

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Diplomová práce

**Vývoj HPLC metody pro kontrolu kvality potravních doplňků
na bázi extraktu kozlíku lékařského**

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

Hradec Králové 2024

Veronika Bílková

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). 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, dne

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. za odborné vedení této diplomové práce. Mé poděkování mu patří za věnovaný čas, ochotu, vstřícnost a rovněž za poskytování cenných rad nezbytných pro vypracování práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Veronika Bílková

Školitel: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj HPLC metody pro kontrolu kvality potravních doplňků na bázi extraktu kozlíku lékařského

V této diplomové práci byla vyvinuta a validována chromatografická metoda pro separaci a stanovení apigenin-7-glukosidu, luteolinu, kyseliny acetoxyvalerenové, kyseliny hydroxyvalerenové, kyseliny valerenové, acevaltrátu a valepotriátu, které se vyskytují v extraktech kozlíku lékařského. Tato chromatografická metoda byla následně použita pro stanovení obsahu daných látek v potravních doplňcích: Advance Calmin, Allnature Kozlík bylinný extrakt, Anxiolan od firmy Green-Swan Pharmaceuticals CR a.s., Barnys HypnoX forte od Biopol GN, Dr. Max Happy Sleep, Epiderma Spi v klidu, Kneipp Kozlík plus, NatureVia Sleepnox forte, Naturvita Antistres, Neospan forte od Simply You Pharmaceuticals a.s. a Terezia Spánek & Relax. Pro porovnání obsahu látek byly analyzovány registrované léčivé přípravky: Kneipp Kozlík 500 mg, Persen forte - Zentiva Group, a.s.. Metoda byla rovněž využita pro kontrolu kvality a obsahu u tekutých lékových forem (kapky, tinktury): Dr. Popov Kozlík lékařský, Green idea Kozlík lékařský extrakt a Tinctura valerianae od Česká lékárna holding a.s.. K analýze byla použita kolona Luna Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,6 µm částice. Separace probíhala za použití gradientové eluce s mobilní fází A: acetonitril, mobilní fáze B: 0,1% kyselina fosforečná. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou činila 0,4 ml/min při konstantní teplotě 30 °C. Detekce probíhala s využitím PDA detektoru při vlnových délkách 218, 231, 255 a 340 nm.

Klíčová slova: HPLC, apigenin-7-glukosid, luteolin, kyselina acetoxyvalerenová, kyselina hydroxyvalerenová, kyselina valerenová, acevaltrát, valepotriát, kozlík lékařský

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Veronika Bílková

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

Title of the diploma thesis: Development of a HPLC method for quality control of food supplements based on valerian extract

In this diploma thesis, a new chromatography method for separation and determination of apigenin-7-glucoside, luteolin, acetoxyvalerenic acid, hydroxyvalerenic acid, valerenic acid, acevaltrate, and valepotriate in valerian extract was developed and validated. The chromatography method was subsequently used to determine the content of the active substances in food supplements: Advance Calmin, Allnature Kozlík bylinný extrakt, Anxiolan from Green-Swan Pharmaceuticals CR a.s., Barnys HypnoX forte from Biopol GN, Dr. Max Happy Sleep, Epiderma Spi v klidu, Kneipp Kozlík plus, NatureVia Sleepnox forte, Naturvita Antistres, Neospan forte od Simply You Pharmaceuticals a.s. and Terezia Spánek & Relax. To compare the content of substances, registered medicinal products were analyzed: Kneipp Kozlík 500 mg, Persen forte - Zentiva Group, a.s.. The method was also applied for quality control of liquid medicinal forms (drops, tinctures): Dr. Popov Kozlík lékařský, Green idea Kozlík lékařský extrakt and Tinctura valerianae from Česká lékárna holding a.s.. For the analysis, Luna Omega PS C18 100 Å 150 x 2.1 mm; 1.6 µm particle size analytical column was used. The separation was carried out by gradient elution with mobile phase A: acetonitrile, mobile phase B: 0.1% phosphoric acid. The flow rate of the mobile phase was 0.4 ml/min at a constant temperature of 30 °C. The detection was performed by PDA detector at wavelengths of 218, 231, 255 and 340 nm.

Keywords: HPLC, apigenin-7-glucoside, luteolin, acetoxyvalerenic acid, hydroxyvalerenic acid, valerenic acid, acevaltrate, valepotriate, valerian

Obsah

1	Použité zkratky	9
2	Úvod	11
3	Cíl a zadání práce.....	12
4	Teoretická část.....	13
4.1	Kozlík lékařský.....	13
4.1.1	Popis	13
4.1.2	Obsahové látky	14
4.1.3	Použití	17
4.1.4	Mechanismus účinku	18
4.1.5	Aplikační formy, dávkování	20
4.1.6	Kontraindikace.....	20
4.1.7	Nežádoucí účinky.....	20
4.2	Fyziologie spánku	21
4.3	Problémy se spánkem.....	21
4.4	Léčba nespavosti	22
4.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	24
4.6	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie	28
4.7	Rešerše stanovení analytů na bázi extraktu kozlíku lékařského	30
5	Experimentální část.....	32
5.1	Použité přístroje a pomůcky	32
5.1.1	Přístroje	32
5.1.2	Pomůcky	32
5.2	Použité chemikálie.....	33
5.2.1	Standardy.....	33
5.2.2	Rozpouštědla	33
5.3	Testované vzorky	34
5.3.1	Tablety, tobolky, dražé	34
5.3.2	Kapky	36
5.4	Příprava roztoků	37
5.4.1	Příprava roztoků standardů pro optimalizaci metody	37
5.4.1.1	Příprava zásobních roztoků standardů	37
5.4.1.2	Příprava pracovních roztoků standardů.....	37

5.4.1.3	Příprava mobilní fáze	38
5.4.2	Příprava roztoků standardů pro validaci metody	39
5.4.2.1	Příprava roztoku pro test vhodnosti chromatografického systému	39
5.4.2.2	Příprava roztoků pro kalibraci.....	40
5.4.2.3	Příprava roztoků pro opakovatelnost	40
5.4.2.4	Příprava roztoků pro stanovení parametru přesnosti a správnosti - tobolky	40
5.4.2.5	Příprava roztoků pro stanovení parametru přesnosti a správnosti - kapky. 41	
5.4.3	Příprava analyzovaných vzorků.....	41
5.4.3.1	Kapky	41
5.4.3.2	Tobolky	41
5.4.3.3	Tablety	42
5.5	Parametry měření.....	43
6	Výsledky a diskuze	44
6.1	Vývoj metody, optimalizované parametry	44
6.1.1	Volba vlnové délky.....	44
6.1.2	Volba složení mobilní fáze	47
6.1.3	Volba gradientu a kolony	48
6.2	Validace vyvinuté metody za finálních podmínek	60
6.2.1	Test způsobilosti chromatografického systému.....	60
6.2.2	Linearita.....	66
6.2.2.1	Kalibrační závislost apigenin-7-glukosidu	67
6.2.2.2	Kalibrační závislost luteolinu	68
6.2.2.3	Kalibrační závislost kyseliny acetoxyvalerenové.....	69
6.2.2.4	Kalibrační závislost kyseliny hydroxyvalerenové	70
6.2.2.5	Kalibrační závislost kyseliny valerenové	71
6.2.2.6	Kalibrační závislost acevaltrátu.....	72
6.2.2.7	Kalibrační závislost valepotriátu	73
6.2.3	Správnost a přesnost – tobolky	74
6.2.4	Správnost a přesnost – kapky	74
6.3	Stanovení vzorků	75
6.3.1	Tablety, kapsle	75
6.3.2	Kapky	80
7	Závěr.....	82

8	Seznam použité literatury	84
9	Seznam obrázků a tabulek	94
9.1	Seznam obrázků.....	94
9.2	Seznam tabulek	97

1 Použité zkratky

ACE	acevaltrát (pracovní zkratka na chromatogramech)
ACETOXY	kyselina acetoxyvalerenová (pracovní zkratka na chromatogramech)
ACN	acetonitril
API	apigenin-7-glukosid (pracovní zkratka na chromatogramech)
A _s	faktor symetrie
BDNF	mozkový neurotrofický faktor
cps.	kapsle
drg.	dražé
FD	ionizace desorpce polem
GABA	kyselina γ -aminomáselná
gtt.	kapky
HETP	výškový ekvivalent teoretického patra
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HTLC	kapalinová chromatografie za vysoké teploty
HYDROXY	kyselina hydroxyvalerenová (pracovní zkratka na chromatogramech)
k	kapacitní faktor
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LIT	lineární iontová past
LUT	luteolin (pracovní zkratka na chromatogramech)
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NREM	klidný pohyb očí
orbitrap	analyzátor založený na Fourierově transformaci
PDA	detektor fotodiodového pole
PTFE	polytetrafluorethylen
Q	jednoduchý kvadrupól
QqQ	trojitý kvadrupól

REM	rychlý pohyb očí
R _s	rozlišení
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
tbl.	tableta
tct.	tinktura
TOF	analyzátor doby letu
t _R	retenční čas
UHPLC	ultravysokoučinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření
VAL	valepotriát (pracovní zkratka na chromatogramech)
VIS	viditelné záření
VLR	kyselina valerenová (pracovní zkratka na chromatogramech)

2 Úvod

Kozlík lékařský (*Valeriana officinalis*) je léčivá bylina, která nachází využití především pro své uklidňující účinky. Některé prameny dokládají použití již za doby antické nebo středověku. S cílem dosáhnout příznivého působení na lidský organismus, se nejčastěji sbírá kořen rostliny, který se následně suší. Extrakty získané z kořene kozlíku lékařského ovlivňují kvalitu spánku a zkracují dobu potřebnou k usnutí. Mírní projevy nervozity nebo obtíže se soustředěním vznikajících na podkladě stresu. Prostředky s obsahem kozlíku mají vliv na správnou funkci trávicí soustavy, ale také hrají roli při udržení optimálních hodnot krevního tlaku nebo při podpoře činnosti srdce [1–3].

Hlavními sekundárními metabolity, které zodpovídají za účinky této rostliny je kyselina valerénová a valepotriáty, avšak další obsahové látky rovněž přispívají k pozitivnímu působení. V důsledku nestability valepotriátů při zvýšené teplotě vznikají rozkladné produkty, které zodpovídají za charakteristický zápach [4].

Potravní doplňky slouží jako koncentrovaný zdroj živin (vitaminů a minerálních látek) nebo dalších látek s výživovým či fyziologickým účinkem k doplnění běžné stravy. Na rozdíl od registrovaných léčivých přípravků nesmí na svém obalu obsahovat tvrzení o preventivních a léčebných vlastnostech. Uváděny bývají zdravotní nebo výživová tvrzení, které nesmí být v rozporu s právními předpisy. Doplňky stravy nepodléhají schvalovacímu procesu. Dovozce či výrobce má jen oznamovací povinnost vůči Ministerstvu zemědělství České republiky. Na ministerstvo je pouze zaslán text české etikety. Výrobce nemusí před uvedením doplňku stravy na trh ověřit jeho účinnost. Toto je nezbytné u léčivých přípravků s ohledem i na jejich jakost a bezpečnost. Odlišit potravní doplněk od léku můžeme dle obalu. Právní předpisy ukládají povinnost označení na obalu „doplněk stravy“. Někdy se můžeme setkat s jednacím číslem rozhodnutí o výrobku, kterému byl umožněn vstup do oběhu jako potravinu (tzv. HEM číslo). Léčivý přípravek musí být označen registračním číslem Státního ústavu pro kontrolu léčiv nebo Evropské lékové agentury [5–7].

3 Cíl a zadání práce

Cílem diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat chromatografickou metodu pro stanovení sedmi obsahových látek kozlíku lékařského – apigenin-7-glukosidu, luteolinu, kyseliny acetoxyvalerenové, kyseliny hydroxyvalerenové, kyseliny valerenové, acevaltrátu a valepotriátu. Vyvinutá metoda byla následně aplikována pro stanovení obsahu látek ve čtrnácti potravních doplňcích pevné i tekuté lékové formy a kontrolu jejich kvality.

4 Teoretická část

4.1 Kozlík lékařský

4.1.1 Popis

Kozlík lékařský (*Valeriana officinalis L.*) z čeledi kozlíkovitých (*Valerianaceae*) je vytrvalá bylina s lodyhou až 200 cm vysokou s charakteristickým pachem. Lodyha vyrůstá ze silného krátkého oddenku s dlouhými četnými kořeny. Pro rostlinu jsou typické dlouze řapíkaté, zpeřené lodyžní listy a kopinaté lístky. Bílé či dorůžova zbarvené oboupohlavné květy tvoří často bohatě rozvětvený trojramenný vidlan. Plody jsou nažky, které mají na vrcholu chmýr kalichovitého původu [8].

Bylina původně pěstovaná v Belgii, Anglii, Německu nebo východní Evropě se dnes typicky vyskytuje v Evropě, Asii a severovýchodě Ameriky. Optimální stanoviště pro rostlinu jsou lesy, vlhké louky, příkopy nebo blízkost potoků. Rostlina se množí nažkami nebo oddenky. Kvete od června do srpna [9–11].

Jedná se o lékopisnou rostlinu – v Českém lékopisu nalezneme článek Kozlíkový kořen (*Valerianae radix*). U vysušené neřezané drogy požaduje obsah silic nejméně 4 ml v kilogramu drogy. Nutná je přítomnost nejméně 0,17 % seskviterpenových kyselin vztažených na kyselinu valerenovou. Pokud se jedná o kozlíkový kořen řezaný, obsah silic by měl být nejméně 3 ml v kilogramu sušené drogy a obsahovat nejméně 0,10 % seskviterpenových kyselin počítaných jako kyselina valerenová. V lékopise rovněž najdeme článek Kozlíkový vodný extrakt suchý (*Valerianae extractum aquosum*), Kozlíkový extrakt suchý (*Valerianae extractum siccum*), Kozlíkový kořen řezaný (*Valerianae radix minutata*). Součástí díla normativního charakteru je i článek Kozlíková tinktura (*Valerianae tinctura*). Tinktura připravená z jednoho dílu sušené rostliny a pěti dílů ethanolu 60–80 % by měla obsahovat nejméně 0,015 % seskviterpenových kyselin [12].



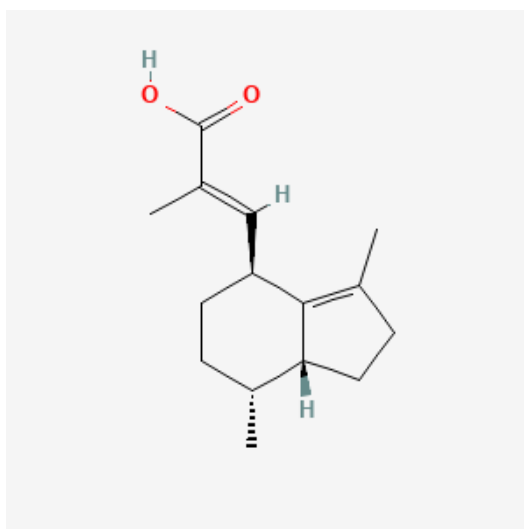
Obrázek 1: Ilustrovaný obrázek kozlíku lékařského [13].

4.1.2 Obsahové látky

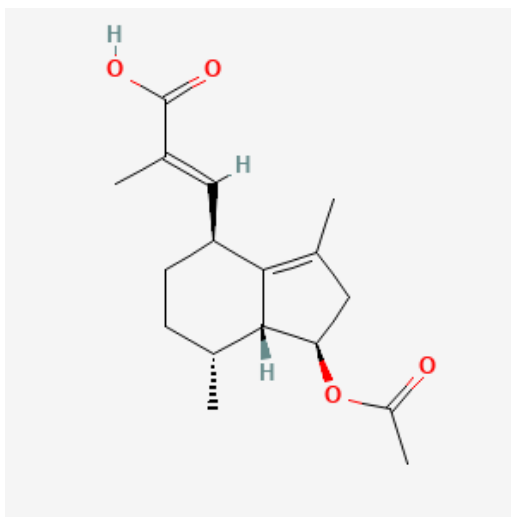
Obsah a složení účinných látek v léčivech rostlinného původu se liší v závislosti na podmínkách pěstování – klima, sklizeň, proces zpracování. Kozlík lékařský obsahuje řadu biologicky aktivních sloučenin. Hlavní složkou je kyselina valerénová, která vykazuje anxiolytický a spasmolytický efekt. Jedná se o terpenickou látku.

Studie na myších prokázaly, že kyselina valerénová redukuje negativní chování související s úzkostí. Účinek závisel na dávce čišťené kyseliny valerénové a ukázalo se, že dávka 12 mg/kg byla stejně účinná jako 1 mg/kg diazepam, který je běžně předepisován při léčbě úzkosti. Neovlivňuje však lokomotoriku, jež by poukazovalo na sedaci, ani nemá účinek na chování související se stavy deprese [14–15].

