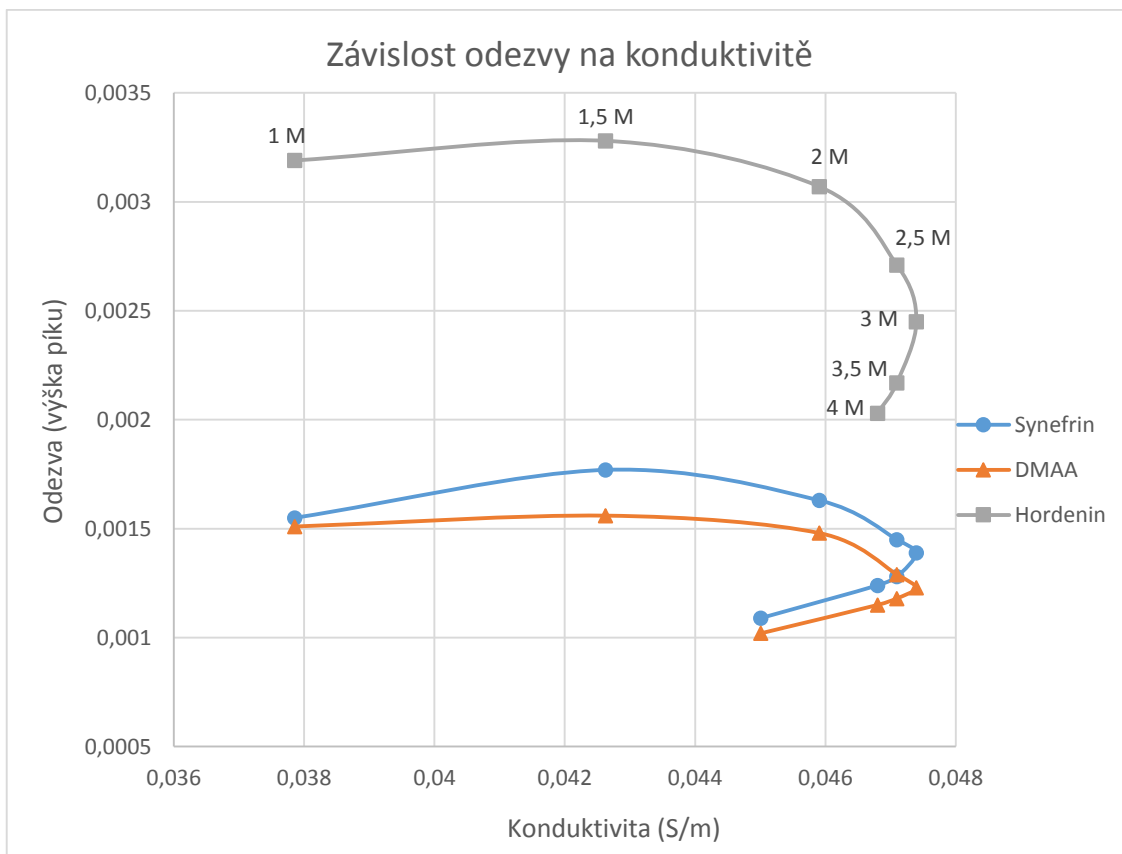
Tab. č. 5 Hodnoty konduktivity v závislosti na koncentraci kyseliny octové

Koncentrace (M)	Konduktivita (S/m)
1	0,0379
1,5	0,0426
2	0,0459
2,5	0,0471
3	0,0474
3,5	0,0471
4	0,0468
4,5	0,0450

Z výsledků uvedených v tabulce vidíme, že s rostoucí koncentrací kyseliny se zvyšuje i hodnota konduktivity s maximem při koncentraci kyseliny 3 M, dále konduktivita opět klesá.

Dále byl sestrojen graf ukazující závislost odezvy detektoru (výška píku) na hodnotách měrné vodivosti. Výsledky měření odezvy jednotlivých analytů v podobě výšky píku jsou zobrazeny v následujícím grafu (Obrázek 9).

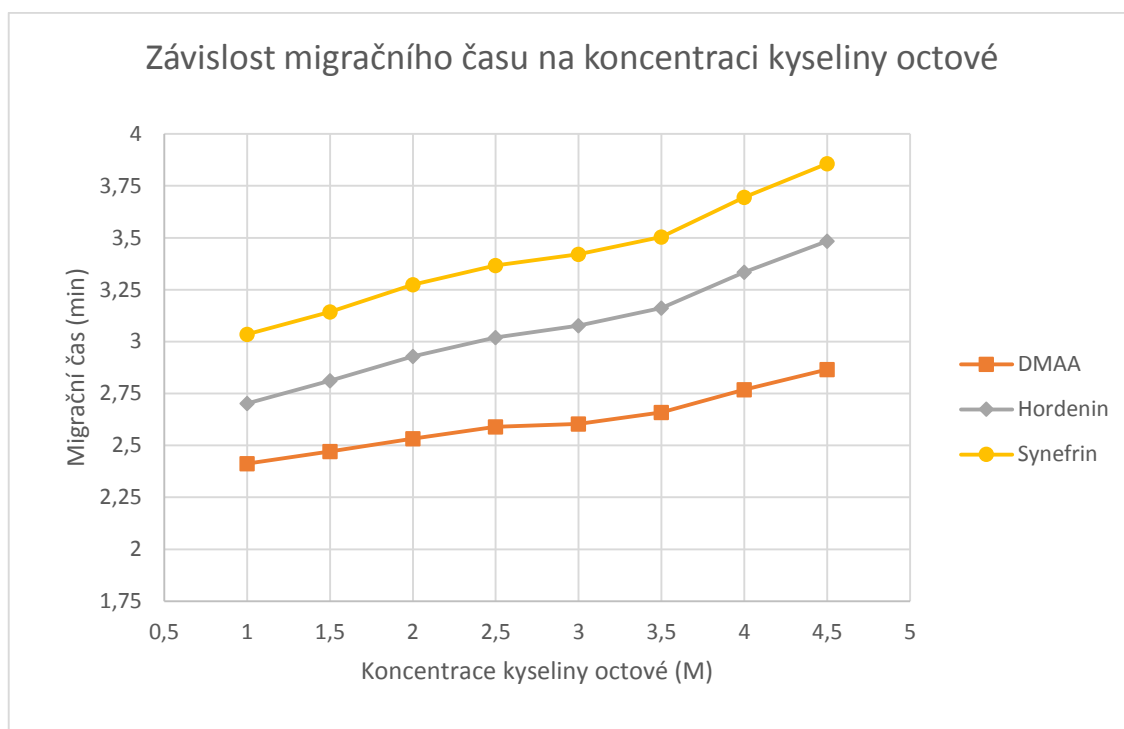
Z grafu je patrné, že citlivost detekce závisí na koncentraci kyseliny a dosahuje maxima kolem koncentrace 1,5 M kyseliny octové.



*Obr. č. 9 Graf – Závislost odezvy na konduktivitě*

Dalším z důležitých parametrů při výběru vhodné koncentrace je rychlost analýzy, jelikož krátké analýzy jsou při nárocích na objem získávaných dat výhodou. Z následujícího grafu (Obrázek 10) je patrné, že se vzrůstající koncentrací kyseliny se prodlužoval migrační čas analytů, přičemž nejdelší celkový čas analýzy nepřekročil 4 minuty.





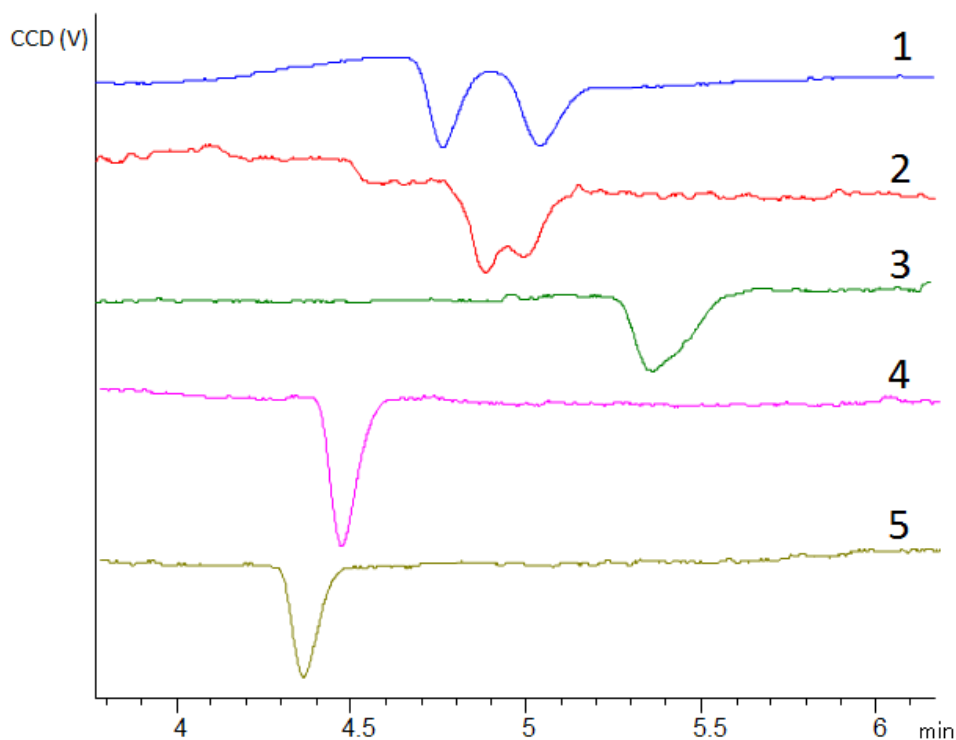
Obr. č. 10 Graf – Závislost migračního času na koncentraci kyseliny octové

Po přihlédnutí ke všem faktorům (odezva detektoru, rychlost analýzy) byla jako optimální zvolena koncentrace kyseliny octové 2 M.

### 5.1.3. Vliv přídavku cyklodextrinů

Při optimalizaci složení elektrolytu byl zkoušen i vliv přídavku chirálních selektorů, v našem případě cyklodextrinů, na parametry separace, jako např. migrační čas a rozlišení, a také na separaci izomerů 1,3-dimetylamylaminu, jelikož se jedná o látku chirální.

Bylo zkoušeno celkem pět běžných a komerčně dostupných druhů cyklodextrinů o koncentraci 20 mM. Na následujících elektroferogramech (Obrázek 11) je vyobrazen vliv jednotlivých elektrolytů na separaci analytu DMAA.



Obr. č. 11 Elektroferogram – vliv přidavku cyklodextrinů na separaci DMAA (1 -  $\alpha$ -CD, 2 -  $\beta$ -CD, 3 – HP-  $\beta$ -CD, 4 –  $\gamma$ -CD, 5 – HP-  $\gamma$ -CD)

Podmínky separace: BGE: 2 M kyselina octová, 15 mM  $\alpha$ -CD; kapilára - vnitřní průměr 50  $\mu$ m, efektivní délka 8 cm; teplota 25 °C a napětí 30 kV, vodivostní detekce

Z elektroferogramů je jasně patrné, že jediné vhodné ze zkoušených prostředí pro chirální separaci DMAA je  $\alpha$ -cyklodextrin. Za těchto podmínek byly píky izomerů rozděleny na základní linii v čase kratším než 5,5 minuty.

Poté, co byl zvolen jako nejvhodnější chirální selektor  $\alpha$ -cyklodextrin, byla optimalizována jeho koncentrace v BGE. Bylo testováno celkem pět koncentračních hladin v rozmezí 10-30 mM. Výsledky měření zaměřené na rozlišení píků jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tab. č. 6 Optimalizace koncentrace  $\alpha$ -CD - rozlišení

Koncentrace $\alpha$ -CD (mM)	Rs DMAA1-DMAA2	Rs DMAA2-Hordenin	Rs Hordenin-Synefrin
10	-	1,1	1,3
15	0,5	0,7	1,3
20	0,8	0,5	1,3
25	0,7	-	1,1
30	0,5	-	1,0

Hodnoty rozlišení některých analytů u krajních hodnot koncentrací nebylo možné vypočítat, jelikož jednotlivé píky se smývaly v jeden. Předběžné výsledky analýzy v prostředí 3,5 M kyseliny octové s přidavkem cyklodextrinu neposkytovaly optimální výsledky z hlediska rozlišení. V dalších krocích optimalizace se ovšem osvědčila 15 mM  $\alpha$ -CD s 2 M kyselinou octovou ( $R_s \geq 0,9$ ).

Hodnoty rozlišení izomerů DMAA neodpovídají lékopisným normám. Chirální separace DMAA ale nebyla cílem této práce, proto tyto hodnoty již nebyly dále optimalizovány.

#### 5.1.4. Výběr vnitřního standardu

Jako potenciální vnitřní standard byly testovány dvě látky strukturně podobné DMAA a androgenním aminům, a to efedrin a arginin. Při výběru bylo důležité, aby vnitřní standard migroval podobně jako ostatní analyty a neprodlužoval tak dobu analýzy, ale zároveň dostatečně odděleně, aby byly získány píky s dostatečně vysokým rozlišením. Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tabulce 7, 8 a 9.

Tab. č. 7 Optimalizace vnitřního standardu – migrační čas

IS	$t_m$ (min)
efedrin	2,34
arginin	2,20

Tab. č. 8 Optimalizace vnitřního standardu – rozlišení arginin

$R_s$ Arginin/DMAA1	$R_s$ DMAA1/DMAA2	$R_s$ DMAA2/Hordenin	$R_s$ Hordenin/Synefrin
4,4	0,9	1,3	2,0

Tab. č. 9 Optimalizace vnitřního standardu – rozlišení efedrin

$R_s$ DMAA1/DMAA2	$R_s$ DMAA2/Hordenin	$R_s$ Hordenin/Efedrin	$R_s$ Efedrin/Synefrin
0,9	1,2	1,2	0,9

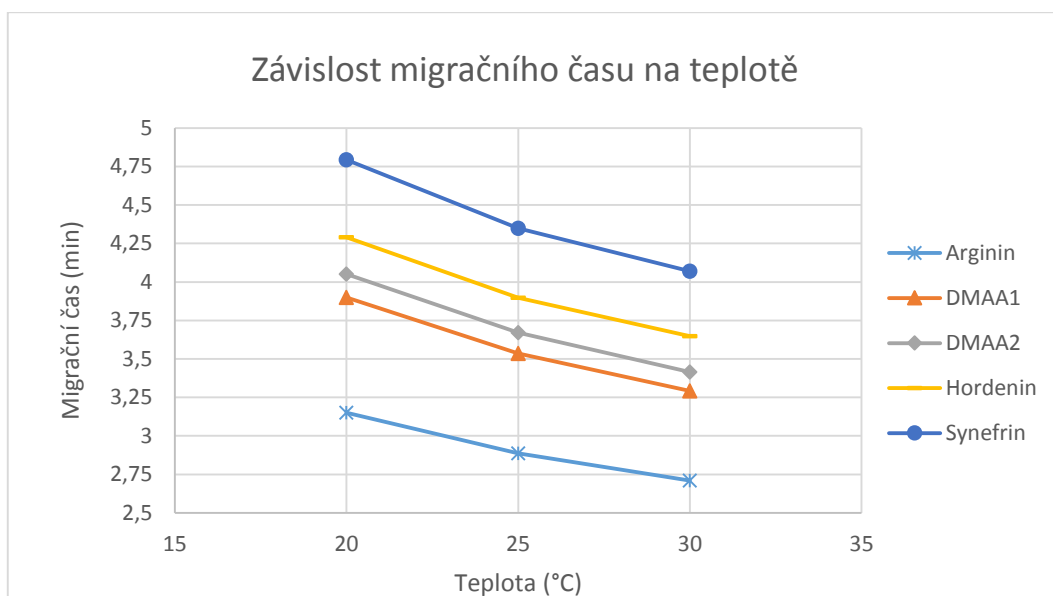
Jako vnitřní standard byl po analýze zvolen arginin. Je dobře separován od ostatních analytů, nedochází ke splývání píků a jeho migrační čas neprodlužuje dobu analýzy.