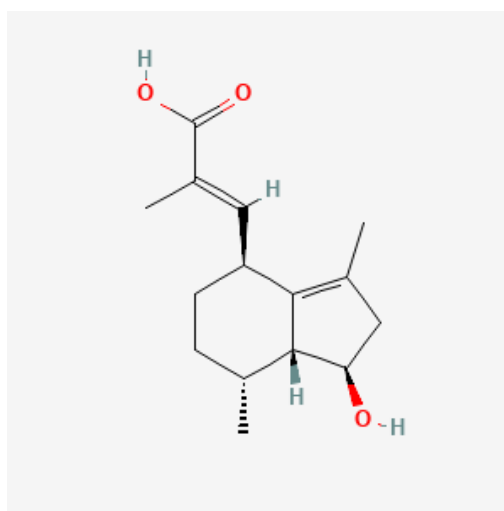
Sklizením čerstvých kořenů kozlíku, jejich očištěním od zbytků půdy a jiných nečistot následuje nasekání na menší kusy a jejich sušení. Než jsou části dále zpracovány, určitou dobu se skladují. Podmínky uchování vyžadují nepřístupnost vzduchu, světla, vlhkosti. V průběhu skladování prášku z kořene dochází ke změnám koncentrace kyseliny valerénové a jejích derivátů vlivem teploty a vlhkosti. Největší pokles kyseliny valerénové byl zaznamenán při teplotě 30 °C a nízké vlhkosti. Ztráta činila 50-70 %. Dalo by se říct, že výsledná koncentrace této kyseliny souvisí se změnami v obsahu jejích derivátů. Obsah kyseliny acetoxyvalerénové klesal s vyšší vlhkostí a při 30 °C. Její úbytek odráží kyselina hydroxyvalerénová přítomná ve skladovaných vzorcích, nikoliv v čerstvém vzorku. Dochází totiž k hydrolyze kyseliny acetoxyvalerénové za vzniku hydroxyvalerénové kyseliny v případě vyšší vlhkosti. Aby nedocházelo ke změnám zastoupení valerénových kyselin, optimální teplota skladování by měla být mezi 5-14 °C. Sušený materiál by se neměl uchovávat za vysoké vlhkosti s ohledem na možný růst mikroorganismů [16].



Obrázek 2: Strukturální vzorec kyseliny valerénové [17].



Obrázek 3: Strukturální vzorec kyseliny acetoxyvalerenové [18].

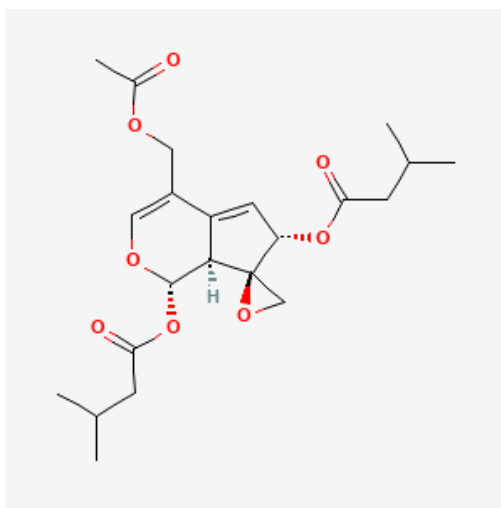


Obrázek 4: Strukturální vzorec kyseliny hydroxyvalerenové [19].

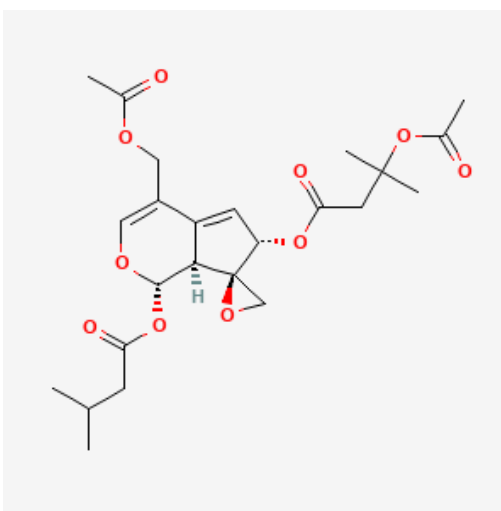
Další obsahovou látkou jsou valepotriáty, z chemického hlediska je můžeme charakterizovat jako epoxytriestery kyseliny octové, isovalerové, hydroxyvalerové s trojsytným alkoholem. Jedná se o lipofilní látky. Dle počtu dvojných vazeb rozlišujeme valepotriát (valtrát), acevaltrát a isovaltrát se dvěma dvojnými vazbami. Jednu dvojnou vazbu má didrovaltrát, isovalerohydroxydidrovaltrát a dihydroisovaltrát. Účinek valepotriátů a dalších metabolitů na centrální nervovou soustavu je stále diskutovanou problematikou. Přípravky obsahující valepotriát snižují dráždivost, neklid a pocity úzkosti. Z hlediska těchto obsahových látek není doporučeno užívání v těhotenství a při kojení kvůli možnému mutagennímu účinku.

Valepotriáty jsou tepelně nestabilní látky. Již při teplotě 35 °C se rozkládají za vzniku produktů, které jsou odpovědné za charakteristické aroma kozlíku – homobaldrinal a baldrinal. Rozkladné produkty rychle polymerují a dochází ke ztrátě biologické aktivity. Tyto látky citlivé na teplo mají rovněž horší rozpustnost ve vodě než v ethanolu, což poukazuje na fakt, že bylinný nálev je nejméně účinnou lékovou formou. Naopak největší účinek má tinktura a více účinný oproti nálevu bude macerát.

S ohledem na rozklad těchto látek za vyšší teploty je potřeba, aby sušení probíhalo při co nejnižších teplotách okolo 30 °C a v krátkém čase. Nejlepší by bylo sušení mrazem, které je však finančně náročné. S dobou skladování klesá obsah valepotriátů. Pro přípravu tinktury by neměla být použita sušená rostlina starší 10 týdnů. Dva roky stará usušená bylina je považována za neúčinnou a tedy nepoužitelnou [20].



Obrázek 5: Strukturální vzorec valepotriátu [21].



Obrázek 6: Strukturální vzorec acevaltrátu [22].

Obsah silic se liší dle původu rostliny – složením jde o estery kyseliny octové, mravenčí a isovalerové. Za vůni kozlíku, která vzniká při sušení je zodpovědný éterický olej s rozmanitým složením podle původu. Olej je často složen z bornylacetátu a bornylisovalerianátu. Kromě toho kořen obsahuje poměrně vysoké množství kyseliny valerové a jejích derivátů. Pozitivně působí v případě křečovitých stavů a zklidňuje. V rostlině jsou rovněž zastoupeny fenolové kyseliny, flavonoidy (linarin, hesperidin, 6-methylapigenin) a řada dalších monoterpenů, seskviterpenů či aminokyselin. V malém množství najdeme také zastoupení pyridinových alkaloidů nebo lignanů (pinosresinol a jejich glykosidy) [23].

4.1.3 Použití

Zmínky o užívání kozlíku pochází již z dob antiky, kdy byl uznávanou léčivou rostlinou. Řecký lékař, lékárník, botanik a autor pětidílné encyklopedie *De materia medica* (o bylinném lékařství) Dioscorides nebo římský válečník a autor významné přírodovědné encyklopedie *Naturalis historia* Plinius přikládali kozlíku význačnou léčivou sílu. V období středověku měl širší škálu použití v porovnání s dnešní dobou a byl pokládán za všelék. Řada pramenů ho zmiňuje jako osvědčený prostředek při astmatu, kašli, proti žloutence, bolestem hlavy, nadýmání nebo menstruačním a zažívacím obtížím. Využití měl i při špatně se hojících ránách či na zánět pohrudnice a v případě dny (jeho užívání doporučovala německá lékařka Hildegarda z Bingen). V době vznikala i řada pověr, které rostlině přisuzují schopnost chránit před zlým a odehnat čarodějnice nebo duchy [10][24].

Pokud sbíráme rostlinu na volně dostupných stanovištích, doporučuje se sběr daleko od továren a komunikací z důvodu možného znečištění. Vypěstovat si ho můžeme během srpna až listopadu i ze semínek na zahradě. Klíčí během čtyř týdnů a do dvou let kvete. Kořen se sklízí až v druhém roce za suchého počasí, nejlépe na podzim, kdy jsou sbírané části rostliny z hlediska obsahových látek nejúčinnější. Sbírané části zbavíme hlíny a omyjeme studenou vodou. Případně se silné části rozříznou a zavěšené se suší na dobře větraném stinném místě několik dní [25–27]. Pro své účinky se sbírá kozlíkový kořen, ale využívány jsou i další podzemní orgány. Typická vůně kozlíku nabývá na intenzitě po jeho usušení. Hlavní využití nachází v případě poruch s usínáním podmíněných nervozitou nebo při stavech neklidu. Kozlík lékařský snižuje četnost probouzení během noci, zkracuje dobu usnutí a tedy pozitivně ovlivňuje kvalitu spánku i náladu během dne. V porovnání s chemicky účinnými látkami užívaných při poruchách spánku nevzniká u kozlíku závislost. Bylina rovněž nevykazuje narkotické účinky, které by následující den vedly k pocitu omámení.

Své uplatnění má také při podráždění žaludku nebo žaludečních křečích pro své uklidňující účinky. Při předrážděnosti během menstruace nebo srdečních potížíh nervového původu působí pozitivně. Jeho příznivou vlastností je stabilizace nervové soustavy při nervozitě, nervovém podráždění, avšak v případě vyčerpanosti podněcuje k aktivitě. Mírné účinky se projevují i při použití jako přísady do koupele. Homeopatické přípravky s obsahem této byliny léčí bolestivý zánět sedacího nervu a poruchy spánku [9–10].

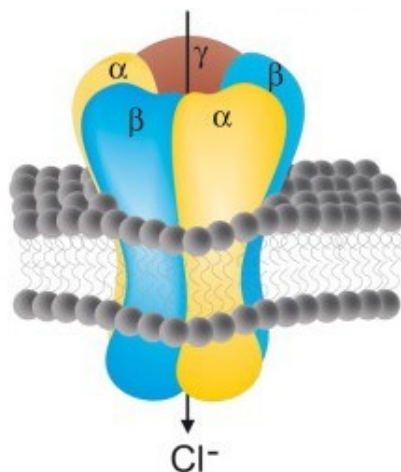
Kyselina valerénová by pravděpodobně mohla také ovlivnit Alzheimerovu nemoc zvýšením exprese mozkového neurotrofického faktoru (BDNF = brain-derived neurotrophic factor), který je klíčový pro neurony v mozku. Receptor kyseliny gama-aminomáselné ($GABA_A$) je řízen tímto faktorem, který má vliv na chování obdobné depresi a na procesy vzniku nových mozkových neuronů. Pokud se hladiny neurotrofického faktoru pohybují v určitých odpovídajících mezích, dochází k přenosu na synapsi (místo spojení dvou nervových buněk nebo nervové a jiné buňky, sloužící k předávání vzruchů) na vhodné úrovni a zabraňuje se tak potenciálním duševním nebo fyzickým onemocněním. Nízké hladiny BDNF mohou tedy vést ke vzniku Alzheimerovy nemoci, schizofrenii, depresi nebo obezitě [28].

Rostlina bývá nazývána také jako kočičí kořen, jelikož pro některé kočky je vůně kozlíku atraktivní. Dostupné jsou pro ně prostředky nebo hračky s obsahem této byliny pro odbourání stresových faktorů. Na rozdíl od člověka, který ho využívá z důvodu zklidňujících účinků, u koček působí naopak stimulačně. Kočka je poté více hravá, má tendenci se mazlit a můžeme tak odvést její pozornost před návštěvou veterináře a při dalších stresových situacích. Sloučenina, která působí jako stimulant je aktinidin. Ani u koček nehrozí riziko vzniku závislosti nebo předávkování při dodržení dávky jedné čajové lžičky [29–30].

4.1.4 Mechanismus účinku

Účinky kozlíku lékařského se nepovedly přisoudit pouze jediné obsahové látce. Předpokládá se součinnost více složek. Farmakologický účinek nese především kyselina valerénová, dále valepotriáty a v menší míře pyridinové alkaloidy a další látky ze skupiny iridoidů [23].

Mechanismus účinku pravděpodobně spočívá ve vazbě na $GABA_A$ -receptorový komplex spojený s kanálem pro chloridové anionty. Dochází k hyperpolarizaci membrány následkem zvýšeného průniku chloridových iontů, což vyvolává inhibiční postsynaptický potenciál. Tento mechanismus je podobný benzodiazepinům užívaným při léčbě nespavosti. Komplex má charakter pentameru složený z podjednotek α , β , γ , které mají své subtypy (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-4}) se značnou heterogenitou. Struktura tvořená pěti menšími podjednotkami prochází membránou [31].



Obrázek 7: GABA_A-receptor (obrázek převzat a upraven ze zdroje [32]).

Také bylo zjištěno, že extrakty z kozlíku lékařského potlačují aktivitu enzymu, který je zodpovědný za rozklad kyseliny γ -aminomáselné. Zvyšuje se tak množství kyseliny v synaptických štěrbinách mozku [33].

Kyselina γ -aminomáselná (GABA – gamma-aminobutyric acid) je látka s tlumivým účinkem, která přenáší vzruchy v centrální nervové soustavě. Při vazbě této sloučeniny na GABA receptory dochází k hyperpolarizaci buňky. GABA je hlavním cílem farmakoterapie při léčbě úzkosti. Receptory pro tuto látku se nacházejí v každé oblasti mozku a hrají roli v neurofyziologických procesech – spánek, motorické funkce, úzkost nebo bolest. Narušení inhibice pomocí GABA může vést k poruchám pohybu, schizofrenii nebo nespavosti [34].

Kyselina valerénová jakožto hlavní složka kozlíku lékařského zprostředkovává zesílení GABA_A receptorů. Snížení duševního napětí, odstranění úzkosti je zapříčiněno vazbou kyseliny valerénové na receptory GABA_A, konkrétně na podjednotku β_3 . Ukázalo se, že kyselina valerénová a benzodiazepiny předepisované na stavy úzkosti částečně sdílejí společný substrát v nervových buňkách, které na svém povrchu prezentují receptory $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ [35].

Kyselina acetoxyvalerénová a kyselina hydroxyvalerénová nemodulují receptory GABA_A, ale vážou se na identická vazebná místa [36].

GABA_A receptory modulují řadu strukturně odlišných látek. Významná je vazba léčiv jako jsou barbituráty, benzodiazepiny, celková anestetika, ale i látky rostlinného původu – monoterpeny, flavonoidy [37].

4.1.5 Aplikační formy, dávkování

Extrakt z kozlíku mohou být zastoupeny v potravních doplňcích či léčivých přípravcích samostatně, ale mnohdy se jedná o kombinaci s dalšími látkami. Dostupné jsou ve formě tablet, dražé, tobolek, připravují se čaje a používají se také tinktury.

Pro nepříjemnou hořkou chuť kozlíku se doporučuje použití již hotových preparátů, a to rovněž s ohledem na správné dávkování. Při poruchách spánku je vhodné užít 250 až 500 mg práškového extraktu v jedné tobolce / tableti nebo jednu čajovou lžičku tinktury (10-20 kapek) a to zhruba 30 minut až hodinu před ulehnutím ke spánku. Běžně je kozlíková tinktura dávkována 15-20 kapek třikrát denně. Jako přísada do koupele působí mírně sedativně [10]. V jiných případech je doporučovaná dávka extraktu kozlíku 50 až 100 mg dvakrát až třikrát denně. Pokud využijeme sušený kořen, dávka by měla být 1 až 2 gramy [33].

4.1.6 Kontraindikace

Kozlík by se neměl užívat s léčivými přípravky na spaní a uklidnění na lékařský předpis – sedativy, antiepileptiky, antidepresivy. Vyvarovat bychom se měli současnému požívání alkoholu. Na druhou stranu kombinace s ostatními rostlinnými uklidňujícími prostředky (chmel otáčivý, meduňka lékařská, mučenka pletní, ...) je možná [10].

Užívání u těhotných a kojících žen není vhodné s ohledem na možný mutagenní účinek valepotriátů [38].

4.1.7 Nežádoucí účinky

Při dodržení doporučených dávek je toxicita kozlíku a riziko výskytu nežádoucích účinků nízké. Předávkovat se je možné při požití množství většího jak 18 gramů kořene. Užívání dávek 530 až 2 000 miligramů extraktu pětikrát denně několik let může vyvolat abstinenční příznaky projevující se podrážděností, bolestí hlavy, poruchami spánku, neklidem nebo nevolností a zvracením. Takový případ je však známý pouze jeden [33].

Nežádoucí účinky, které mohou postihnout méně než jednoho pacienta z 10 000 (velmi vzácné) se projevují únavou během dne, třesem, napětím na hrudníku, bušením srdce nebo křečemi v břiše [33][39].

Smí se užívat maximálně po dobu 3-4 týdnů a následně si udělat pauzu na 3-5 dní. Užívání přípravků s obsahem kozlíku lékařského může zhoršit schopnost řídit nebo používat stroje – pacienti by neměli řídit nebo obsluhovat stroje [40].

4.2 Fyziologie spánku

Spánek je základní potřeba důležitá pro náležitou funkci organismu. Nezbytný je především pro regeneraci centrálního nervového systému – řízení organismu, kognitivní funkce (myšlení, paměť, koncentrace, pozornost) a šetření energie. Během spánku je reaktivita na vnější podněty společně s pohybovou aktivitou snížena [41]. Rytmus spánku a bdění reguluje část mozku – hypothalamus. V této části se tvoří řada hormonů potřebných pro ovlivnění tvorby moči v ledvinách (antidiuretický hormon), u žen k vyvolání kontrakcí dělohy a spouštění mléka při kojení – hormon oxytocin, mimo jiné zde dochází k produkci spánkového hormonu melatoninu. Melatonin signalizuje tělu nástup tmy, a tedy čas spánku [42].