### 5.1.5. Optimalizace teploty

Vliv teploty byl sledován se směsí všech analytů a vnitřního standardu v rozmezí 20-30 °C. Pro každou teplotu byly zaznamenány migrační časy jednotlivých analytů a tyto jsou uvedeny v Tabulce 10 a na Obrázku 12.

Tab. č. 10 Optimalizace teploty – migrační časy [min]

Teplota (°C)	t <sub>m</sub> arginin	t <sub>m</sub> DMAA1	t <sub>m</sub> DMAA2	t <sub>m</sub> hordenin	t <sub>m</sub> synefrin
20	3,15	3,90	4,05	4,29	4,79
25	2,89	3,53	3,67	3,90	4,35
30	2,71	3,29	3,41	3,65	4,07



Obr. č. 12 Graf – Závislost migračního času na teplotě

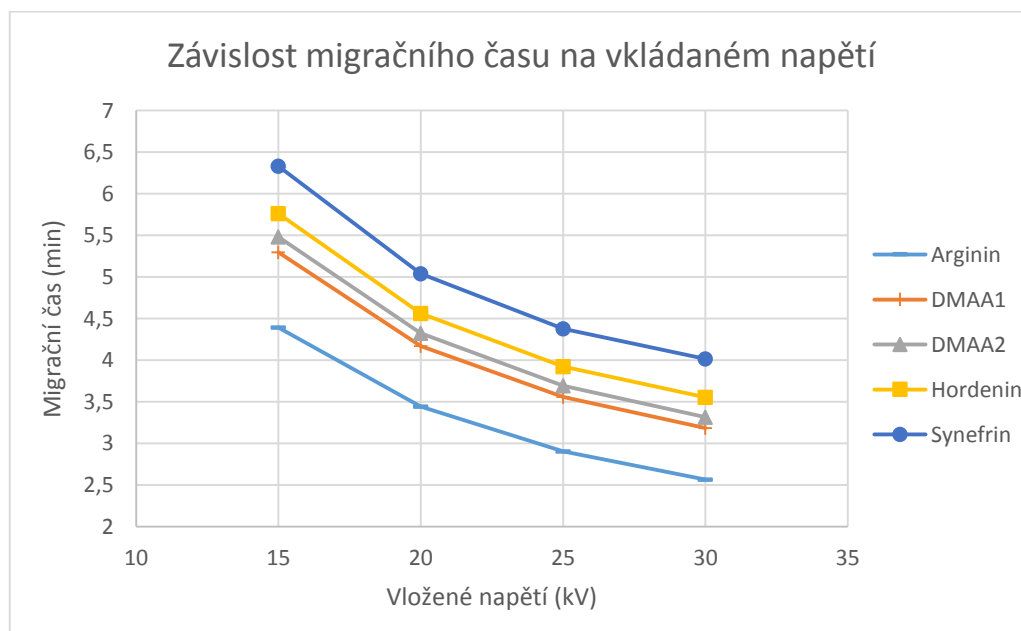
Cílem bylo dosažení co nejkratší doby analýzy. Při porovnání hodnot migračních časů pro nejnižší (20°C) a nejvyšší (30°C) testované teploty byl nejvýraznější rozdíl pozorován pro synefrin, a to přibližně 45 s. Vzhledem k nevýraznému rozdílu byla jako optimální zvolena laboratorní teplota 25 °C.

### 5.1.6. Optimalizace vkládaného napětí

Změny migračních časů v závislosti na vkládaném napětí byly vyhodnoceny pro všechny analyty včetně vnitřního standardu. Testovaný rozsah byl 15-30 kV. Zaznamenané migrační časy všech analytů i vnitřního standardu a jsou uvedeny v Tabulce 11 a na Obrázku 13.

Tab. č. 11 Optimalizace vkládaného napětí – migrační časy [min]

Napětí (kV)	$t_m$ arginin	$t_m$ DMAA1	$t_m$ DMAA2	$t_m$ hordenin	$t_m$ synefrin
15	4,39	5,30	5,48	5,76	6,33
20	3,44	4,17	4,32	4,56	5,04
25	2,90	3,56	3,70	3,92	4,38
30	2,57	3,19	3,32	3,55	4,02



Obr. č. 13 Graf - Závislost migračního času na vkládaném napětí

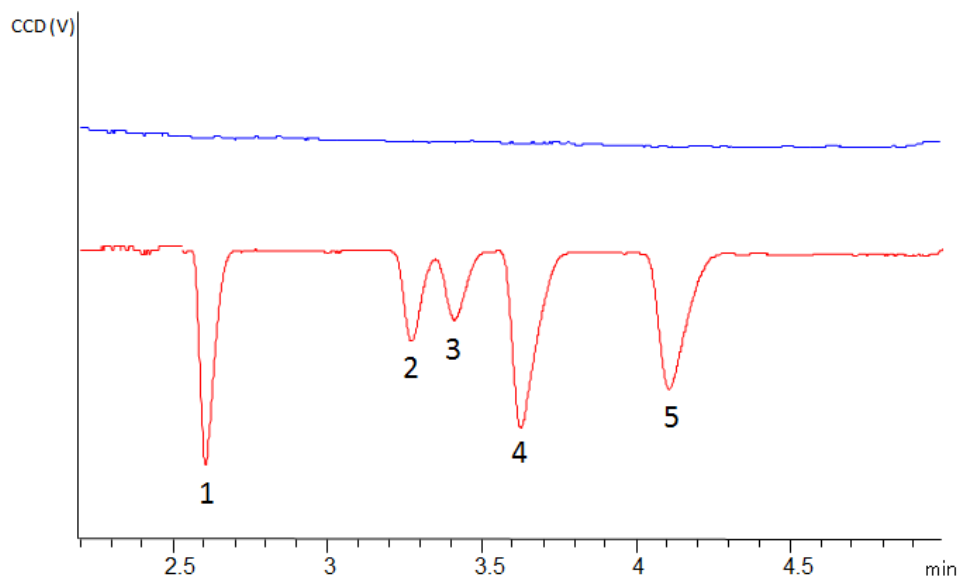
S rostoucím napětím se zkracovala doba analýzy při zachovaném rozlišení analytů. Proto byla pro naši metodu zvolena hodnota vkládaného napětí 30 kV, při kterém byly všechny analyty separovány v čase < 4,5 minuty.

### 5.1.7. Optimální podmínky

Byly stanoveny optimální podmínky analýzy pro separaci DMAA, hordeninu a synefrinu. Jsou uvedeny v následující přehledové Tabulce 12. Na Obrázku 14 je elektroferogram vyobrazující separaci analytů za optimálních podmínek.

Tab. č. 12 Optimální podmínky analýzy

Optimální podmínky	
Kapilára	křemenná, 58 cm, 50 $\mu\text{m}$
BGE	15 mM $\alpha$ -CD v 2 M kyselině octové
Teplota	25°C
Vložené napětí	30 kV
Detekce	CCD



Obr. č. 14 Elektroferogram – optimální podmínky (Pořadí analytů – 1 – Arginin, 2, 3 – DMAA, 4 – Hordenin, 5 – Synefrin)

Podmínky separace: BGE: 2 M kyselina octová, 15 mM  $\alpha$ -CD; kapilára - vnitřní průměr 50  $\mu$ m, efektivní délka 8 cm; teplota 25 °C a napětí 30 kV, vodivostní detekce

## 5.2. Validace analytické metody

### 5.2.1. Test vhodnosti systému

#### 5.2.1.1. Účinnost systému

Účinnost systému se vyjadřuje jako zdánlivý počet teoretických pater (N). Hodnoty pro všechny analyty byly získány a vypočteny z šesti opakovaných měření pracovních roztoků pro kalibraci. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 13.