Základní funkční stavy během spánku jsou bdělost, NREM (non rapid eye movement) a REM (rapid eye movement) spánek. Střídání těchto stádií se označuje jako architektura spánku. Cyklus trvá přibližně 90–120 minut a během noci proběhne čtyřikrát až pětkrát. NREM spánek bývá označován také jako klidový, jelikož klesá mozková aktivita. Má čtyři stádia (N1, N2, N3, N4), přičemž čtvrté stádium se v současné době již neodlišuje od třetího. Charakteristický je pokles svalového napětí, absence pohybu očních bulbů [43–44]. Takový spánek se postupně prohlubuje a nastává krátká fáze REM spánku, tedy spánku s rychlými pohyby očí a svalovými záškuby. Během této fáze se zdají sny. Spánkové cykly na sebe navazují a mezi nimi jsou krátké stavy, kdy je člověk připraven reagovat na podněty, je bdělý. Tento stav trvá kolem tří minut, a proto si jej mnohdy nepamatujeme [45].

GABA je hlavní inhibiční neurotransmitter, který udržuje rovnováhu mezi excitací a inhibicí centrálního nervového systému. Spánek regulují receptory GABA_A, GABA_B, GABA_C, přičemž léčiva působí prostřednictvím alosterické modulační benzodiazepinového místa. Na interakci s receptorem GABA_A působí i rostlinné výtažky s anxiolytickým a hypnotickým účinkem [46].

4.3 Problémy se spánkem

Spánek má zásadní vliv na fyzické i duševní zdraví. Kvalita spánku hraje roli v kognitivních schopnostech, imunitním systému, hormonální regulaci, kardiovaskulárním zdraví. Narušený spánek, nespavost nebo poruchy cirkadiálního rytmu, jejichž původ je v nezdravém životním stylu, zdravotních problémech či podmínkách prostředí zásadně přispívají ke zhoršení psychického a celkového zdravotního stavu. Podstatnou úlohu ve zlepšení spánku plní spánková hygiena. Optimální doba spánku se u dospělého člověka pohybuje mezi 7 až 9 hodinami, avšak s rostoucím věkem klesá [47].

Zásady spánkové hygieny zahrnují vyhýbání se těžkým jídlům na noc, 4-6 hodin před uložením se ke spánku nepít alkohol, energetické nápoje, černý či zelený čaj, vyvarovat se pití kávy a kouření. Měli bychom uléhat a vstávat ve stejnou denní dobu, a to každý den včetně víkendů. Před spaním vyvětrat místnost, ideální teplota by se měla pohybovat mezi 18-20 °C. Pouze při pocitu ospalosti ulehnout do postele. V případě, že nemůžeme usnout do 30

minut od ulehnutí, není vhodné nadále setrvávat v posteli. Ideální je poslechnout si hudbu nebo číst si. Naopak vhodná není nadměrná fyzická aktivita 1-2 hodiny před spaním. Spánek během dne je doporučován jen po dobu 30-45 minut. Večer před ulehnutím nepřemýšlet nad problémy a nežádoucí jsou také negativní myšlenky. Nedoporučuje se sledovat televizi přímo z postele, a navíc modré světlo narušuje spánkový biorytmus [48].

Pro nespavost (insomnii) jsou typické potíže s usínáním, brzké probouzení nebo časté noční buzení vyskytující se minimálně třikrát týdně a trvající po dobu alespoň jednoho měsíce. Může se jednat o krátkodobý stav, ale i stav dlouhodobý, pokud obtíže přetrvávají déle než tři měsíce. Insomnie postihuje až 30 % populace – prevalence stoupá s rostoucím věkem a častější je u žen než u mužů. Trvalými potížemi trpí přibližně 10 % z této části populace. Přidružená onemocnění, především psychiatrická, chronická (deprese, neurodegenerativní onemocnění, bolestivé stavy, dušnost) mohou rovněž přispívat k poruchám spánku. Riziko představuje práce na směny [49–51].

4.4 Léčba nespavosti

Nefarmakologické principy léčby nespavosti zahrnují především relaxační metody během dne a dodržování zásad spánkové hygieny. Význam to má především u starších lidí, jelikož s rostoucím věkem se snižuje celkový obsah vody v organismu, ubývá počet bílkovin plazmy a narůstá podíl tělesného tuku. Následkem toho se prodlužuje doba, za kterou se dané léčivo vyloučí z organismu, a tudíž vzrůstá potenciál výskytu nežádoucích účinků. V případě, že spánková hygiena není účinná, přistupuje se k tzv. kognitivně-behaviorální terapii, která se zaměřuje na tuto problematiku v rámci několika sezení s terapeutem. Vhodné je zařadit do svého denního režimu meditaci či brániční dýchání [52].

V případě neúspěchu předchozích technik a jedná-li se o akutní nespavost, přistupuje se k farmakologickým postupům, avšak nefarmakologické principy mají stále svůj význam. Využívanými skupinami léčiv jsou nebenzodiazepiny také nazývané jako tzv. „Z-drugs“, benzodiazepiny či agonisté melatoninových receptorů (melatonin). Své využití mají i některé skupiny antidepresiv a antihistaminik, především ta se sedativním účinkem. Benzodiazepiny by se neměly používat dlouhodobě z důvodu možného vzniku závislosti a rozvoje tolerance, útlumu během dne, nekoordinovaným pohybům a riziku pádů. Náhlé vysazení není žádoucí, jelikož může způsobit problémy se spánkem ještě ve větší intenzitě než v úvodu terapie. První volbou jsou tedy Z-hypnotika, která mají menší riziko vzniku závislosti a výskytu nežádoucích účinků. Ve srovnání s benzodiazepiny neovlivňují strukturu spánku. Spánkový hormon melatonin, který se podílí na řízení rytmu spánku a bdění je také dostupný v léčivém přípravku [53].

Stejně jako benzodiazepiny, které působí prostřednictvím GABA receptorů, na tato místa cílí také bylinné extrakty. Lidé trpící nespavostí před samotnou návštěvou lékaře jako první sahají po těchto prostředcích. Na podporu usínání můžeme vyzkoušet rostlinné přípravky s uklidňujícím účinkem. Kromě zmiňovaného kozlíku lékařského bývá do směsí na spánek přidávána meduňka, mučenka, levandule, chmel, heřmánek nebo třezalka [54].

4.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) je separační metoda, jejímž principem je opakované ustalování rovnováhy rozdělování analyzovaných látek mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Distribuce látek probíhá mezi pohyblivou (mobilní) fází, kterou tvoří kapalina a nepohyblivou (stacionární) fází tvořenou tuhou látkou umístěnou v koloně. Analyzované látky jsou oddělovány v důsledku odlišného vzájemného působení s pohyblivou nebo nepohyblivou fází. Podle charakteru separace analytů rozlišujeme chromatografii adsorpční (separované látky směsi se různou měrou adsorbují na povrch stacionární fáze), rozdělovací (dle odlišné rozpustnosti složek analyzované směsi v mobilní a stacionární fázi), afinitní, gelovou, iontově-výměnnou a další [55].

Jedná se o nejčastěji používanou fyzikálně-chemickou analytickou metodu, jelikož ji můžeme využít jak pro identifikaci, tak pro kvantitativní stanovení. Analyzovat můžeme vysokomolekulární látky, polární i nepolární látky, ionizovatelné sloučeniny, ale i tepelně nestabilní. Výhodou je rychlost analýzy, vysoká separační účinnost a malá spotřeba analyzovaného vzorku. Metoda zajišťuje přesnost při identifikaci a kvantifikaci, umožňuje vysokou selektivitu při analýze chemicky podobných sloučenin. Umožňuje detekovat a kvantifikovat sloučeniny při nízkých koncentracích. Zajišťuje reprodukovatelnost a analýzu velkého množství vzorků díky možnosti automatizace. Zásah obsluhujícího personálu je pak minimální [56–57].

Hlavní součásti chromatografického systému tvoří zásobníky mobilní fáze, která je přes filtry, jenž slouží k zachycení mechanických nečistot za pomoci vysokotlakého čerpadla čerpána do celé soustavy. Mísení jednotlivých složek mobilní fáze zprostředkovává směšovač. Než je mobilní fáze přivedena na kolonu dochází k odvedení veškerých rozpuštěných plynů za pomoci odplyňovače (degasseru). Mobilní fáze prochází skrz polopropustnou kapiláru, která se nachází ve vakuové komoře. Tato kapilára propouští jen plyny. Na základě rozdílného tlaku uvnitř a vně kapiláry dochází k odplynění fáze. Význam to má z hlediska zajištění souvislého průtoku mobilní fáze, zabránění výkyvům základní linie či zamezení šumu při detekci. Je nezbytné, aby průtok mobilní fáze byl přesný a správný, a proto je nedílnou součástí HPLC systému manometr pro kontrolu tlaku mobilní fáze, jelikož při přesáhnutí určité hodnoty může docházet k netěsnosti spojů systému, ale i změnám stacionární fáze. Pro případ radikálního zvýšení či poklesu tlaku je díky pojistce průtok mobilní fáze zastaven.

V kapalinové chromatografii rozlišujeme dva typy eluce – izokratickou a gradientovou. Izokratická eluce znamená, že se složení mobilní fáze během analýzy nemění. Využíváme ji při dělení látek, u nichž jsou chemické vlastnosti podobné. Změna složení mobilní fáze ve směru zvyšování silnějšího elučního činidla je charakteristická pro gradientovou eluci. Pokud zvyšujeme podíl složky mobilní fáze s vyšší eluční účinností, zkracujeme dobu analýzy. Při gradientové eluci se mobilní fáze mohou mísit za nízkého nebo vysokého tlaku. Mísení za nízkého tlaku vyžaduje jen jedno čerpadlo, avšak nevýhodou je mísení daleko od kolony. Dvě čerpadla vyžaduje mísení za vysokého tlaku a složky se mísí těsně před kolonou. Přínosem je přesnost v případě, že zastoupení jedné složky mobilní fáze je větší než 10 %

a opakovatelnost mísení nebo rychlá reakce na změnu složení mobilní fáze. Nejčastěji jsou využívána dvoupístová čerpadla díky snadnějšímu zajištění plynulého průtoku mobilní fáze celým systémem a nízkým tlakovým pulzacím. Mobilní fáze dále putuje do dávkovacího zařízení. Vzorek je nadávkován z vialek o objemu přibližně 1-2 ml manuálně nebo automatickým dávkovačem (autosamplerem). Dávkuje se objem v řádu jednotek až desítek μl . Automatický dávkovač zajistí opakovatelné dávkování i malých objemů a nevyžaduje přítomnost obsluhujícího personálu. Vzorek je nadávkován pomocí šesticestného ventilu s vyměnitelnou smyčkou, která se plní injekční stříkačkou. Sousední pozice ventilu jsou propojeny. Ventil pracuje ve dvou polohách – plnění (load) a dávkování (inject). Během plnění je propojena stříkačka a dávkovací smyčka, která se plní vzorkem. Kolonou protéká mobilní fáze a ustaluje se rovnováha. Při dávkování je naplněná smyčka propojena a mobilní fáze vymývá vzorek na kolonu, kde dochází k separaci analyzovaných látek. Současné moderní HPLC systémy využívají již dávkování přesných objemů pomocí dávkovací jehly a nasátí přesného objemu obvykle v rozmezí 0,5 až 50 mikrolitrů. Chromatografická kolona bývá většinou o délce 150-300 mm a průměru 3-4,6 mm s velikostí částic 3-5 μm . Je obvykle vyrobena z nerezové oceli, ale může být i plastová v případě monolitických kolon. Obecně dle typu sorbentu uvnitř kolony je rozlišujeme na náplňové (vyplněné malými porézními kulatými částicemi s velkým povrchem) a monolitické. Pro opakovatelnou a účinnou separaci je důležitá stejnoměrná velikost částic sorbentu. Významný vliv na celkovou analýzu má teplota na koloně, a proto se nachází v prostoru s termostatem pro udržení konstantní teploty po dobu separace. Proměnlivá teplota ovlivňuje selektivitu analýzy a retenční časy analytů. Eluát je z kolony veden do detektoru, přičemž signál detektoru vyhodnocuje počítač s chromatografickým softwarem. Látky, jejichž interakce se stacionární fází jsou slabší, unáší proud mobilní fáze a z kolony jsou vymyty v kratším čase. K pozdější eluci látek dochází při silnějším zadržování analytů na stacionární fází [58–63].

Detektor by měl být spolehlivý a snadno použitelný s širokým lineárním dynamickým rozsahem. Důležitá vlastnost detektoru je vysoká citlivost vůči malým koncentracím analyzovaných látek a nízký šum nulové linie. Abychom zabránili rozmývání separovaných zón, umístíme detektor co nejbližší za výstupem z kolony. Odezva by měla být rychlá a reprodukovatelná. Využívané typy detektorů jsou UV-VIS spektrofotometrický (UV-VIS, PDA), fluorescenční (FD, LIF), hmotnostně spektrometrický (MS), chemiluminiscenční, aerosolové, refraktometrické nebo elektrochemické (potenciometrický, amperometrický, konduktometrický). Fungují na principu převodu chemických nebo fyzikálních vlastností analytů či mobilní fáze na elektrický signál, který odpovídá koncentraci analytů v mobilní fází.

Analýza v této diplomové práci probíhala s využitím PDA detektoru, který řadíme mezi spektrofotometrické. V analyzovaných látkách je nutná přítomnost funkční skupiny, která absorbuje světlo v oblasti vlnových délek UV (190-400 nm) nebo VIS (400-800 nm). Detekce probíhala na základě měření absorpance elektromagnetického záření složek eluátu. PDA detektor snímá celé spektrum vlnových délek v reálném čase. Záření dopadá na diodové pole, kde je každá fotodioda (512-1024 fotodiod) nastavena na danou vlnovou délku záření. Tento

typ detektoru dokáže rozeznat případnou koeluci píků a zhodnotit jejich čistotu. Kvantitativní vyhodnocení probíhalo s využitím Lambert-Beerova zákona, kdy odezva detektoru přímo závisí na délce cely a koncentraci stanovované látky v pohyblivé fázi [60][64].

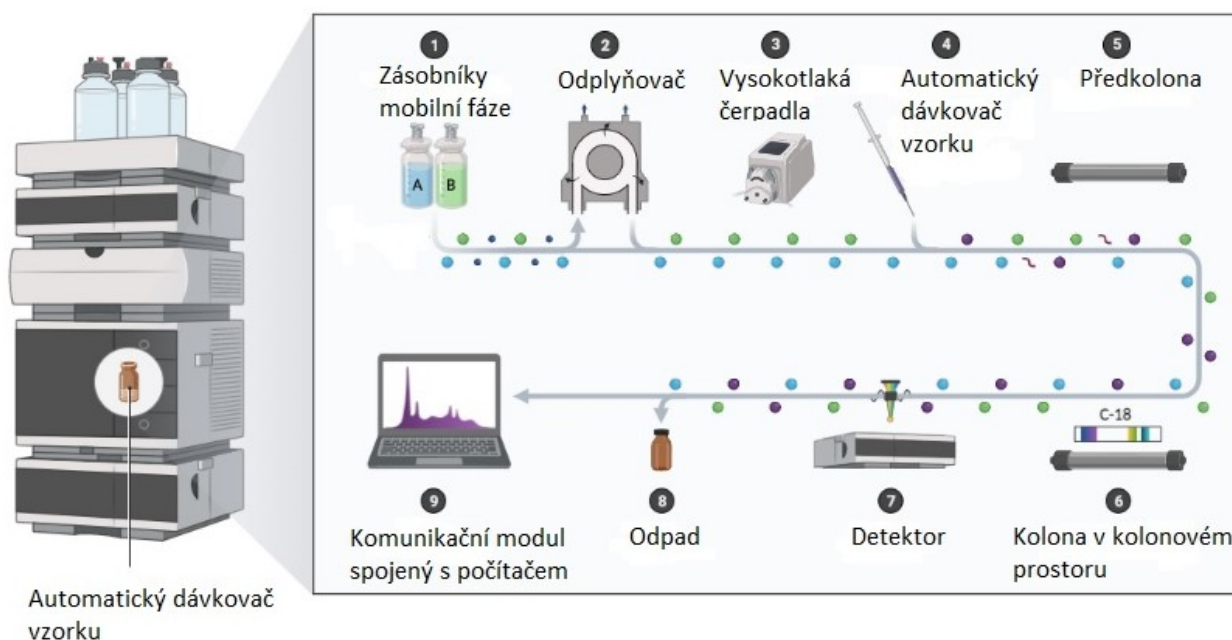
Chromatografická kolona o různé délce, vnitřním průměru a velikosti částic je naplněna stacionární fází – vhodnými sorbenty. Nejčastějším sorbentem je silikagel, na jehož povrchu mohou být chemickou reakcí navázány různé skupiny iontů nebo molekul (C8-C18, fenyl). V případě, kdy je silikagel takto chemicky upraven, hovoříme o obrácené (reverzní) fázi – navázané skupiny jsou nepolární a mobilní fáze je polární, tvořená směsí vodné a organické složky. Jako organickou složku volíme methanol nebo acetonitril. Zadržování na koloně je zprostředkováno hydrofobními interakcemi, zejména van der Waalsovými silami. Analyzovat můžeme rozsáhlou škálu látek s ohledem na libovolnou volbu složení mobilní nebo stacionární fáze. Nemodifikovaný silikagel s volnými silanolovými skupinami, případně navázání polárních funkčních skupin (amino, diol) představuje normální uspořádání fází. Mobilní fázi tvoří nevodná směs organických rozpouštědel (chloroform, hexan). Látky jsou zadržovány na koloně na základě polárních interakcí (interakce dipól-dipól, vodíkové vazby). S vyšší polaritou analyzované látky stoupá zadržování na koloně. Toto uspořádání fází se dnes využívá méně, a to v případě látek vysoce hydrofobních, tuků, sacharidů, u látek náchylných k hydrolyze. V normální i obrácené chromatografii se využívá úprava uhlíkatého řetězce pomocí aminoskupiny nebo kyanoskupiny. Silikagel má omezenou teplotní a chemickou stabilitu (teplota do 60 °C, pH 2-7). Podmínky použití definuje výrobce. Při nedodržení podmínek (pH > 8) může docházet k rozpouštění silikagelu nebo uvolňování navázaných ligandů (pH < 2). Z dalších používaných materiálů se můžeme setkat se stacionární fází na bázi organických polymerů (zesíťovaný polystyren, substituce polyvinylalkoholu, methakrylátu), oxidu zirkoničitého a dalších kovových oxidů. Méně obvyklý materiál využívaný pro výrobu sorbentů je grafitizovaný uhlík. Takové kolony vykazují vyšší odolnost s ohledem na teplotu či pH. Vysoce účinná separace probíhá i při využití monolitických kolon, které tvoří jeden kus porézního materiálu s makropóry a mesopóry. Makropóry s průměrem přibližně 2 μm zajišťují pohyb mobilní fáze přes sorbent. Separace je zprostředkována především mesopóry s menší velikostí (10 nm), pro které je typický velký povrch. Pracovat můžeme za nižšího pracovního tlaku a vyšší průtokové rychlosti. Přesto jsou tyto kolony v porovnání s náplňovými využívány méně kvůli omezené dostupnosti vyráběných fází.

Jako ochrana kolony před poškozením slouží předkolona. Brání nevratné adsorpci látek z matrice na stacionární fázi, chrání před nečistotami v mobilní fázi nebo v rozpouštědle analytu. Poskytuje tedy jak mechanickou, tak chemickou ochranu a tím zvyšuje životnost samotné kolony. V porovnání s analytickou kolonou je značně kratší (5-10 mm), avšak bývá plněna stejným sorbentem a dá se jednoduše vyměnit [60][65].

Pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii využíváme rozpouštědla vysoké čistoty s označením „HPLC grade“ nebo „HPLC gradient grade“. Tato rozpouštědla bývají od výrobce přefiltrována, v jiném případě je zapotřebí mobilní fázi před nalitím do zásobníku zbavit pevných nečistot. Zamezujeme tak možnosti ucpání části chromatografického systému. Výběr

rozpuštědla volíme také s ohledem na použítou detekci. Pokud využíváme mobilní fázi s obsahem solí nebo pufrů, je nutná filtrace. Je nutné ověřit, zda lze pufr kombinovat s organickou složkou mobilní fáze. Při vysoké koncentraci se mnohdy srážejí (vznik zákalu) [63][65].

Chromatografický systém popisuje obrázek č. 8

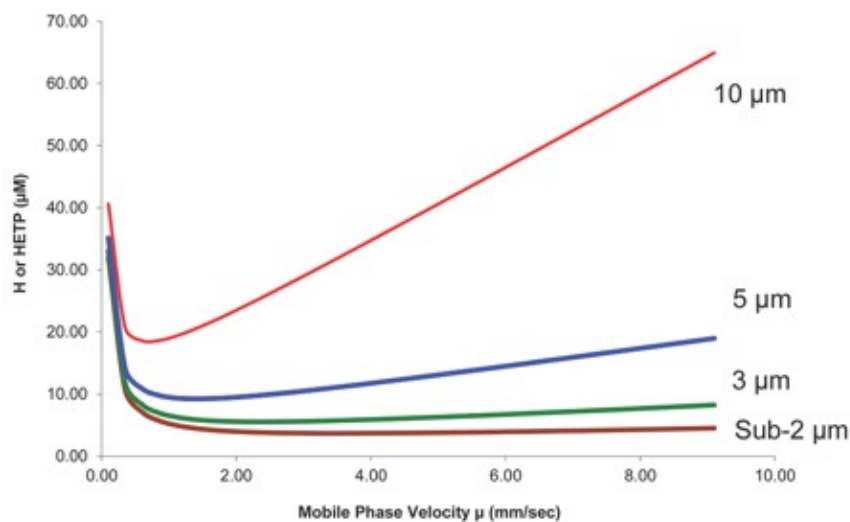


Obrázek 8: Schéma a popis HPLC systému (převzato a upraveno ze zdroje [66]).

Záznam signálu odseparovaných analyzovaných látek po průchodu detektorem zobrazuje chromatogram. Osa x představuje retenční čas (dobu od nástřiku do maxima křivky – vrcholu píku) a osa y signál detektoru (měřenou veličinu). Jednotlivé píky analytů hodnotíme z hlediska jejich tvaru, vzájemného rozlišení mezi sebou a posoudit můžeme celkovou efektivitu separační metody. Tvar píku popisuje faktor symetrie A_s , který by se měl pohybovat v rozmezí hodnot 0,8 – 1,5. Ideální tvar píku je podobný Gaussovskému rozdělení. Do jaké míry jsou analyzované látky od sebe odděleny udává rozlišení R_s . K separaci až na základní linii dochází v případě, kdy je tato hodnota vyšší než 1,5 [60][62].

Pro analýzu velkého množství vzorků je kladen důraz především na celkovou dobu analýzy a s tím spojenou spotřebu použitých organických rozpouštědel. Abychom zkrátily čas separace na několik minut, nejčastěji využíváme kratší kolony. Použitím krátké kolony se snižuje i zpětný tlak a ustanovení rovnováhy v systému (ekvilibrace) trvá kratší dobu. Naopak se snižuje počet teoretických pater, a tedy i separační účinnost. Nedosahujeme adekvátního rozlišení píků. Dalším způsobem urychlení analýzy je vyšší průtok mobilní fáze, kdy však narůstá i zpětný tlak. Setkat se můžeme i s tzv. HTLC (High Temperature Liquid Chromatography) s využitím

zvýšené teploty nad 60 °C pro zrychlení separační metody. Tlak v systému společně s viskozitou pohyblivé fáze je nižší. V potaz je potřeba brát riziko rozkladu stanovovaných látek a omezený výběr tepelně stálých materiálů sorbentu. Způsob, kterým můžeme výrazně zkrátit analýzu popisuje Van Deemterova křivka – snížením poměru výškového ekvivalentu teoretického patra (HETP – height equivalent to a theoretical plate) a rychlosti průtoku pohyblivé fáze. Křivka má různý tvar pro částice s odlišným průměrem [67].



Obrázek 9: Van Deemterova křivka [68].

4.6 Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Ke vzniku ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Ultra-High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) napomohla skutečnost, která byla základem rozvoje HPLC ze sloupcové chromatografie, a to je zmenšování velikosti částic. Pro tuto separační metodu je typická velikost částic menších než 2 μm a ultra-vysoký tlak (100-140 MPa). Hlavními výhodami metody je nižší spotřeba rozpouštědel a stanovovaného vzorku, rychlejší doba analýzy, vysoká separační účinnost a vyšší rozlišení. Postup, který byl vyvinut pro HPLC systém lze jednoduše přenést do podmínek pro UHPLC.

Jak již bylo zmíněno, pro systém je nezbytná schopnost pracovat za vysokých tlaků. Dodržení tlakových limitů musí být splněno u pump, nástřikového ventilu, vlastní kolony, ale i v místech spojů a těsnění. V porovnání s HPLC by měl dávkovač (autosampler) dávkovat vzorky rychleji, s čím souvisí zkrácení doby analýzy. Prostor mimo kolonu by měl být minimalizován. Negativní vliv na účinnost separace má zvětšení objemu systému počínající dávkovacím ventilem až po detektor. Využíváme proto užší kapiláry a při jejich spojení je nutné dosáhnout velmi malého objemu. Jelikož je kladen důraz na zkrácení doby analýzy a vyšší účinnost, důležitý je rovněž výběr detektoru. Volíme detektory, které jsou schopné snímat data s vysokou frekvencí.

V důsledku odporu částic sorbentu k toku mobilní fáze vzniká tření a tím dochází k zahřívání, což je typické pro UHPLC analýzy. Teplo je vedeno všemi směry do prostoru a vytváří se teplotní gradient. Jev se nejčastěji vyskytuje při práci za vyšších tlaků (100 MPa) nebo u kolon většího průměru (4,6 mm). Následkem klesá účinnost separace nebo kolísají retenční časy analytů.

Před samotnou analýzou je potřeba důsledná úprava měřených vzorků a filtrace mobilní fáze přes filtry s velmi malou velikostí pórů (0,22 μm). Kvalita mobilní fáze je stěžejní s ohledem na kolonu, která by se za přítomnosti pevných částic (krystaly pufrů) mohla ucpat. UHPLC kolony obsahují frity s menším průměrem pórů oproti HPLC kolonám, aby se zabránilo vymývání částic sorbentu [67].

Trendem farmaceutické analýzy je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, která separuje ionty podle poměru hmotnost/náboj. Ve strukturní analýze je tendence propojit rychlou chromatografii s hmotnostní spektrometrií k získání vysokého rozlišení a přesného určení hmoty. V tomto případě je volbou kombinace UHPLC s detekcí Q-TOF (Q – jednoduchý kvadrupól, TOF – time of flight – analyzátor doby letu) nebo LIT-orbitrap (LIT – lineární iontová past, orbitrap – analyzátor založený na Fourierově transformaci). Pro kvantitativní vyhodnocení volíme nejčastěji kombinaci UHPLC-QqQ (trojitý kvadrupól) [69].

4.7 Rešerše stanovení analytů na bázi extraktu kozlíku lékařského

Chromatografická metoda, která by stanovovala všechny látky analyzované v této diplomové práci najednou zatím nebyla publikována. Dostupné jsou publikace metod, které stanovují pouze jednotlivé analyzované látky, případně kombinaci některých z nich. Následující tabulka popisuje osm vybraných prací s podmínkami pro stanovení daných analytů. Látky byly stanovovány za účelem kvalitativním nebo kvantitativním, případně obojím. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je metodou volby s kolonami se stacionární fází typu C18. Mobilní fázi je potřeba okyselit a často ji tvoří methanol nebo acetonitril. Detekce nejčastěji probíhá s využitím spektrofotometrických detektorů PDA nebo UV.

Tabulka 1: Přehled možností stanovení apigenin-7-glukosidu, luteolinu, kyseliny acetoxyvalerenové, kyseliny hydroxyvalerenové, kyseliny valerenové, acevaltrátu a valepotriátu.

Analyzované látky	Mobilní fáze	Chromatografická kolona	Detektor	Zdroj
kyselina valerenová, kyselina hydroxyvalerenová, acetoxyvalerenová, valerenal, acevaltrát, isovaltrát	MeOH-H ₂ O (0,5% H ₃ PO ₄ , pH 2) 80:20	ApexPrep. ODS 250 x 4,6 mm, 5 μm	UV/VIS	[70]
kyselina valerenová	ACN	VP-ODS C18, 250 x 4,6 mm, 5 μm	UV	[71]
kyselina valerenová, acetoxyvalerenová, hydroxyvalerenová, valepotriát, dihydrovaltrát, kyselina chlorogenová, hesperidin, linarin, 5 lignanů	voda + 0,05% H ₃ PO ₄ , ACN:MeOH (1:1) + 0,05% H ₃ PO ₄	Phenomenex Luna C18, 150 x 3,0 mm, 5 μm	PDA	[72]
kyselina valerenová, acetoxyvalerenová, hydroxyvalerenová	5% vodný roztok Brij 35 + 6% butanol upravené na pH 2,3 ± 0,1 pomocí H ₃ PO ₄	Nucleosil C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm	PDA	[73]
kyselina valerenová, acetoxyvalerenová, hydroxyvalerenová	ACN + 0,3% vodný roztok H ₃ PO ₄	Phenomenex Luna C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm	PDA	[74]
kyselina valerenová	voda + methanol	Waters Symmetry® C18, 150 x 3,9 mm, 5 μm	UV	[75]
apigenin-7-glukosid, luteolin	vodný roztok 5% CH ₃ COOH:ACN + MeOH:5% CH ₃ COOH	Prodigy™ ODS-2 150 Å, 250 x 4,6 mm, 5 μm	PDA	[76]
apigenin-7-glukosid, luteolin	MeOH + 0,2 %H ₃ PO ₄	Diamondsil™ C18, 200 x 4,6 mm, 5 μm	UV/VIS	[77]

5 Experimentální část

5.1 Použité přístroje a pomůcky

5.1.1 Přístroje

Chromatografický systém:

Chromatograf: Shimadzu Nexera LC-40

Pumpy: LC-40B X3

Degasser: DGU-405

Autosampler: SIL-40C X3

Kolona: Luna Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm; 1,6 µm

Kolonový termostat: CTO-40C

Detektor: PDA detektor SPD-M40

Vyhodnocení: software LC LabSolutions

5.1.2 Pomůcky

Laboratorní sklo a pomůcky

Analytické váhy – Sartorius Secura 225D-1CEU

Pipety – Brand

Ultrazvuková lázeň – Bandelin SONOREX RK100

Jednorázové injekční stříkačky – Braun, Omnifix®

Membránové filtry PTFE 0,2 µm a 0,45 µm – Whatman™

Plastové uzavíratelné zkumavky o objemu 15 ml – VWR®

5.2 Použité chemikálie

5.2.1 Standardy

Apigenin-7-glukosid $\geq 98\%$; ChemFaces

Luteolin $\geq 98\%$; ChemFaces

Kyselina acetoxyvalerenová $\geq 98\%$; ChemFaces

Kyselina hydroxyvalerenová $\geq 98\%$; ChemFaces

Kyselina valerenová $\geq 98\%$; ChemFaces

Acevaltrát $\geq 98\%$; ChemFaces

Valepotriát $\geq 98\%$; ChemFaces

5.2.2 Rozpouštědla

Acetonitril (HPLC gradient grade); Honeywell

Kyselina o-fosforečná 85% p.a.; Penta

Methanol (HPLC gradient grade); VWR Chemicals BDH®

Ethanol 96%; VWR Chemicals BDH®

Ultračistá voda; systém Milli-Q (Millipore, Berford)

5.3 Testované vzorky

5.3.1 Tablety, tobolky, dražé

Advance Calmin, 60 cps., Advance nutraceutics s.r.o.

Allnature Kozlík bylinný extrakt, 60cps., Allnature s.r.o.

Anxiolan, 30 tbl., Green-Swan Pharmaceuticals CR a.s.

Barnys HypnoX forte, 20 tbl., Biopol GN

Dr. Max Happy Sleep, 30 cps., Dr. Max Pharma s.r.o.

Epiderma Spi v klidu, 30 cps., Epiderma a.s.

Kneipp Kozlík plus, 40 drg., Hartmann-Rico a.s.

NatureVia Sleepnox forte, 10 cps., Biovit Impex CO.ČR, s.r.o.

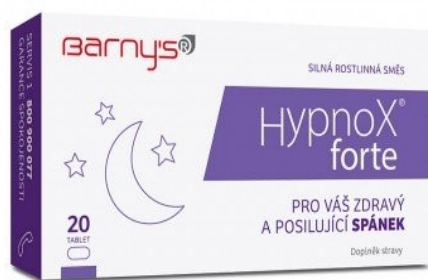
Naturvita Antistres, 60 cps., Naturvita a.s.

Neospan forte, 15 cps., Simply You Pharmaceuticals a.s.

Terezia Spánek & Relax, 60 cps., Terezia Company s.r.o.

Kneipp Kozlík 500 mg, 90 tbl., Hartmann-Rico a.s.

Persen forte, 20 cps., Zentiva Group, a.s.



Obrázek 10: Testované potravní doplňky [78–88].

5.3.2 Kapky

Dr. Popov Kozlík lékařský, gtt., Dr. Popov s.r.o.

Green idea Kozlík lékařský extrakt, gtt., Green idea s.r.o.

Tinctura valerianae e-laboratoř, tct., Česká lékárna holding, a.s.



Obrázek 11: Testované kapky [89–91].

5.4 Příprava roztoků

5.4.1 Příprava roztoků standardů pro optimalizaci metody

5.4.1.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní roztoky luteolinu, kyseliny acetoxyvalerenové, kyseliny hydroxyvalerenové, kyseliny valerenové, acevaltrátu a valepotriátu byly připraveny rozpuštěním navážky standardů v 1 500 μl methanolu dle níže uvedené tabulky. Standard apigenin-7-glukosidu byl rozpuštěn v 1 500 μl methanolu s přidavkem 3 000 μl směsi acetonitrilu : 0,1% kyseliny mravenčí v poměru 55:45 kvůli úplnému rozpuštění. Vialky se zásobními roztoky byly pro snadnější rozpouštění standardů ponořeny na 10 minut do ultrazvukové lázně. Připravené roztoky byly skladovány v chladu v lednici při 4 °C, aby se předešlo degradaci a vzniku rozkladných produktů.