Tab. č. 13 Účinnost systému - zdánlivý počet teoretických pater

Analyt	$t_m$	$Wh_{1/2}$	N
IS-Arginin	3,64	0,09	9079
DMAA1	4,63	0,10	11874
DMAA2	4,66	0,11	10238
Hordenin	4,96	0,08	24252
Synefrin	5,62	0,07	34081

### 5.2.1.2. Faktor symetrie píkú

Faktor symetrie píkú vyjadřuje jejich tvar a jeho ideální hodnota je rovna jedné. Lékopis povoluje mírné asymetrické odchylky, a to v rozmezí hodnot 0,8-1,5. Výsledné hodnoty pro všechny analyty byly naměřeny z šesti opakovaných měření pracovních roztoků pro kalibraci a jsou uvedeny v Tabulce 14.

Tab. č. 14 Faktor symetrie píkú

Analyt	As
IS-Arginin	1,2
DMAA	1,2
DMAA	1,1
Hordenin	1,3
Synefrin	1,2

Hodnoty faktoru symetrie píku všech analytů se pohybují mírně přes jednu, což dokazuje jejich mírnou asymetrii. Hodnoty ale leží v rozmezí požadovaném lékopisem.

### 5.2.1.3. Rozlišení píků

Rozlišení vyjadřuje míru separace dvou sousedních píků na základní linii. Požadavek Českého lékopisu je  $R_s \geq 1,5$ . Všechny hodnoty byly získány a vypočítány z šesti opakovaných měření pracovních roztoků pro kalibraci. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tab. č. 15 Rozlišení píků

Analyty	$R_s$
IS (Arginin)-DMAA1	6,1
DMAA1-DMAA2	0,9
DMAA2-Hordenin	2,0
Hordenin-Synefrin	5,3

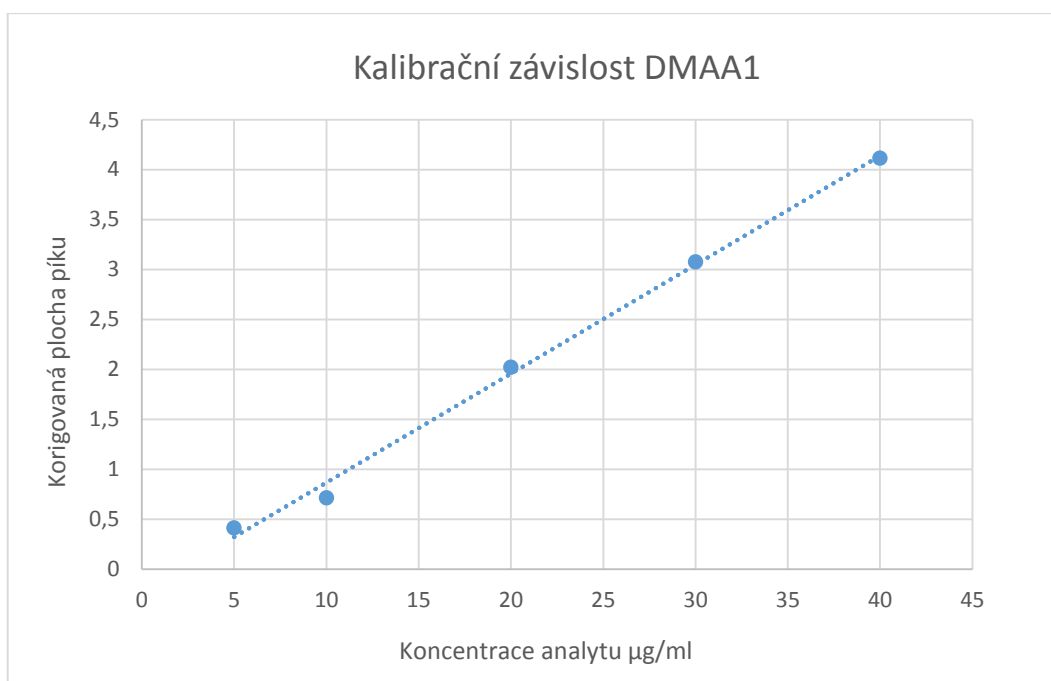
Rozlišení dvou izomerů analytu 1,3-dimethylamylaminu není vyhovující dle lékopisných norem. Chirální separace této látky však nebyla cílem této práce, proto na nevyhovující rozlišení nebyl kladen důraz a nebylo dále optimalizováno. Všechny ostatní píky analytů jsou rozděleny na základní linii s rozlišením  $\geq 2,0$ .

### 5.2.2. Linearita

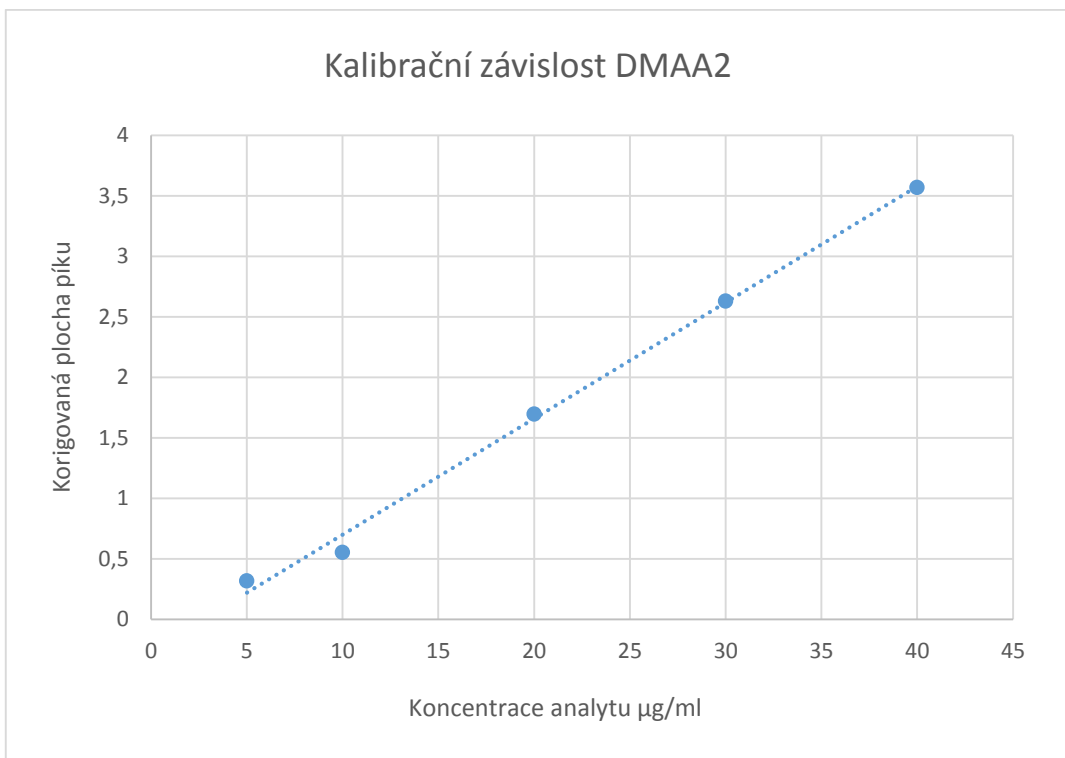
Linearita byla stanovena na základě měření pěti kalibračních roztoků v koncentračním rozmezí všech analytů 5  $\mu\text{m/ml}$  - 40  $\mu\text{m/ml}$ . Každý roztok byl nastříknut na kolonu šestkrát a z těchto šesti nástřiků byla vypočítána průměrná korigovaná hodnota plochy pod píkem pro každý analyt. Kalibrační závislost byla vyhodnocena pomocí metody lineární regrese. Následně byly vypočítány také limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ).

Kalibrační závislosti pro jednotlivé analyty jsou znázorněny na Obrázku 15, 16 17 a 18.