Tabulka 2: Příprava zásobních roztoků standardů pro optimalizaci metody.

Standard	Navážka [mg]	Methanol [μl]	ACN + 0,1% CH_2O_2 (55:45) [μl]	Koncentrace [mg/l]
Apigenin-7-glukosid	0,96	1 500	3 000	213
Luteolin	0,95	1 500	-	633
Kyselina acetoxyvalerenová	1,06	1 500	-	707
Kyselina hydroxyvalerenová	0,95	1 500	-	633
Kyselina valerenová	0,97	1 500	-	647
Acevaltrát	1,19	1 500	-	793
Valepotriát	0,91	1 500	-	607

5.4.1.2 Příprava pracovních roztoků standardů

Pro přípravu pracovních roztoků se využilo zásobních roztoků standardů. Každý zásobní roztok byl naředěn desetkrát, a to způsobem, že se ke 100 μl zásobního roztoku přidalo 900 μl methanolu. Směsný roztok standardů vznikl smísením 400 μl zásobního roztoku kyseliny valerenové, 100 μl od každého ze zbylých zásobních standardů a naředěním 500 μl methanolu. Vyšší koncentrace kyseliny valerenové byla zvolena z důvodu její nižší absorpance.

5.4.1.3 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla tvořena okyselenou vodnou fází pro lepší retenci na stacionární fázi a zajištění stability analyzovaných látek. K přípravě okyselené vodné fáze se použilo 900 ml ultračisté vody a 0,9 ml kyseliny fosforečné 85%. Organickou složku mobilní fáze tvořil acetonitril, který byl čerpán přímo z originální lahve výrobce.

5.4.2 Příprava roztoků standardů pro validaci metody

Pro validaci metody byly připraveny nové navážky standardů a z nich zásobní a pracovní roztoky podle přiložené tabulky.

Zásobní roztok luteolinu, kyseliny acetoxyvalerenové, kyseliny hydroxyvalerenové, kyseliny valerenové, acevaltrátu, valepotriátu vznikly rozpuštěním navážky standardu podle níže uvedené tabulky v 1 000 μl methanolu. Vialky se zásobními roztoky byly 10 minut ultrazvukovány. Zásobní roztok apigeninu byl připraven rozpuštěním navážky v 1 000 μl ethanolu 96% a 10 minut ultrazvukován. Pro snadnější rozpuštění standardu byla vialka ponořena po dobu 2 minut do skleničky s horkou vodou.

Tabulka 3: Příprava roztoků standardů pro validaci metody.

Standard	Navážka [mg]	Methanol [μl]	Ethanol 96% [μl]	Koncentrace [mg/l]
Apigenin-7-glukosid	1,03	-	1 000	1030
Luteolin	0,97	1 000	-	970
Kyselina acetoxyvalerenová	1,01	1 000	-	1010
Kyselina hydroxyvalerenová	0,96	1 000	-	960
Kyselina valerenová	0,97	1 000	-	970
Acevaltrát	1,06	1 000	-	1060
Valepotriát	0,98	1 000	-	980

5.4.2.1 Příprava roztoku pro test vhodnosti chromatografického systému

Pro test způsobilosti chromatografického systému byl připraven nový směsný roztok standardů. Roztok vznikl odebráním 100 μl od každého ze sedmi zásobních roztoků standardů a doplněním 300 μl methanolu do celkového objemu 1 000 μl . Následným naředěním směsného roztoku methanolem byl připraven roztok o výsledné koncentraci 50 mg/l.

5.4.2.2 Příprava roztoků pro kalibraci

Kalibrační řada roztoků pro test linearity vznikla odebráním určitého objemu každého ze sedmi zásobních roztoků standardů a naředěním methanolem v různých poměrech. Postup shrnuje níže uvedená tabulka.

Tabulka 4: Ředění roztoků standardů pro kalibrační řadu.

Objem zásobního roztoku standardů [μl]	Objem methanolu [μl]	Výsledná koncentrace [mg/l]
100	300	100
80	440	80
50	650	50
30	790	30
20	860	20
10	930	10
5	965	5
2	986	2

5.4.2.3 Příprava roztoků pro opakovatelnost

Pro měření opakovatelnosti byly použity připravené roztoky standardů o koncentračních hladinách 10, 50 a 100 mg/l.

5.4.2.4 Příprava roztoků pro stanovení parametru přesnosti a správnosti - tobolky

a, Příprava směsného roztoku standardů

Do třech vialek bylo napipetováno 10 μl od každého ze zásobního roztoku standardů a přidáno 930 μl methanolu.

b, Příprava vzorku tobolek pro stanovení výtěžnosti doplňku stravy Sleepnox forte bez přídavku směsného roztoku standardů

Do třech vialek byla navážena desetina vypočtené hmotnosti jedné tobolky potravního doplňku – navážka v rozmezí 50-60 mg. Následně byl přidán 1 ml methanolu a vialky byly vloženy na 10 minut do ultrazvukové lázně. Výsledné vzorky se pomocí injekční stříkačky a PTFE filtru s velikostí pórů 0,2 μm přefiltrovaly do čistých vialek.

c, Příprava vzorku tobolek pro stanovení výtěžnosti doplňku stravy Sleepnox forte s přídavkem směsného roztoku standardů

Připraveno bylo osm vialek s desetinnou navázkou hmotnosti jedné tobolky doplňku stravy, přidalo se 10 µl od každého ze zásobního roztoku standardů a 930 µl methanolu. Vialky byly ponořeny na 10 minut do ultrazvukové lázně a přefiltrovány přes PTFE filtry o velikosti 0,2 µm do vialek.

5.4.2.5 Příprava roztoků pro stanovení parametru přesnosti a správnosti - kapky

a, Příprava směsného roztoku standardů

Do třech vialek bylo napipetováno 10 µl od každého ze zásobního roztoku standardů a přidáno 930 µl methanolu.

b, Příprava vzorku kapek pro stanovení výtěžnosti doplňku stravy Dr. Popov bez přídavku směsného roztoku standardů

Do odměrné baňky bylo napipetováno 2,5 ml kapek Dr. Popov a doplnilo se methanolem do 25 ml. Získali jsme tak desetkrát zředěné kapky, které jsme pomocí injekční stříkačky a PTFE filtru o velikosti pórů 0,2 µm zfiltrovali do kádinky. Tři vialky jsme naplnili 1 ml zfiltrovaného vzorku.

c, Příprava vzorku kapek pro stanovení výtěžnosti doplňku stravy Dr. Popov s přídavkem směsného roztoku standardů

Od každého ze zásobního roztoku standardu bylo odpipetováno 10 µl do osmi vialek a doplněno 930 µl vzorku kapek připravených dle bodu b.

5.4.3 Příprava analyzovaných vzorků

5.4.3.1 Kapky

Vzorky kapek byly připraveny odpipetováním 1 ml kapek do plastové uzavíratelné zkumavky a přidáním 9 ml methanolu. Zkumavky se vzorky byly 15 minut ultrazvukovány a následně zfiltrovány za pomoci PTFE filtrů o velikosti pórů 0,2 µm do skleněných vialek.

5.4.3.2 Tobolky

Obsah deseti tobolek potravního doplňku byl vysypán do plastové zkumavky a následně byla určena průměrná hmotnost jedné tobolky. Navážka jedné tobolky byla extrahována do 10 ml methanolu a 15 minut ultrazvukována. Extrakt byl přefiltrován do vialek přes PTFE filtr.

5.4.3.3 Tablety

Z hmotnosti deseti tablet byla vypočítána průměrná hmotnost navážky jedné tablety. Tablety byly rozdrceny v třecí misce a jednotlivá navážka převedena do plastové zkumavky. Do zkumavky bylo odpipetováno 10 ml methanolu a 15 minut byla směs extrahována za pomoci ultrazvukové lázně. Výsledný extrakt byl přefiltrován do vialek.

5.5 Parametry měření

Pro analýzu byl využit chromatograf Schimadzu Nexera LC-40, jehož součástí je vysokotlaké čerpadlo, odplyňovač mobilní fáze (degasser), dávkovač vzorku (autosampler), chromatografická kolona, kolonový termostat, detektor diodového pole. Za pomoci chromatografického programu LC LabSolutions byl celý systém ovládán a kontrolován. Rovněž sběr a vyhodnocování dat probíhal přes tento software. Optimalizovaná a validovaná metoda využívala kombinaci izokratické a gradientové eluce, při které se mění složení mobilní fáze s časem. Jako optimální složení mobilní fáze byla zvolena mobilní fáze A: acetonitril, mobilní fáze B: 0,1% kyselina fosforečná. Rychlost průtoku mobilní fáze kolonou činila 0,4 ml/min. Tabulka č. 5 znázorňuje složení mobilní fáze během analýzy.

Tabulka 5: Finální gradient pro validaci metody.

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]
0,01–2,00	60
2,00–4,00	60–30
4,00–10,00	30–10
10,00–10,02	10–60
10,02–12,00	60
12,01	stop

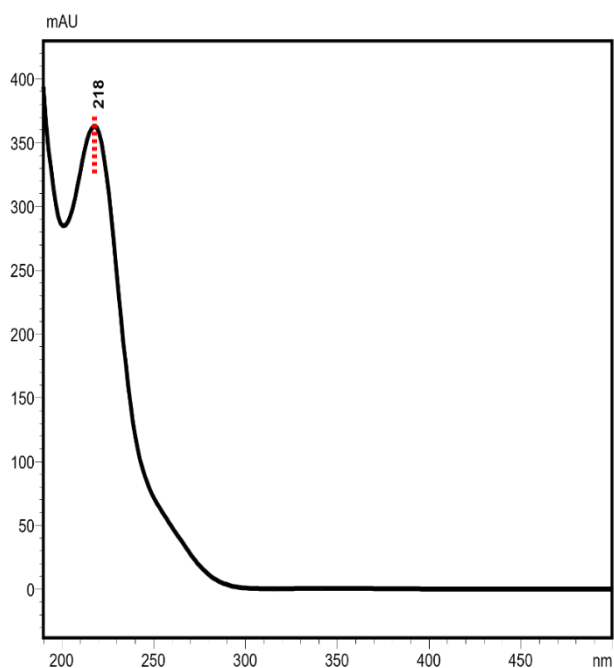
Teplota, při které probíhala separace na koloně Luna Omega PS C18 100 Å (150 x 2,1 mm) s velikostí částic 1,6 µm byla nastavena na 30 °C. Dávkovaný objem vzorku na kolonu činil 2 µl. Separované látky byly detekovány při vlnové délce 218 nm a 254 nm podle jejich absorpčních maxim.

6 Výsledky a diskuze

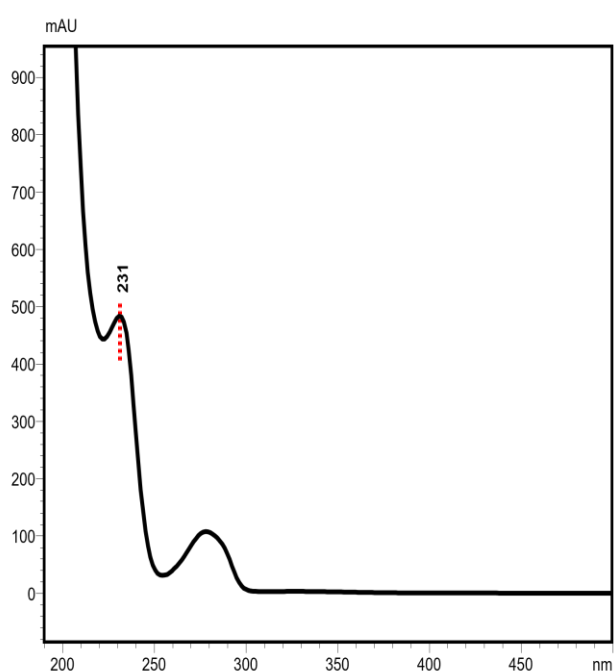
6.1 Vývoj metody, optimalizované parametry

6.1.1 Volba vlnové délky

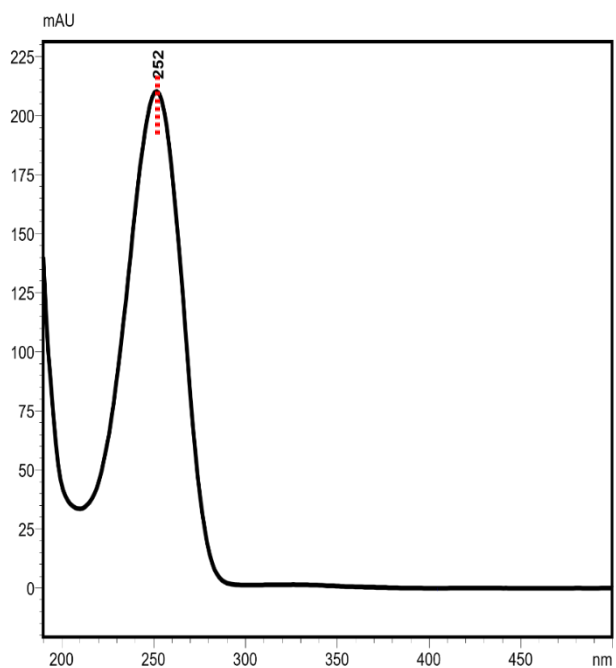
Pro detekci analyzovaných látek za pomoci PDA detektoru byly vybrány vlnové délky dle absorpčních maxim jednotlivých analytů. Detekce při optimalizaci metody probíhala při vlnových délkách: 218, 231, 255 a 340 nm. Absorpční spektra látek v dané mobilní fázi jsou znázorněna na obrázcích.



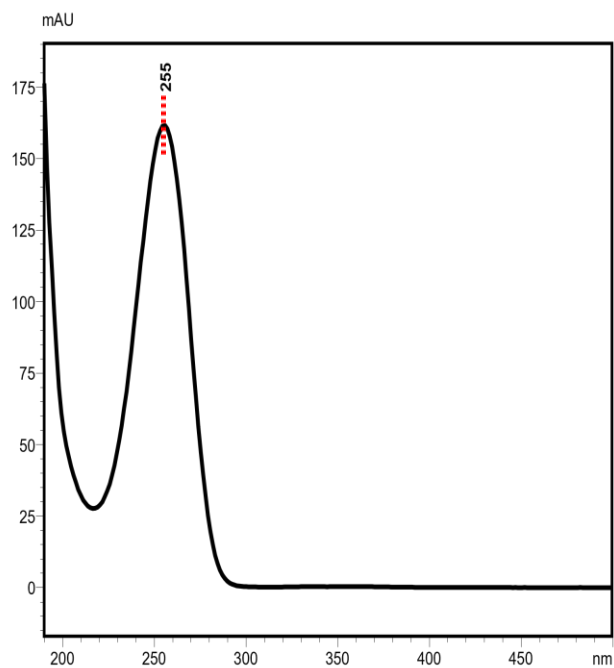
Obrázek 12: Absorpční spektrum kyseliny valerenové.



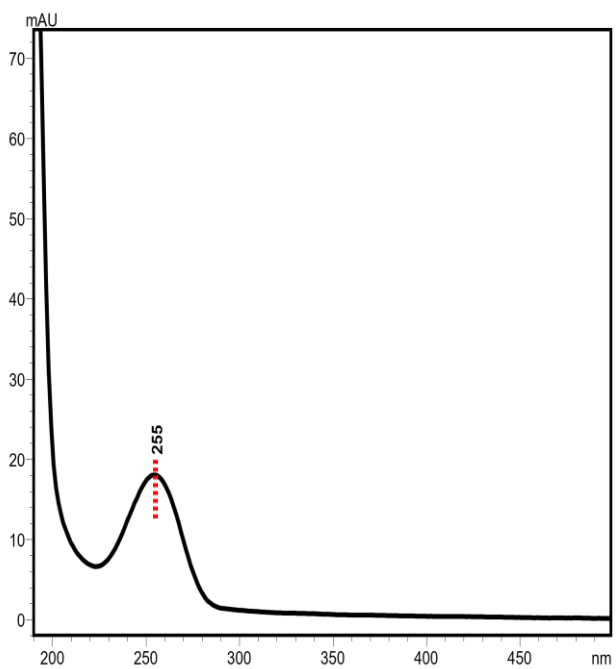
Obrázek 13: Absorpční spektrum kyseliny acetoxyvalerenové.



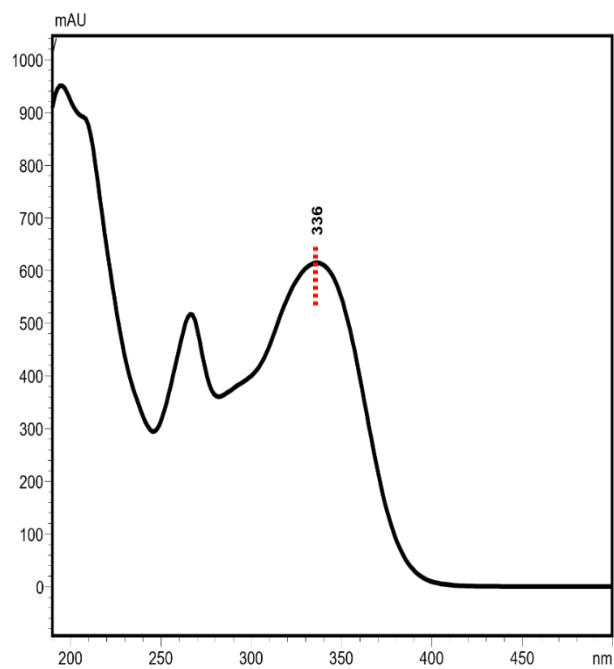
Obrázek 14: Absorpční spektrum kyseliny hydroxyvalerenové.