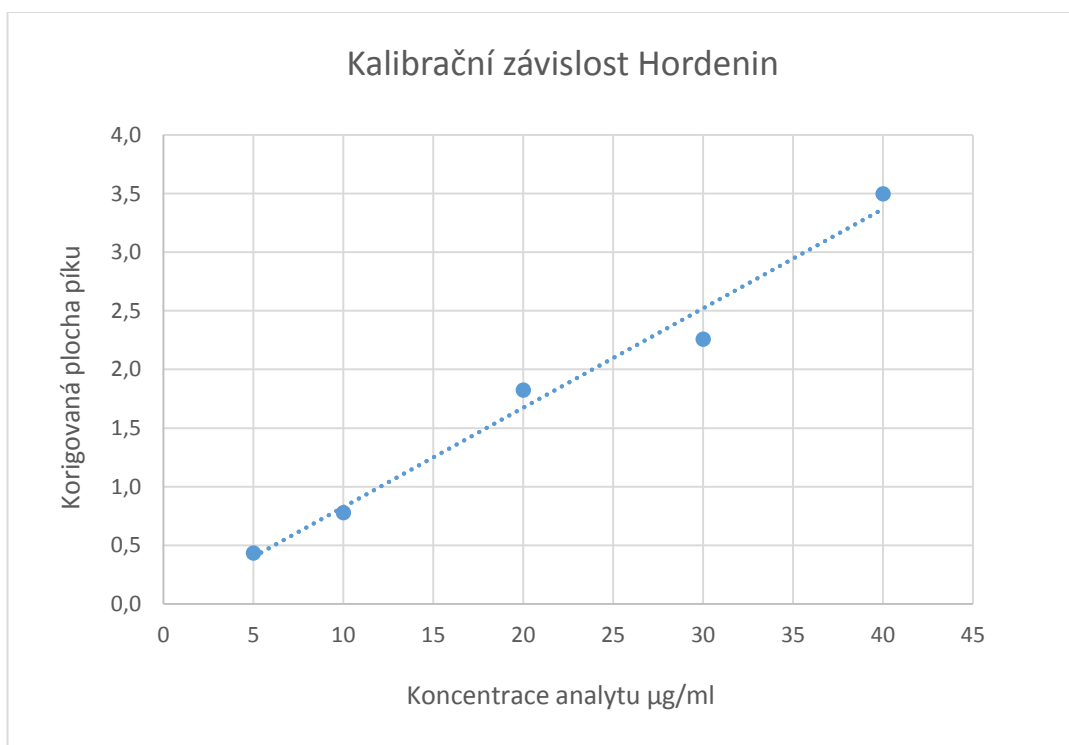
Výsledky měření kalibrační závislosti a hodnoty LOD/LOQ jsou uvedeny v přehledové Tabulce 16.



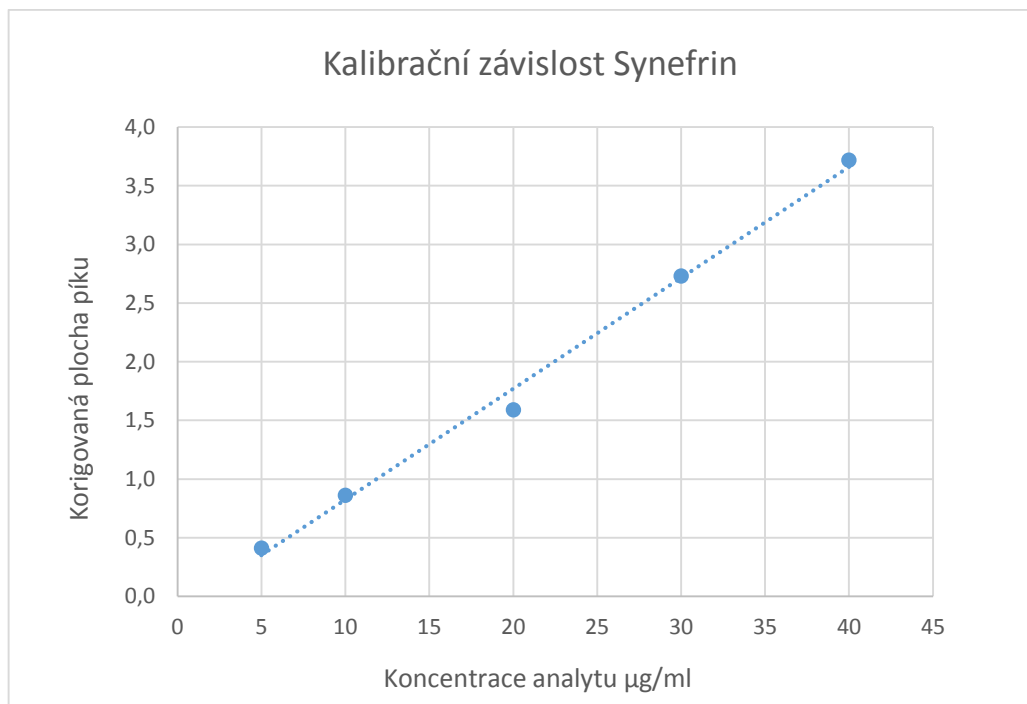
Obr. č. 15 Graf – Kalibrační závislost DMAA1



Obr. č. 16 Graf – Kalibrační závislost DMAA2



Obr. č. 17 Graf – Kalibrační závislost Hordenin



Obr. č. 18 Graf – Kalibrační závislost Synefrinu

Tab. č. 16 Přehled výsledků měření kalibrační závislosti

Analyt	Rozsah koncentrace (µg/ml)	LOD/LOQ (µg/ml)	Rovnice kalibrační přímky	Hodnota spolehlivosti R
DMAA1	5,0-40,0	0,22/0,66	$y = 0,9771x - 0,8646$	0,9875
DMAA2	5,0-40,0	0,20/0,62	$y = 0,8574x - 0,8162$	0,9861
Hordenin	5,0-40,0	0,27/0,83	$y = 0,7609x - 0,5246$	0,9825
Synefrin	5,0-40,0	0,33/1,00	$y = 0,8481x - 0,6803$	0,9876

Kalibrační závislost byla u všech analytů lineární, s hodnotou korelačního koeficientu  $\geq 0,9825$ . Nejlepších hodnot LOD (0,20 µg/ml) bylo dosaženo u jednoho z izomerů DMAA.

### 5.2.3. Opakovatelnost migračních časů a ploch píků

Opakovatelnost je vyjádřena hodnotou relativní směrodatné odchylky. Všechny hodnoty byly získány z šesti opakovaných měření pracovních roztoků pro kalibraci a byly vyhodnoceny na třech koncentračních hladinách, a to 5 µg/ml, 10 µg/ml a 40 µg/ml. Výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 17, 18 a 19.

Tab. č. 17 Opakovatelnost korigovaných ploch a migračních časů pro C = 5 µg/ml

C = 5 µg/ml n=3	Průměr ploch	SD	RSD %	Migrační čas	SD	RSD %
DMAA1	0,4108	0,0035	0,86	4,3	0,0099	0,23
DMAA2	0,3172	0,0080	2,51	4,8	0,0301	0,63
Hordenin	0,4333	0,0033	0,77	5,2	0,0363	0,71
Synefrin	0,4126	0,0036	0,86	5,8	0,0504	0,87

Tab. č. 18 Opakovatelnost korigovaných ploch a migračních časů pro C = 10 µg/ml

C = 10 µg/ml n=3	Průměr ploch	SD	RSD %	Migrační čas	SD	RSD %
DMAA1	0,7127	0,0065	0,91	4,3	0,0043	0,1
DMAA2	0,5660	0,0179	3,17	4,5	0,0039	0,07
Hordenin	0,7780	0,0192	2,47	4,7	0,0012	0,03
Synefrin	0,8563	0,0139	1,63	5,8	0,0233	0,4

Tab. č. 19 *Opakovatelnost korigovaných ploch a migračních časů pro C = 40 µg/ml*

C = 40 µg/ml n=3	Průměr ploch	SD	RSD %	Migrační čas	SD	RSD
DMAA1	4,1252	0,0459	1,11	4,7	0,0813	1,7
DMAA2	3,4440	0,0283	0,79	5,2	0,0756	1,44
Hordenin	3,5236	0,0331	0,94	5,7	0,0908	1,59
Synefrin	3,5966	0,0633	1,76	6,6	0,1204	1,83

#### 5.2.4. Přesnost

Pro vyhodnocení přesnosti byl analyzován roztok vzorku přípravku Synephrine- REDUKT.

Bylo připraveno celkem šest roztoků vzorku. Každý roztok byl na kolonu nastříknut třikrát. Z ploch píků všech tří nástřiků byla vypočtena průměrná hodnota a ta byla přepočítána na přibližně přesnou navážku 0,1500 g a korigována průměrem ploch vnitřního standardu. Výsledky jsou uvedené v následující Tabulce 20.

Tab. č. 20 Přesnost metody – Synephrine REDUKT

Přesnost	Synefrin
Průměry ploch	1,7841
	1,8105
	1,8429
	1,7812
	1,7989
Průměr	1,8035
SD	0,0223
RSD %	1,24

### 5.2.5. Správnost

Pro vyhodnocení správnosti byla použita metoda standardního přidavku. Bylo analyzováno pět roztoků vzorků přípravku Synephrine-REDUKT, pět roztoků vzorků přípravku s přidavkem standardu a roztok samotného standardu. Každý roztok byl nastříknut třikrát.

Pro výpočet správnosti (výtěžnosti) byly použity průměrné korigované hodnoty ploch píků každého pracovního roztoku vzorku pro správnost, průměrné korigované hodnoty ploch píků získané z měření roztoků vzorků pro přesnost a průměrné korigované hodnoty ploch píků získané měřením standardu. Hodnoty byly přepočítány na přibližně přesnou navážku 0,025g a výtěžnost byla vypočtena podle Vzorce 4.

$$R_i = \frac{C_{vz+std} - C_{vz}}{C_{std}} * 100 \quad (4)$$



$C_{vz+st}$  je koncentrace roztoku vzorku s přidavkem standardu vypočítaná z průměru ploch píků roztoků vzorku pro správnost,  $C_{vz}$  je koncentrace roztoku vzorku vypočítaná z průměru ploch píků roztoku vzorku pro přesnost a  $C_{st}$  je koncentrace roztoku standardu vypočítaná z průměru ploch píků roztoku standardu.

Výsledné hodnoty analýzy přípravku jsou uvedeny v Tabulce 21.

Tab. č. 21 *Správnost metody – Synephrine-REDUKT*

Správnost	Synefrin
Průměrná hodnota výtěžnosti (%)	105,8
SD	2,96
RSD (%)	2,80

### 5.2.6. Robustnost

Pro identifikaci statisticky významných efektů byl použit Dongův algoritmus tak jak je popsán Vander Heydenem. [36]

Nebyl zjištěn žádný statisticky významný vliv na stanovení synefrinu v přípravku Synephrine-REDUKT pokud jde o toleranci chyb (ME; kritický efekt) na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Proto může být tento způsob v rozsahu určeném extrémními hodnotami faktorů považován za robustní pro stanovení hlavních účinných složek v potravinových doplňcích.

Stejný přístup byl použit pro vyhodnocení efektu vybraných faktorů na parametry SST. Pro sledované extrémní hodnoty faktorů nebyly zjištěny žádné statisticky významné účinky na kvalitativní parametry separace (N, As a Rs) viz Tabulka 22.

Tab. č. 22 Účinky testovaných faktorů na kvalitativní parametry separace (N, As, Rs)

Faktor	A	B	C	D	E	F	G	Kritický efekt	
								$\alpha=0,05$	$\alpha=0,1$
Odezva	Efekt								
% Syn	0,0001	-0,0001	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000	-0,0001	0,0002	0,0002
As (DMAA1)	0,0221	-0,0170	0,0023	0,0003	-0,0003	-0,0217	-0,0023	0,0492	0,0378
As (DMAA2)	-0,0323	0,0424	-0,0041	0,0230	-0,0038	-0,0023	-0,0308	0,0590	0,0473
As (Hor)	0,0000	-0,0017	0,0009	0,0378	0,0086	0,0168	-0,0282	0,0508	0,0403
As (Syn)	0,0131	0,0059	-0,0175	-0,0126	0,0378	-0,0142	0,0106	0,0439	0,0352
Rs (IS-DMAA1)	0,4223	0,1725	0,2225	0,2009	0,0716	0,1796	-0,0068	0,6847	0,5486
Rs (DMAA1-DMAA2)	0,3518	-0,3234	0,3662	0,0057	0,0209	0,0471	-0,0830	0,7273	0,5827
Rs (DMAA2-Hor)	0,3790	0,5509	0,3907	-0,3451	0,0998	-0,1358	-0,2448	-0,2448	0,6434
Rs (Hor-Syn)	-0,3234	0,3662	0,0471	0,0209	-0,0830	0,0057	0,0161	0,5731	0,4493
N (DMAA1)	405	593	751	-612	0	231	0	1423	1140
N(DMAA2)	1019	223	-726	-39	63	1602	914	2003	1605
N (Hor)	1237	-256	-991	-780	149	906	570	1865	1494
N (Syn)	1408	1943	1384	-1166	867	-988	-1122	3098	2482

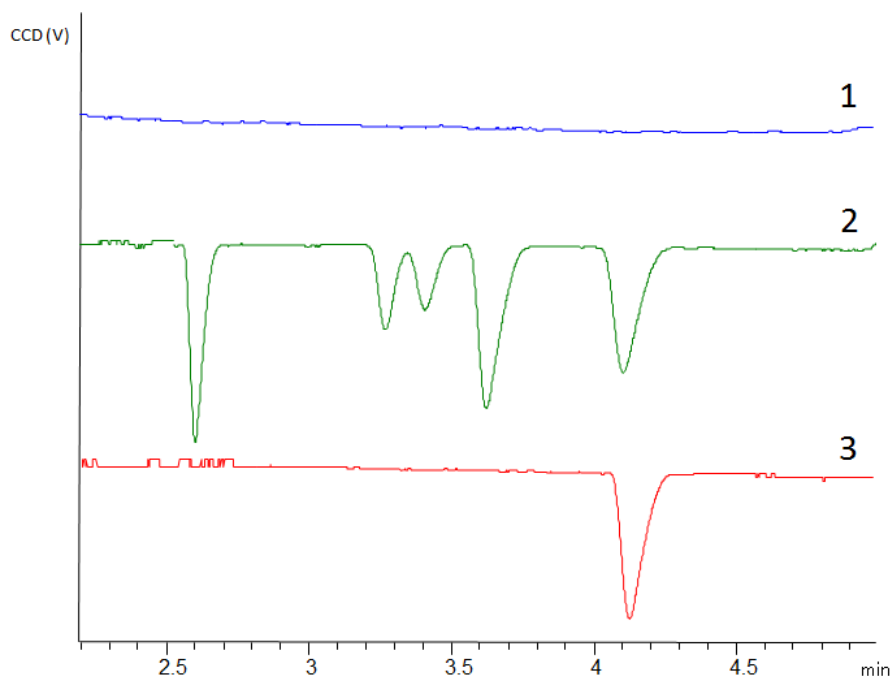
### 5.2.7. Analýza potravinových doplňků-stanovení obsahu účinných látek

Optimalizovaná a validovaná metoda byla použita pro stanovení obsahu účinných látek v přípravku Synephrine-REDUKT. Celkem bylo analyzováno šest roztoků vzorku pro přesnost a každý z nich byl nastříknut třikrát. Naměřené hodnoty byly korigovány vnitřním standardem, z korigovaných ploch byl vypočítán průměr, přepočítán na přibližně přesnou navážku 0,02 g a následně stanoven obsah látek v přípravku. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 23 a na Obrázku 19.

Tab. č. 23 Stanovení obsahu účinných látek

Stanovení obsahu	Synefrin
Deklarovaný obsah mg/tbl.	10,0
Obsah stanovený v přípravku Synephrine-REDUKT	15,3
% deklarovaného množství	153,00

Obsahu synefrinu v potravinovém doplňku Synephrine-REDUKT činil 153,0 % deklarovaného obsahu.



Obr. č. 19 Elektroferogram - stanovení obsahu účinných látek v přípravku Synephrine-REDUKT (1 – blank, 2 – standardy, 3 – analyzovaný přípravek)

Podmínky separace : BGE: 2 M kyselina octová, 15 mM  $\alpha$ -CD; kapilára - vnitřní průměr 50  $\mu$ m, efektivní délka 8 cm; teplota 25 °C a napětí 30 kV, vodivostní detekce

## 6. Závěr

Byla vyvinuta, optimalizována a validována kapilárně elektroforetická metoda s bezkontaktní vodivostní detekcí pro současné stanovení DMAA, synefrinu a hordeninu v doplňcích stravy na podporu hubnutí. Metoda byla aplikována na stanovení obsahu synefrinu v produktu Synephrine-REDUKT. V rámci validace metody byla otestována také její robustnost.