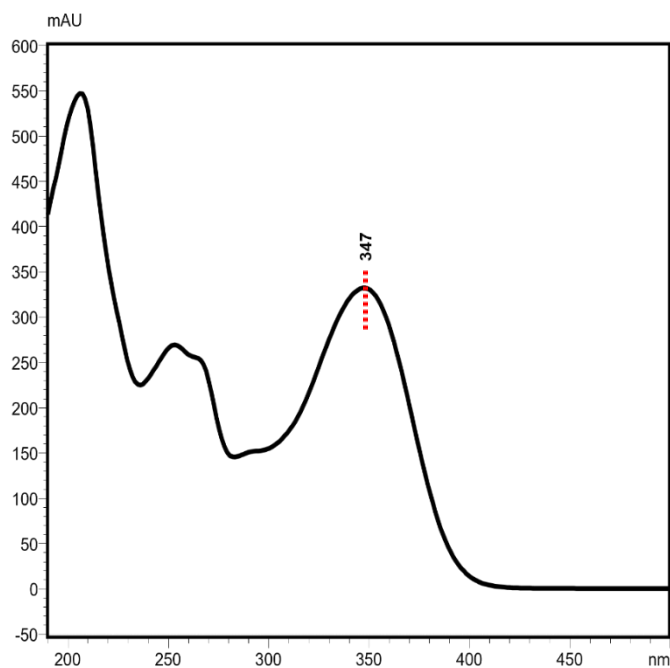
Obrázek 15: Absorpční spektrum acevaltrátu.



Obrázek 16: Absorpční spektrum valepotriátu.



Obrázek 17: Absorpční spektrum apigenin-7-glukosidu.



Obrázek 18: Absorpční spektrum luteolinu.

Tabulka shrnující vybrané vlnové délky pro jednotlivé analyty je uvedena níže.

Tabulka 6: Shrnutí jednotlivých vlnových délek pro detekci stanovovaných látek.

Analyzovaná látka	Vlnová délka [nm]
Kys. valerénová	218
Kys. acetoxyvalerénová	231
Kys. hydroxyvalerénová	255
Acevaltrát	
Valepotriát	
Apigenin	340
Luteolin	

Při volbě kolony a vhodného gradientu k optimalizaci separační metody byla pro zjednodušení zvolena vlnová délka 218 a 254 nm, při kterých byly viditelné všechny analyzované látky.

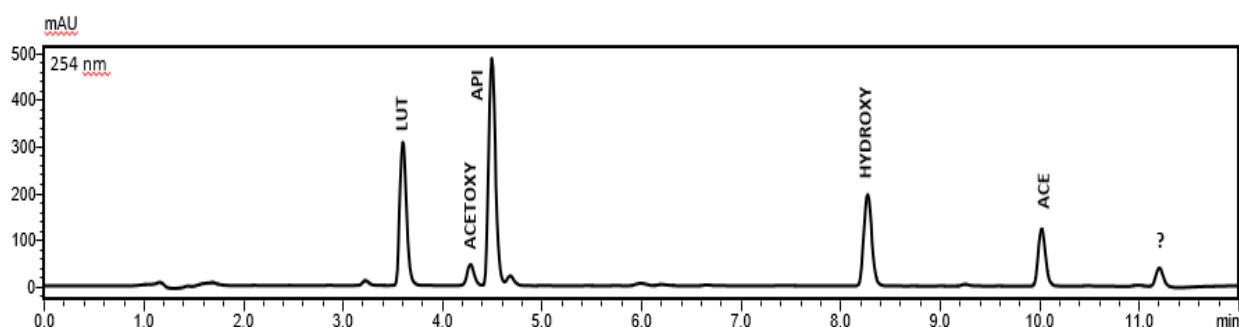
6.1.2 Volba složení mobilní fáze

Volba vhodného složení mobilní fáze probíhala na základě fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých stanovovaných látek a na podkladě poznatků publikovaných v odborné literatuře [73]. K separaci valepotriátu bylo nejčastěji jako mobilní fáze zvoleno složení acetonitril : voda, případně methanol : voda v poměru 60:40 [92]. Kyselina valerenová a její deriváty se nejlépe separovaly při gradientové eluci s mobilní fází obsahující methanol nebo acetonitril a roztok kyseliny o-fosforečné [71–72][93]. Český lékopis pro analýzu využívá gradientovou eluci složenou z organické a vodné fáze. Organická fáze byla tvořena acetonitrilem a vodná fáze 0,1% kyselinou fosforečnou o pH přibližně 2,2. Na základě složení mobilní fáze byly rovněž vybírány jednotlivé kolony.

Jelikož se jedná o látky kyselé povahy, bylo zapotřebí mobilní fázi okyselit, aby se zabránilo ionizaci analytů. Pro okyselení fáze byla nejprve použita kyselina mravenčí, při které však separace neprobíhala optimálně, a tak byla v další optimalizaci nahrazena kyselinou fosforečnou.

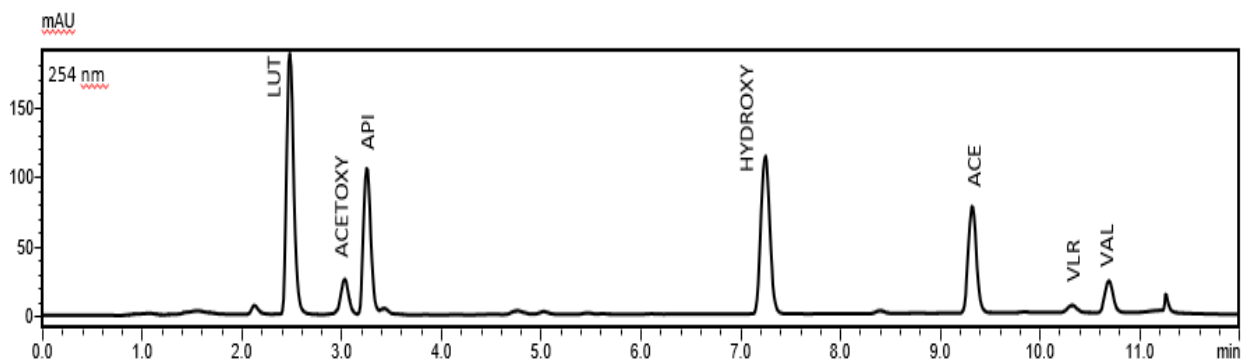
Při prvotním hledání optimálního složení mobilní fáze byla využita kolona s vyšším obsahem uhlíku (větší retence nepolárních látek) YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm s velikostí částic 3 μm .

1. Gradientová eluce – mobilní fáze A: acetonitril, mobilní fáze B: 0,1% kyselina mravenčí. Mobilní fáze protékaly rychlostí 1,0 ml/min s konečnou elucí 12,0 minut. Teplota kolonového prostoru činila 30 °C. Za těchto podmínek nedocházelo k optimální separaci kyseliny valerenové a valepotriátu (pík je označen na chromatogramu „?“) a proto takovéto složení mobilní fáze nebylo zvoleno.



Obrázek 19: Chromatogram znázorňující vývoj analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm s velikostí částic 3 μm při teplotě 30 °C a gradientové eluci se složením mobilní fáze A: acetonitril, B: 0,1% kyselina mravenčí.

2. Gradientová eluce – mobilní fáze A: acetonitril, mobilní fáze B: 0,1 % kyselina fosforečná. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,0 ml/min při teplotě kolonového prostoru 30 °C a celkové eluci 12,0 minut. Separace jednotlivých analytů probíhala bez koeluce píků. K další optimalizaci metody byla zvolena mobilní fáze s tímto složením.



Obrázek 20: Chromatogram znázorňující vývoj analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm s velikostí částic 3 µm při teplotě 30 °C a gradientové eluci se složením mobilní fáze A: acetonitril, B: 0,1% kyselina fosforečná.

6.1.3 Volba gradientu a kolony

Pro výběr vhodné kolony byla teplota kolonového prostoru nastavena na 30 °C, doba eluce trvala 12,0 minut. Pro detekci analytů byla zvolena vlnová délka 254 nm, při které dochází u většiny látek k absorpci. K separaci analyzovaných látek docházelo se složením mobilní fáze A: acetonitril, mobilní fáze B: 0,1% kyselina fosforečná.

Při optimalizaci metody bylo zvoleno několik gradientů s odlišným dávkovaným objemem směsi standardů vzhledem k průměru použité kolony (2-10 µl), různou průtokovou rychlostí mobilní fáze, různými počátečními podmínkami, a s různou strmostí nástupu organické fáze. Následující tabulky shrnují průběh jednotlivých gradientů a průtokovou rychlost.

Tabulka 7: Průběh gradientu č. 1

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–10,00	80–10	1,0
10,00–10,02	10–80	
10,02–12,01	80	
12,01	stop	

Tabulka 8: Průběh gradientu č. 2

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–10,00	70–10	1,0
10,00–10,02	10–70	
10,02–12,01	70	
12,01	stop	

Tabulka 9: Průběh gradientu č. 3

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–10,00	60–10	1,0
10,00–10,02	10–60	
10,02–12,01	60	
12,01	stop	

Tabulka 10: Průběh gradientu č. 4

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–10,00	50–10	1,0
10,00–10,02	10–50	
10,02–12,01	50	
12,01	stop	

Tabulka 11: Průběh gradientu č. 5

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–2,00	60	1,0
2,00–4,00	60–30	
4,00–10,00	30–10	
10,00–10,02	10–60	
10,02–12,01	60	
12,01	stop	

Tabulka 12: Průběh gradientu č. 1A

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–10,00	80–10	0,7
10,00–10,02	10–80	
10,02–12,01	80	
12,01	stop	

Tabulka 13: Průběh gradientu č. 2A

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–10,00	70–10	0,7
10,00–10,02	10–70	
10,02–12,01	70	
12,01	stop	

Tabulka 14: Průběh gradientu č. 3A

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–10,00	60–10	0,7
10,00–10,02	10–60	
10,02–12,01	60	
12,01	stop	

Tabulka 15: Průběh gradientu č. 5A

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–2,00	60	0,7
2,00–4,00	60–30	
4,00–10,00	30–10	
10,00–10,02	10–60	
10,02–12,01	60	
12,01	stop	

Tabulka 16: Průběh gradientu č. 1B

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–10,00	80–10	0,4
10,00–10,02	10–80	
10,02–12,01	80	
12,01	stop	

Tabulka 17: Průběh gradientu č. 2B

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–10,00	70–10	0,4
10,00–10,02	10–70	
10,02–12,01	70	
12,01	stop	

Tabulka 18: Průběh gradientu č. 3B

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–10,00	60–10	0,4
10,00–10,02	10–60	
10,02–12,01	60	
12,01	stop	

Tabulka 19: Průběh gradientu č. 5B

Časový průběh gradientu [min]	Zastoupení mobilní fáze B [%]	Průtoková rychlost [ml/min]
0,01–2,00	60	0,4
2,00–4,00	60–30	
4,00–10,00	30–10	
10,00–10,02	10–60	
10,02–12,01	60	
12,01	stop	

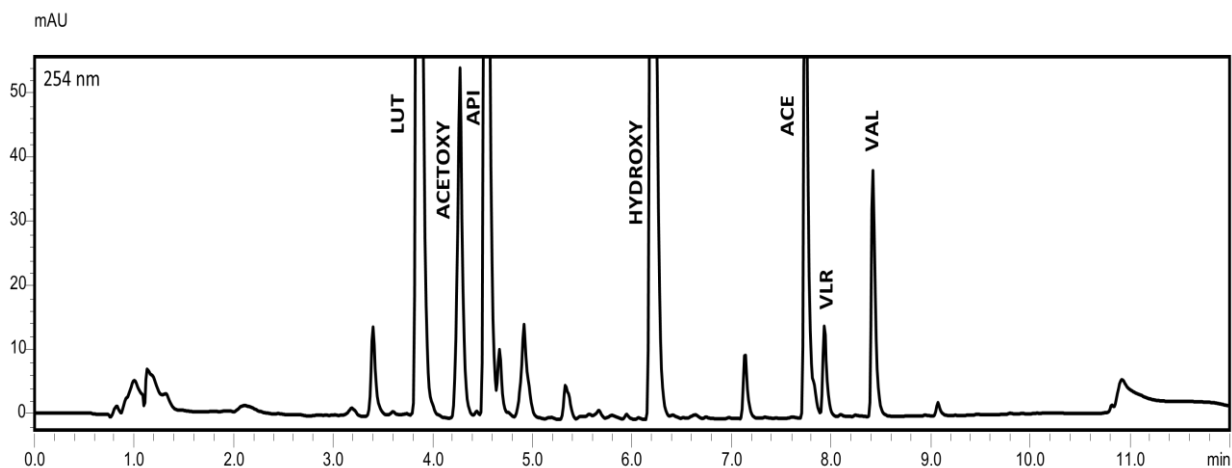
Na jednotlivých kolonách byly vyzkoušeny téměř všechny gradienty s různým zastoupením organické a vodné fáze. Napřed byly porovnáním retenčních časů jednotlivých standardů identifikovány píky ve směsi. Pro výběr vhodné kolony s optimální separací bylo

otestováno celkem 21 kolon. Testované kolony shrnuje tabulka. U kolon s průměrem menším než 3,0 mm byl zmenšen dávkovaný objem na 2 mikrolitry.

Tabulka 20: Přehled testovaných kolon v rámci optimalizace metody.

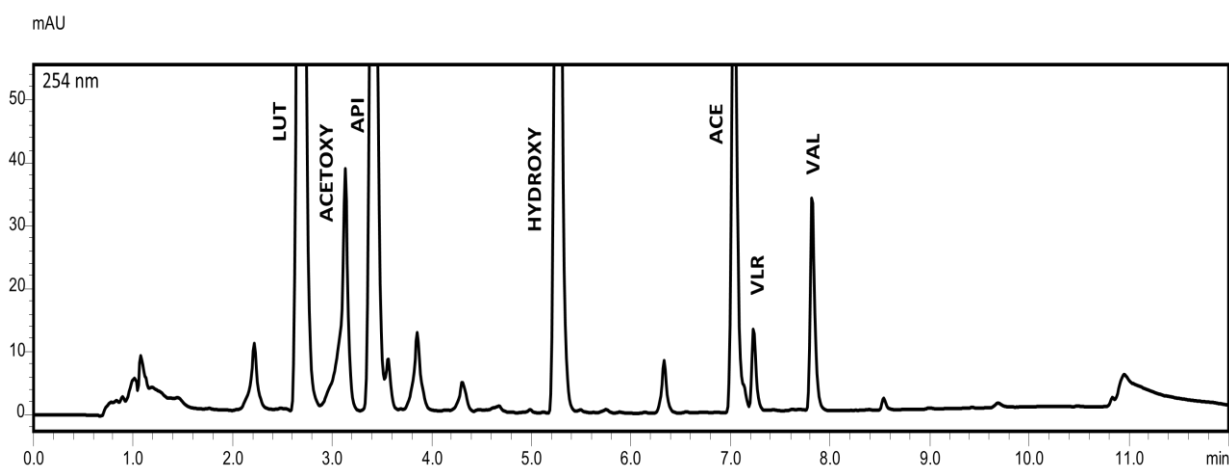
	Název a parametry kolony
1	ARION® PFP 150 x 4,6 mm, 5 µm
2	ARION® Plus C18 150 x 2,1 mm, 1,7 µm
3	ARION® Polar C18 150 x 3 mm, 2,2 µm
4	ARION® Polar C18 150 x 4,6 mm, 3 µm
5	Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 3 mm, 2 µm
6	Ascentis® Express 90 Å RP-Amide 150 x 4,6 mm, 2,7 µm
7	Avantor® ACE® Excel C18-Amide 100 x 3 mm, 1,7 µm
8	Avantor® ACE® Excel Super C18 100 x 3 mm, 1,7 µm
9	CHROMSHELL® C18 Polar 150 x 4,6 mm, 2,6 µm
10	Kinetex® Biphenyl 100 Å 150 x 4,6 mm, 5 µm
11	Kinetex® EVO C18 100 Å 150 x 4,6 mm, 2,6 µm
12	Kinetex® Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 2,6 µm
13	Luna® Omega Polar C18 100 150 x 2,1 mm, 3 µm
14	Luna® Omega Polar C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 1,6 µm
15	Luna® Omega Polar C18 150 x 4,6 mm, 5 µm
16	Luna® Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 1,6 µm
17	Raptor EtG/EtS 100 x 2,1 mm, 2,7 µm
18	Raptor Polar 100 x 2,1 mm, 2,7 µm
19	YMC-Triart C18 ExRS 150 x 3 mm, 1,9 µm
20	YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm, 3 µm
21	YMC-Triart PFP 150 x 4,6 mm, 3 µm

Při volbě vhodné kolony bylo hodnoceno rozlišení jednotlivých píků analyzovaných látek, symetrie píků a celkový čas separace. Následující chromatogramy zobrazují pouze vybrané kolony s nejlepším rozlišením a nejkratším časem separace. Analyzované látky jsou označeny zkratkami: LUT (luteolin), ACETOXY (kyselina acetoxyvalerenová), API (apigenin-7-glukosid), HYDROXY (kyselina hydroxyvalerenová), ACE (acevaltrát), VLR (kyselina valerenová) a VAL (valepotriát).



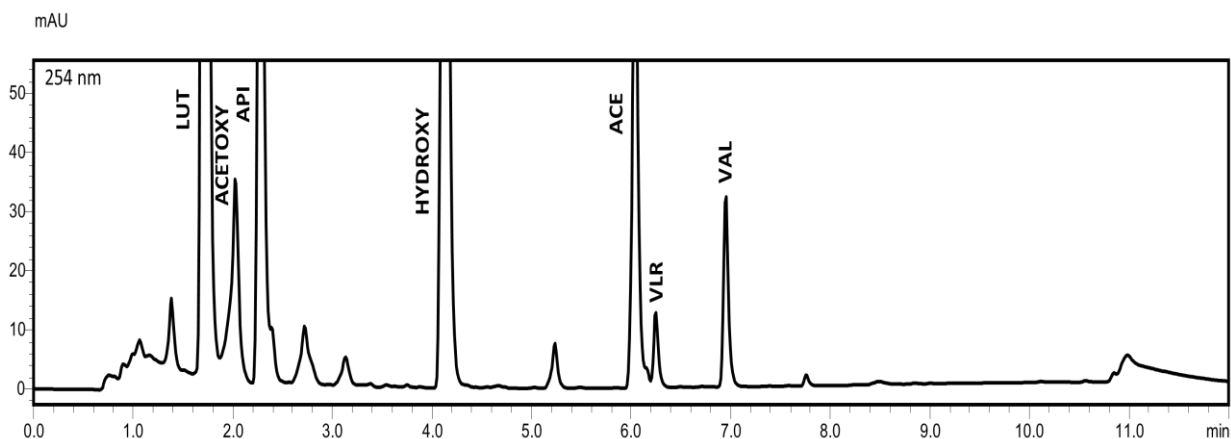
Obrázek 21: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 3 mm, 2 µm s gradientem 1A.

Analyty apigenin-7-glukosid, acevaltrát a kyselina valerenová nebyly dostatečně rozlišeny až na základní linii.



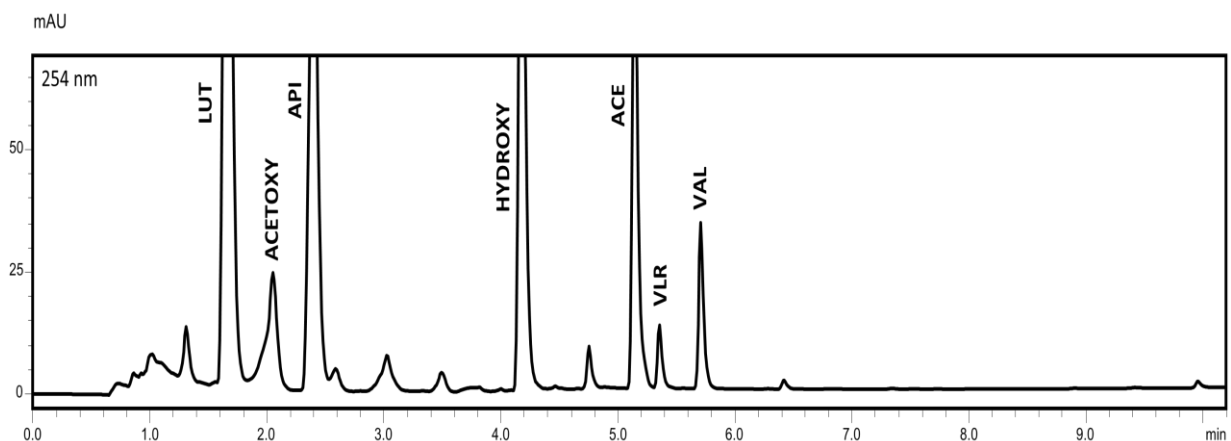
Obrázek 22: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 3 mm, 2 µm s gradientem 2A.

Při gradientu č. 2A rovněž nedošlo k optimální separaci analyzovaných látek na základní linii. Symetrie píku kyseliny acetoxyvalerenové nebyla optimální.



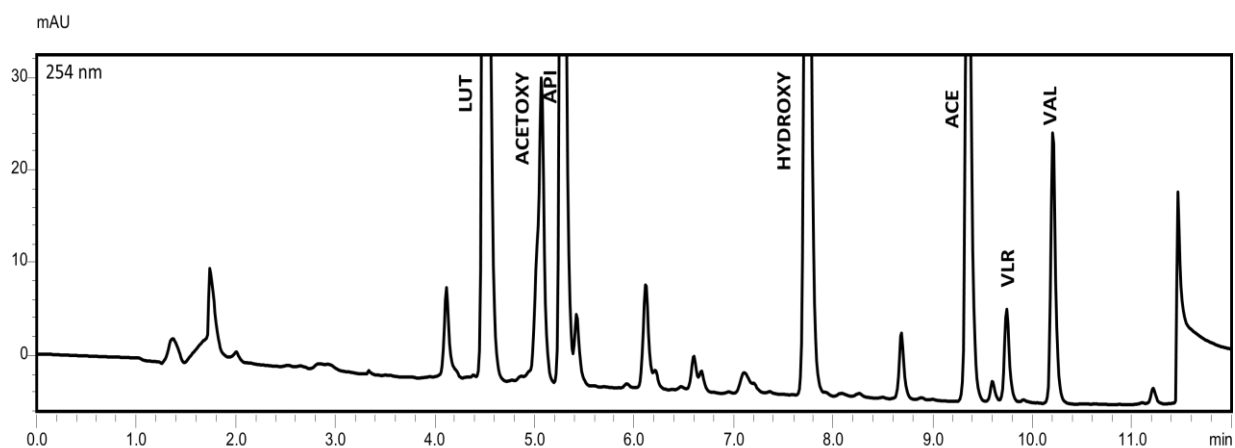
Obrázek 23: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 3 mm, 2 µm s gradientem 3A.

Dostatečná separace nenastala ani při gradientu č. 3A. Pík kyseliny acetoxyvalerenové není symetrický.



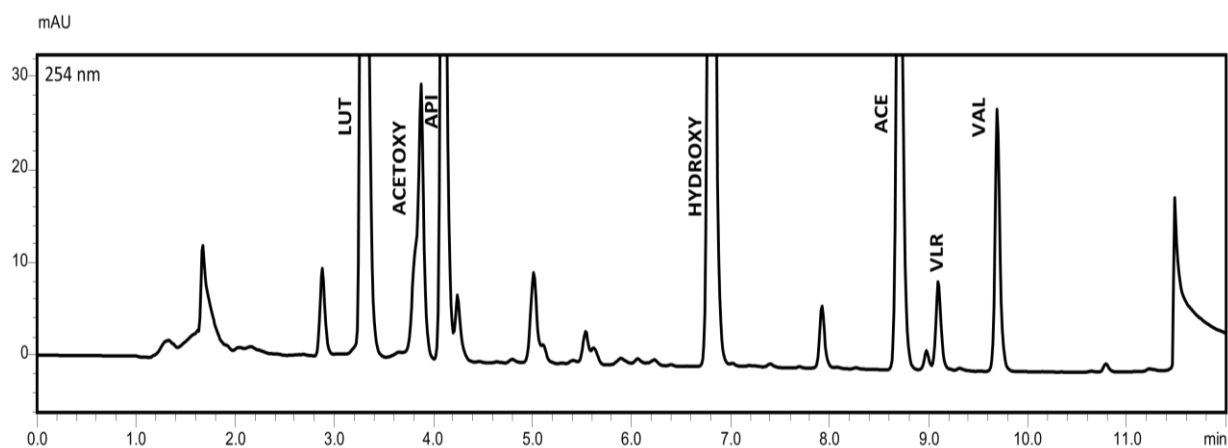
Obrázek 24: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 3 mm, 2 µm s gradientem 5A.

Analýza probíhala za výrazně krátkého času a jeví se jako velmi vhodná pro výsledné použití. Nevýhovující však byla symetrie píku kyseliny acetoxyvalerenové.



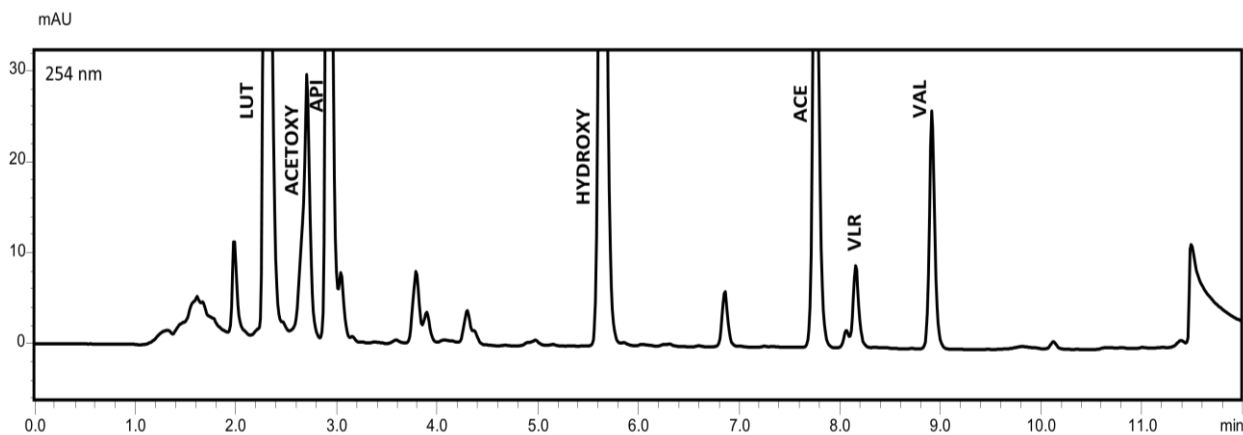
Obrázek 25: Chromatogram průběhu separace na koloně CHROMSHELL® C18 Polar 150 x 4,6 mm, 2,6 µm s gradientem 1.

Čas analýzy byl v porovnání s předchozí kolonou výrazně delší. Jednotlivé látky byly však lépe separovány až na základní linii s výjimkou apigenin-7-glukosidu.



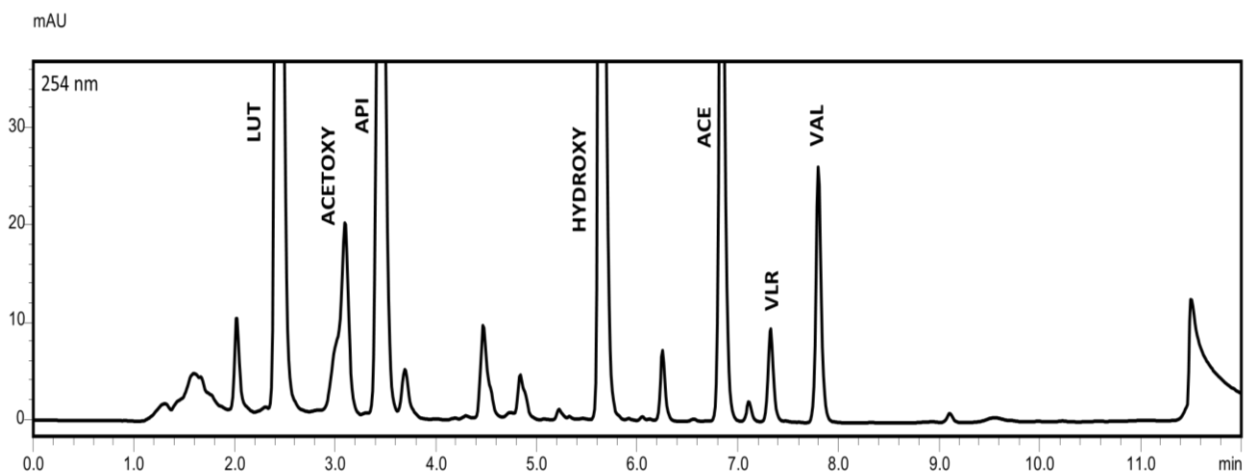
Obrázek 26: Chromatogram průběhu separace na koloně CHROMSHELL® C18 Polar 150 x 4,6 mm, 2,6 µm s gradientem 2.

Ani při aplikaci gradientu č. 2 nedocházelo k optimálnímu oddělení píku apigenin-7-glukosidu od přítomné nečistoty. Také pík kyseliny acetoxyvalerenové obsahuje nečistotu, a tudíž není zcela symetrický.



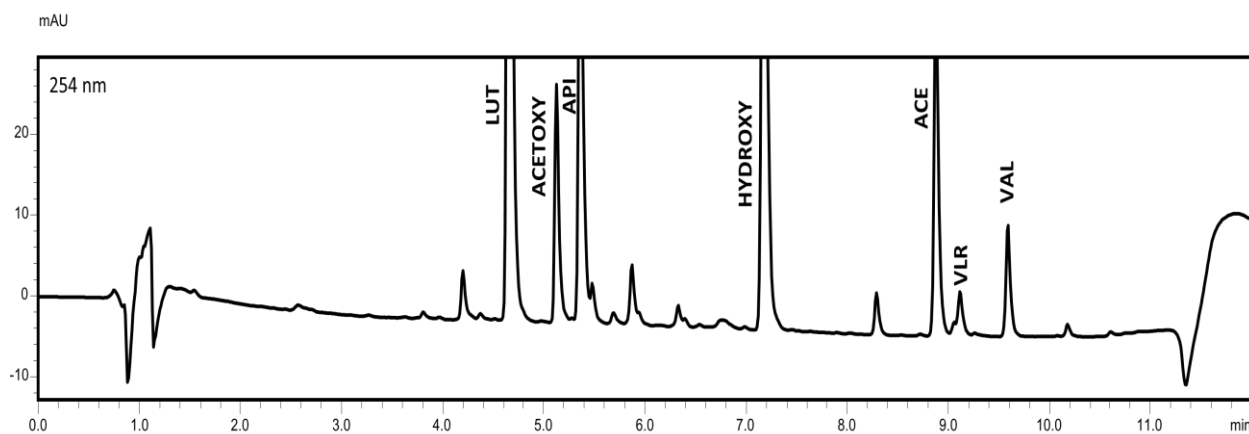
Obrázek 27: Chromatogram průběhu separace na koloně CHROMSHELL® C18 Polar 150 x 4,6 mm, 2,6 μ m s gradientem 3.

Při použití tohoto gradientu jednotlivé analyzované látky nebyly rozlišeny až na základní linii. Došlo ke koeluci píků stanovovaných látek s nečistotami.



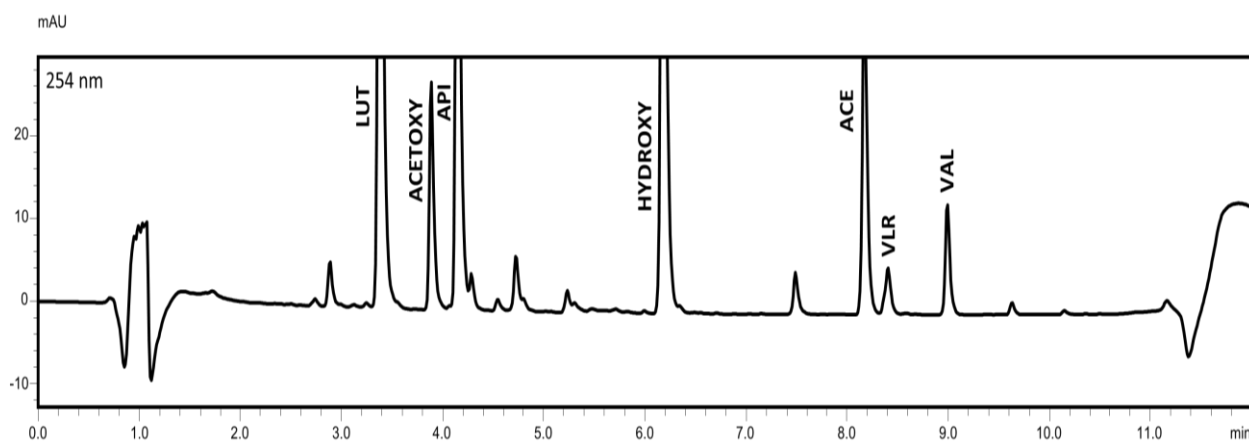
Obrázek 28: Chromatogram průběhu separace na koloně CHROMSHELL® C18 Polar 150 x 4,6 mm, 2,6 μ m s gradientem 5.

S gradientem č. 5 se doba analýzy značně zkrátila. Separace daných látek probíhala s dostatečným rozlišením. Pík kyseliny acetoxyvalerenové však nebyl opět symetrický.