V experimentální části této práce byly stanoveny následující optimální podmínky. Byla použita 58 cm dlouhá křemenná kapilára (efektivní délka 10 cm při nástřiku na krátký konec) o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , základním elektrolytem byl roztok 2 M kyseliny octové s přidavkem 15 mM  $\alpha$ -cyklodextrinu, teplota při analýze byla 25°C a vložené napětí bylo 30 kV. Vzorky byly nástřikovány hydrodynamicky (50 mbar) na krátký konec kapiláry.

Kalibrační závislost byla u všech analytů lineární v rozsahu 5 – 40  $\mu\text{g/ml}$ , s hodnotou korelačních koeficientů  $R \geq 0,9825$ . Opakovatelnost migračních časů a ploch píků vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka měřena na třech koncentračních hladinách nepřekročila hodnotu 1,83 %.

Hodnoty N a  $A_s$  se pohybovaly v rozsahu 9079 – 34081 pro počet teoretických pater a 1,1 – 1,3 pro asymetrii píků. Rozlišení mezi píky bylo větší než 0,9 pro enantiomery DMAA a větší než 2,0 pro ostatní analyty.

Přesnost vyjádřená jako % RSD byla stanovena pro přípravek Synephrine-REDUKT s deklarovaným obsahem synefrinu; měla hodnotu 1,24 % ( $n = 6$ ). Výtěžnost metody ověřena metodou standardního přidavku byla 105,8 % a RSD činila 2,8 %.

Testována byla také robustnost metody, která neprokázala žádný významný vliv změn podmínek analýzy na kvantitativní i kvalitativní výsledky měření, a proto je možné považovat metodu za dostatečně robustní.

Bylo provedeno také stanovení účinných látek v potravinovém doplňku Synephrine-REDUKT. V přípravku nebyl detekován žádný z dalších cílených analytů (DMAA, hordenin). Obsah synefrinu v jedné tabletě odpovídal asi 15 mg, což odpovídá asi 150 % deklarovaného obsahu. Vzhledem k vysokému

nalezenému množství by bylo vhodné analyzovat i ostatní přípravky vyskytující se na trhu, případně výsledky ověřit jinou separační metodou.

Výhledově by pak bylo vhodné zaměřit se na výběr chirálního selektoru pro lepší separaci izomerů DMAA a jejich identifikaci, která by přispěla k určení původu (přírodního nebo syntetického) synefrinu.

## 7. Literatura

1. DE CARVALHO, L. M., MARTINI, M., MOREIRA, A. P. L., DE LIMA, A. P. S., CORREIA, D., FALCAO, T., GARCIA, S. C., DE BAIRROS, A. V., DO NASCIMENTO, P. C., BOHRER, D. Presence of synthetic pharmaceuticals as adulterants in slimming phytotherapeutic formulations and their analytical determination, *Forensic Science International* 2011, 204, 6-12
2. CIANCHINO, V., ACOSTA, G., ORTEGA, C., MARTINEZ, L. D., GOMEZ, M. R. Analysis of potential adulteration in herbal medicines and dietary supplements for the weight control by capillary electrophoresis, *Food Chemistry* 2008, 108, 1075-1081
3. DE CARVALHO, L. M., COHEN, P. A., SILVA, C. V., MOREIRA, A. P. L., FALCAO, T. M., DAL MOLIN, T. R., ZEMOLIN, G., MARITNI, M. A new approach to determining pharmacologic adulteration of herbal weight loss products, *Food Additives & Contaminants* 2012, 29, 1661-1667
4. MOREIRA, A. P. L., MOTTA, M. J., DAL MOLIN, T. R., VIANA C., DE CARVALHO, L. M. Determination of diuretics and laxatives as adulterants in herbal formulations for weight loss, *Food Additives & Contaminants* 2013, 30, 1230-1237
5. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ. MZ: Ministerstvo zdravotnictví [online]. MZ, ©2006 [cit. 2010-04-01]. Dostupné z: [http://www.mzcr.cz/kvalitaabezpeci/obsah/varovani-potraviny-obsahujici-latku-dmaa\\_2595\\_29.html](http://www.mzcr.cz/kvalitaabezpeci/obsah/varovani-potraviny-obsahujici-latku-dmaa_2595_29.html)
6. USA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA: Food and drug administration [online]. FDA, ©2006 [cit. 2010-04-01]. Dostupné z: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm302133.htm>
7. ZHANG, Y., WOODS, R. M., BREITBACH, Z. S., ARMSTRONG, D. W. 1,3-Dimethylamylamine (DMAA) in supplements and geranium products: natural or synthetic?, *Drug Testing Analysis* 2012, 4, 986-990
8. DI LORENZO, CH., MORO, E., DOS SANTOS, A., UBERTI, F., RESTANI, P. Could 1,3 dimethylamylamine (DMAA) in food supplements have a natural origin?, *Drug Testing Analysis* 2013, 5, 116-121



9. PŘIBYLKA, A., ŠVIDRNOCH, M., MAIER V. Enantioseparation of 1,3-dimethylamylamine and 1,4-dimethylamylamine by capillary electrophoresis with mass spectrometry, *Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc*
10. DMAA. In: *National Library of Medicine* [online]. [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: [https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/352/3422085/PMC3422085\\_aci-7-2012-047f1.png](https://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/352/3422085/PMC3422085_aci-7-2012-047f1.png)
11. SMITH, T. B., BRIAN, A. S., NATARAJAN, G. M., LASORDA, D. M., POORNIMA, I. G. Acute myocardial infarction associated with dietary supplements containing 1,3-dimethylamylamine and *Citrus aurantium*, *Case reports* 2014, 41, 1
12. ELSOHLY, M. A., GUL, W., ELSOHLY, K. M., MURPHY, T. P., WEERASOORIYA, A., CHITTIBOYINA, A. G., AVULA, B., KHAN, I., EICHNER, A., BOWERS, L. D. Pelargonium Oil and Methyl Hexaneamine (MHA): Analytical Approaches Supporting the Absence of MHA in Authenticated *Pelargonium graveolens* Plant Material and Oil, *Journal of Analytical Toxicology* 2012, 36, 457-471
13. PELLATI, F., BENVENUTI, S. Chromatography and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in *Citrus aurantium*, *Journal of Chromatography A* 2007, 1161, 71-88
14. Octopamine. In: *Examine* [online]. Examine.com , © 2011 - 2016 [cit. 2016-04-01]. Dostupné z: <https://examine.com/supplements/Octopamine/>
15. DI LORENZO, CH., DOS SANTOS, A., COLOMBO, F., MORO, E., DELL'AGLI, M., RESTANI, P. Development and validation of HPLC method to measure active amines in plant food supplements containing *Citrus aurantium* L., *Food Control* 2014, 46, 136-142
16. VIANA, C., ZEMOLIN, G. M., LIMA, F. O., DE CARVALHO, L. M., BOTTOLI, C. B. G., LIMBERGER, R. P. High-performance liquid chromatographic analysis of biogenic amines in pharmaceutical products containing *Citrus aurantium*, *Food Additives & Contaminants* 2013, 30, 634-642
17. AVULA, B., UPPARAPALLI, S. K., KHAN, I. A. Enantiomeric Separation of Adrenergic Amines in *Citrus* Species, Related Genera and Dietary

- Supplements by Capillary Electrophoresis, *Chromatographia* 2005, 62, 151-157
18. PAZOUREK, Jiří. *Moderní elektroforetické analytické metody* [online]. PAZOUREK JIŘÍ ©2003 [cit. 10. 4. 2016]. Dostupné z: <https://faf.vfu.cz/pub-files/ustavy/ustav-chemickych-leciv/vyuka-predmetu/analyticka-chemie-ii/separacni-metody---elektroforeza.pdf>
  19. LAUER, Henk H. and Gerard P. ROZING. *High Performance Capillary Electrophoresis*. Germany, 2014. Publication number 5990-3777EN
  20. GAŠ, B. Kapilární elektroforéza, Separační analytická metoda pro věk mikročipů. *Vesmír* 2001, 80, 370-373
  21. SVOBODOVÁ, K. *Stanovení aminokyselin pomocí kapilární elektroforézy s vodivostní detekcí*. Brno, 2012. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav Biochemie.
  22. Kapilární elektroforéza. In: *Biochemie.sweb.cz* [online]. [cit. 2016-04-01]. Dostupné z: <http://biochemie.sweb.cz/x/metody/foto/elektroforeza/kapilarni.jpg>
  23. ŠOLÍNOVÁ, V., KAŠIČKA, V. Recent applications of conductivity detection in capillary and chip electrophoresis, *Journal of Separation Science* 2006, 29, 1743-1762
  24. KUBÁŇ, P., HAUSER, P. C. Capacitively coupled contactless conductivity detection for microseparation techniques – recent developments, *Electrophoresis* 2011, 32, 30-42
  25. KUBÁŇ, P., HAUSER, P. C. Contactless Conductivity Detection in Capillary Electrophoresis: A Review, *Electroanalysis* 2004, 16, 24
  26. MÁLKOVÁ, K. *Velmi rychlá elektroforetická stanovení klinicky významných látek v tělních tekutinách*. Praha, 2010. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie.
  27. TŮMA, P., SAMCOVÁ, E. Rychlé elektroforetické stanovení močové kyseliny v alantoické tekutině s dávkováním z krátkého konce kapiláry, *Chemické Listy* 2009, 103, 919–923
  28. LE, R., YOUNG, J. E., PESEK, J. J., MATYSKA, M. T. Separation of 1,3-dimethylamylamine and other polar compounds in dietary supplements

- formulation using aqueous normal phase chromatography with MS, *Journal of Separation Science* 2013, 36, 2578-2583
29. HORSKÝ, J., JINDŘICH, J. Cyklodextriny ve světě polymerů, *Chemické listy* 2013, 107, 769-776
30. PETR, J., MAIER, V., HORÁKOVÁ, J., TESAŘOVÁ E., ŠEVČÍK, J. Jak se neokrát o úspěšnou chirální separaci kapilární elektroforézou, *Chemické listy* 2005, 99, 190-194
31. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY. *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.
32. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. *ICH: Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)* [online]. ICH, ©2005 [cit. 2016-04-010]. Dostupné z: [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
33. SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *Journal of Chromatography A* 2003, 987, 57-66
34. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *EMA: Guideline on bioanalytical method validation* [online]. EMA, ©2014 [cit. 2016-04-010]. Dostupné z: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)
35. POHANKA, M. Základy statistiky laboratorních experimentů, *Vojenské chemické listy* 2010, 79, 60-63
36. VANDER HAYDEN, Y., NIJHUIS, A., SMEYERS-VERBEKE, J., VANDEGINSTE, B. G. M., MASSART, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001, 24, 723-753
37. TŮMA, P., OPEKAR, F., SAMCOVÁ E., ŠTULÍK, K. A comparison of the Properties of Contactless Conductivity and Diode-Array Photometric Detectors in Analyses of Low-Molecular, Biologically Active Substances by

Capillary Electrophoresis in Acetic Acid Solutions, *Electroanalysis* 2008, 20,  
477-484

## 8. Seznam obrázků

Obr. č. 1	Struktura izomerů: 1,3-dimethylamin (1) a.....	15
Obr. č. 2	Biosyntéza synefrinu a hordeninu <sup>[14]</sup> .....	16
Obr. č. 3	Elektroosmotický tok – schéma <sup>[21]</sup> .....	19
Obr. č. 4	Srovnání elektroosmotického toku s laminárním prouděním <sup>[21]</sup> .....	20
Obr. č. 5	Schéma kapilární elektroforézy <sup>[22]</sup> .....	22
Obr. č. 6	Schéma bezkontaktního vodivostního detektoru <sup>[26]</sup> .....	24
Obr. č. 7	Schematické znázornění nástřiku na dlouhý (a) a krátký (b) konec kapiláry, 1-kapilára, 2-detektor, 3,4-zásobníky elektrolytu, 5-vzorek <sup>[27]</sup> .....	26
Obr. č. 8	Struktura $\beta$ -cyklodextrinu <sup>[30]</sup> .....	30
Obr. č. 9	Graf – Závislost odezvy na konduktivitě.....	48
Obr. č. 10	Graf – Závislost migračního času na koncentraci kyseliny octové...	49
Obr. č. 11	Elektroferogram – vliv přídavku cyklodextrinů na separaci DMAA (1 - $\alpha$ -CD, 2 - $\beta$ -CD, 3 – HP- $\beta$ -CD, 4 – $\gamma$ -CD, 5 – HP- $\gamma$ -CD).....	50
Obr. č. 12	Graf – Závislost migračního času na teplotě.....	53
Obr. č. 13	Graf - Závislost migračního času na vkládaném napětí.....	54
Obr. č. 14	Elektroferogram – optimální podmínky (Pořadí analytů – 1 – Arginin, 2, 3 – DMAA, 4 – Hordenin, 5 – Synefrin).....	56
Obr. č. 15	Graf – Kalibrační závislost DMAA1.....	59
Obr. č. 16	Graf – Kalibrační závislost DMAA2.....	60
Obr. č. 17	Graf – Kalibrační závislost Hordenin.....	60
Obr. č. 18	Graf – Kalibrační závislost Synefrinu.....	61
Obr. č. 19	Elektroferogram - stanovení obsahu účinných látek v přípravku Synephrine-REDUKT (1 – blank, 2 – standardy, 3 – analyzovaný přípravek).....	69

## 9. Seznam tabulek

<i>Tab. č. 1 Stručný přehled metod pro stanovení DMAA, synefrinu a hordeninu</i>	29
<i>Tab. č. 2 Příprava pracovních roztoků pro kalibraci</i>	42
<i>Tab. č. 3 Plackett-Burman design – plán experimentů</i>	44
<i>Tab. č. 4 Robustnost metody – testované faktory</i>	44
<i>Tab. č. 5 Hodnoty konduktivity v závislosti na koncentraci kyseliny octové</i>	47
<i>Tab. č. 6 Optimalizace koncentrace <math>\alpha</math>-CD - rozlišení</i>	51
<i>Tab. č. 7 Optimalizace vnitřního standardu – migrační čas</i>	52
<i>Tab. č. 8 Optimalizace vnitřního standardu – rozlišení arginin</i>	52
<i>Tab. č. 9 Optimalizace vnitřního standardu – rozlišení efedrin</i>	52
<i>Tab. č. 10 Optimalizace teploty – migrační časy</i>	53
<i>Tab. č. 11 Optimalizace vkládaného napětí – migrační časy</i>	54
<i>Tab. č. 12 Optimální podmínky analýzy</i>	55
<i>Tab. č. 13 Účinnost systému - zdánlivý počet teoretických pater</i>	57
<i>Tab. č. 14 Faktor symetrie píků</i>	57
<i>Tab. č. 15 Rozlišení píků</i>	58
<i>Tab. č. 16 Přehled výsledků měření kalibrační závislosti</i>	61
<i>Tab. č. 17 Opakovatelnost korigovaných ploch a migračních časů pro C = 5 <math>\mu\text{g/ml}</math></i>	62
<i>Tab. č. 18 Opakovatelnost korigovaných ploch a migračních časů pro C = 10 <math>\mu\text{g/ml}</math></i>	62
<i>Tab. č. 19 Opakovatelnost korigovaných ploch a migračních časů pro C = 40 <math>\mu\text{g/ml}</math></i>	63
<i>Tab. č. 20 Přesnost metody – Synephrine REDUKT</i>	64
<i>Tab. č. 21 Správnost metody – Synephrine-REDUKT</i>	65
<i>Tab. č. 22</i>	67
<i>Tab. č. 23 Stanovení obsahu účinných látek</i>	68