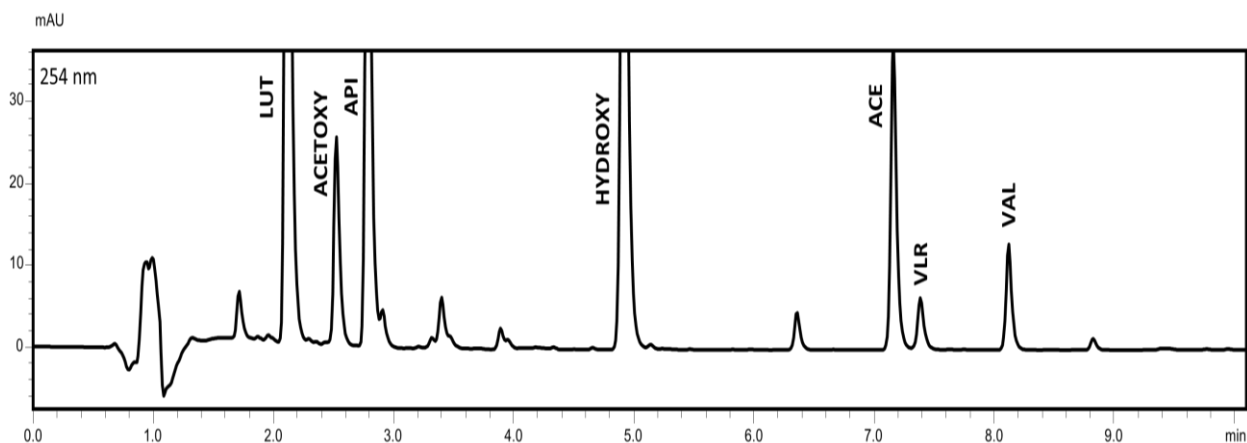
Obrázek 29: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna® Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 1,6 µm s gradientem 1B.

Analýza s gradientem č. 1B probíhala s nedostatečnou separací apigenin-7-glukosidu a kyseliny valerenové od nečistot.



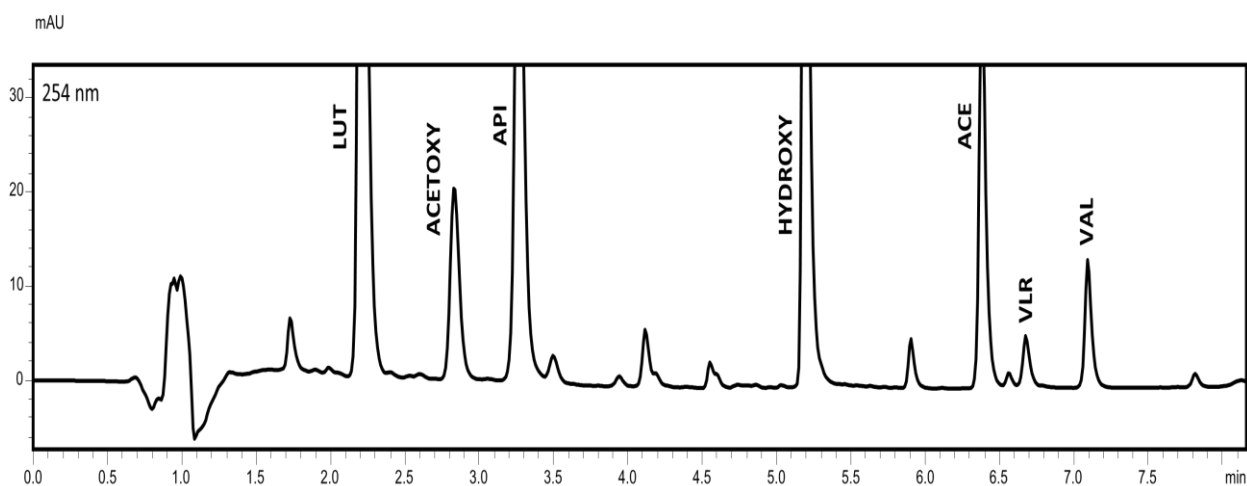
Obrázek 30: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna® Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 1,6 µm s gradientem 2B.

Gradient č. 2B taktéž nepřinesl optimální separaci i přes zkrácení času analýzy. Pík kyseliny valerenové obsahuje nečistotu.



Obrázek 31: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna® Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 1,6 µm s gradientem 3B.

Vzhledem k předchozímu použitému gradientu se doba analýzy opět zkrátila. Nedošlo k odseparování nečistoty od kyseliny valerenové.



Obrázek 32: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna® Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 1,6 µm s gradientem 5B.

Gradient č. 5B byl z hlediska doby analýzy, dostatečné separace jednotlivých látek vyhodnocen jako nejlepší.

Otestováním jednotlivých kolon na daných gradientech byla jako optimální kolona zvolena kolona č. 16 Luna® Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, s velikostí částic 1,6 µm, s gradientem 5B.

6.2 Validace vyvinuté metody za finálních podmínek

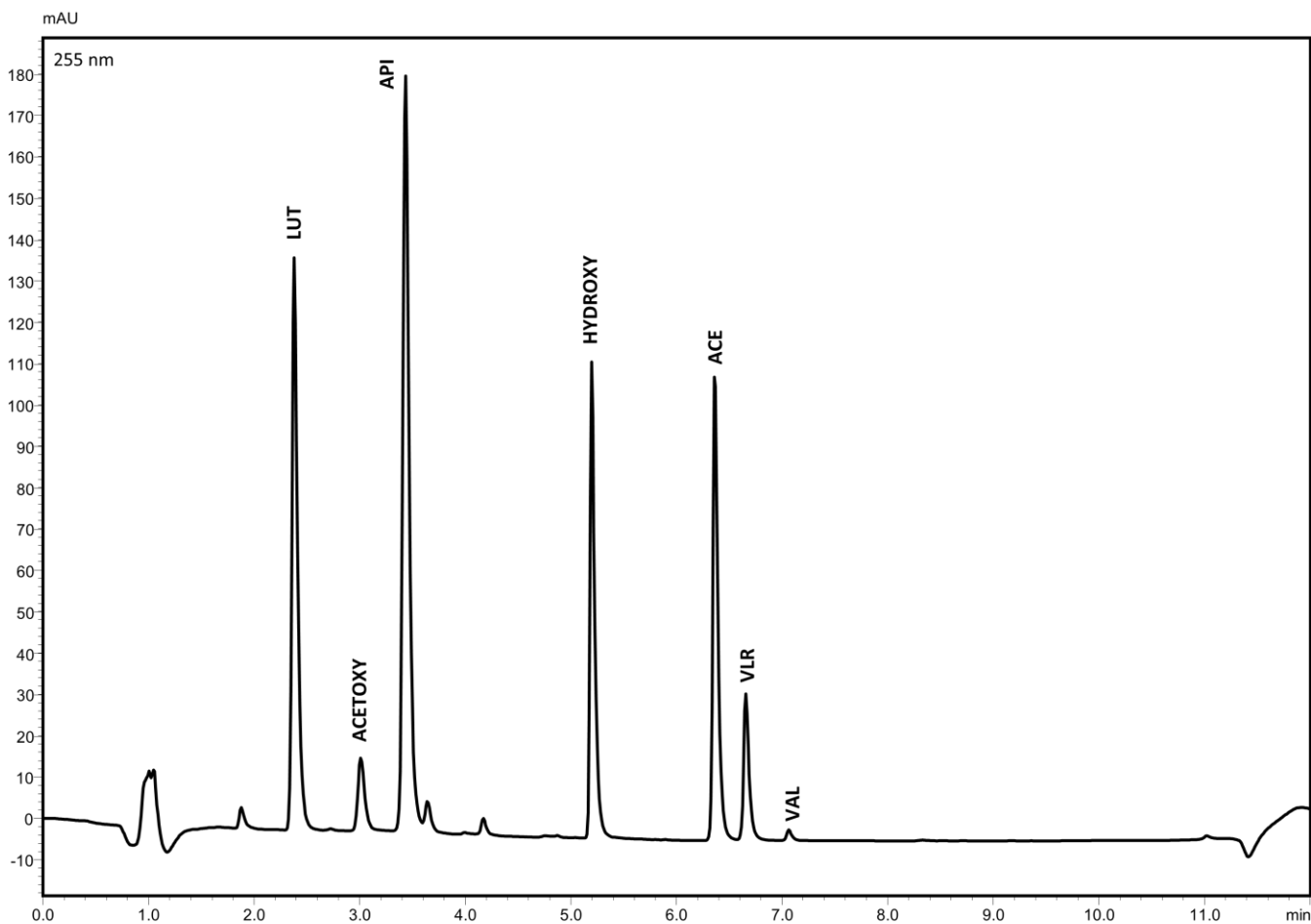
6.2.1 Test způsobilosti chromatografického systému

Pro ověření vhodnosti chromatografického systému se využil roztok směsi standardů uvedený v kapitole 5.4.2.1 o koncentraci 50 mg/l, kdy bylo provedeno celkem šest nástřiků. Hodnocenými parametry pro stanovení testu byly: opakovatelnost retenčních časů (t_R), opakovatelnost ploch píků, faktor symetrie (A_s), rozlišení (R_s) a kapacitní faktor (k).

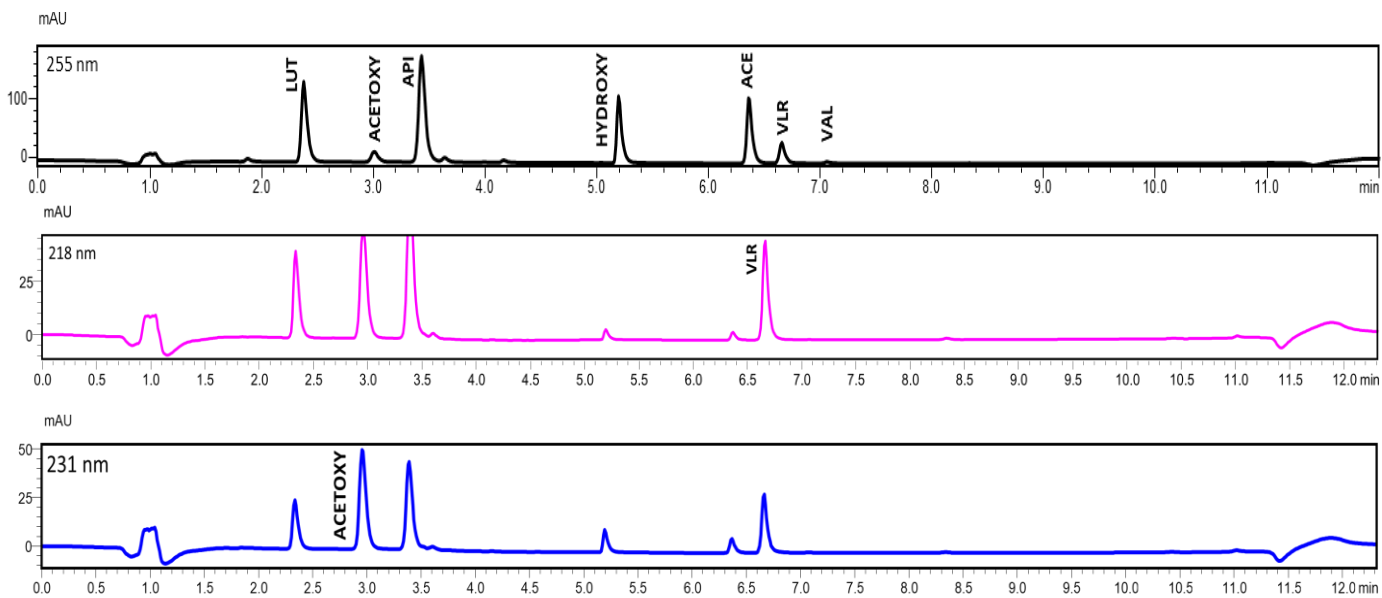
Tabulka 21: Vyhodnocení parametrů testu způsobilosti chromatografického systému.

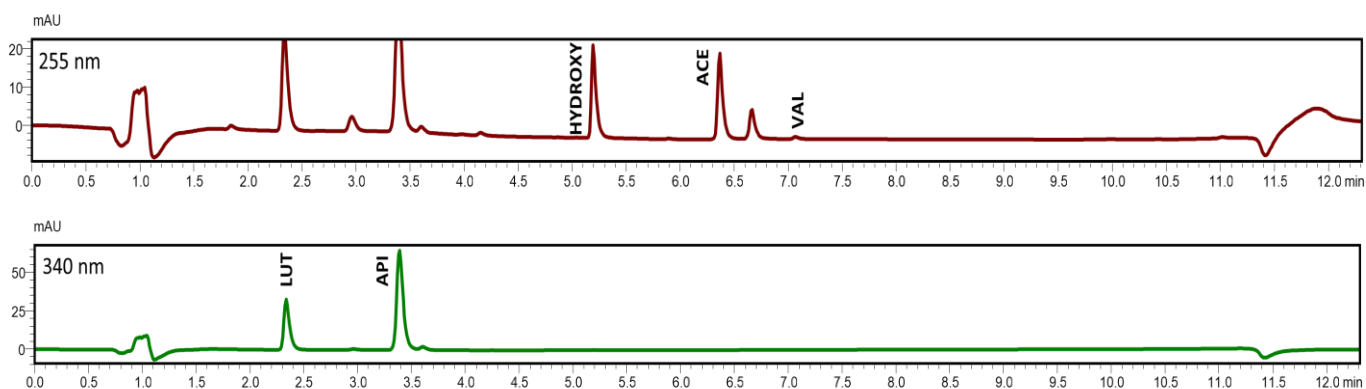
Standardy	t_R	t_R RSD [%]	A_s	R_s	k
luteolin	2,381	0,171	1,493	8,070	1,279
kyselina acetoxyvalerenová	3,012	0,189	1,374	5,098	1,881
apigenin-7-glukosid	3,438	0,150	1,294	3,295	2,289
kyselina hydroxyvalerenová	5,195	0	1,802	16,433	3,969
acevaltrát	6,363	0,095	1,396	12,632	5,089
kyselina valerenová	6,652	0,085	1,487	2,869	5,364
valepotriát	7,059	0,058	1,460	3,944	5,755

Chromatogramy získané při testu způsobilosti chromatografického systému zobrazují následující obrázky.



Obrázek 33: Chromatogram testu způsobilosti chromatografického systému naměřený při vlnové délce 255 nm.





Obrázek 34: Chromatogramy zobrazující test způsobilosti chromatografického systému naměřené při vlnových délkách 218, 231, 255 a 340 nm.

Součástí testu způsobilosti chromatografického systému je i opakovatelnost ploch píků analyzovaných látek, která byla provedena na třech koncentračních hladinách – 10 mg/l, 50 mg/l a 100 mg/l. Směs standardů byla dávkována celkem osmkrát. Výpočet opakovatelnosti byl proveden dle vzorce:

$$RSD = \frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{průměr}} * 100$$

Následující tabulky shrnují výsledky opakovatelnosti.

Tabulka 22: Opakovatelnost ploch píků analyzovaných látek měřená pro koncentraci 100 mg/l.

Standard	Luteolin	Kyselina acetoxyvalerenová	Apigenin-7-glukosid	Kyselina hydroxyvalerenová	Acevaltrát	Kyselina valerenová	Valepotriát
Plocha pod píkem	1211885	2204860	2734905	725121	778683	1525794	17635
	1211372	2203453	2733267	725087	779110	1525744	17630
	1212466	2205283	2737281	725159	778389	1526453	17719
	1211489	2203129	2733344	724677	778594	1526151	17614
	1214340	2210072	2742428	726420	780668	1532059	17659
	1214068	2209226	2740158	726198	780055	1529996	17693
	1213605	2208652	2739554	726557	780703	1531188	17696
	1209618	2202012	2730478	724317	777343	1525874	17658
Průměr	1212355	2205836	2736427	725442	779193	1527907	17663
Směrodatná odchylka	1598	3076	4099	839	1189	2695	37
RSD [%]	0,13	0,14	0,15	0,12	0,15	0,18	0,21

Tabulka 23: Opakovatelnost ploch píků analyzovaných látek měřená pro koncentraci 50 mg/l.

Standard	Luteolin	Kyselina acetoxyvalerenová	Apigenin-7-glukosid	Kyselina hydroxyvalerenová	Acevaltrát	Kyselina valerenová	Valepotriát
Plocha pod píkem	613162	1084894	1283061	363908	381610	765713	8778
	611555	1081664	1279182	362962	380918	764490	8764
	613685	1085300	1283832	364207	381873	766638	8757
	614539	1086502	1284541	364771	382941	767515	8759
	613347	1085025	1283597	364436	381840	766555	8764
	609694	1077819	1275026	362113	379785	765424	8729
	609199	1076312	1273556	361411	378682	760417	8677
	614770	1086290	1286028	362508	380615	762198	8679
Průměr	612494	1082976	1281103	363290	381033	764869	8738
Směrodatná odchylka	2122	3954	4647	1217	1342	2423	40
RSD [%]	0,35	0,37	0,36	0,33	0,35	0,32	0,45

Tabulka 24: Opakovatelnost ploch píků analyzovaných látek měřená pro koncentraci 10 mg/l.

Standard	Luteolin	Kyselina acetoxyvalerenová	Apigenin-7-glukosid	Kyselina hydroxyvalerenová	Acevaltrát	Kyselina valerenová	Valepotriát
Plocha pod píkem	98090	196752	265499	67420	62719	133266	1533
	98009	196799	265536	67355	62612	134157	1543
	98299	196900	265761	67566	62844	134124	1535
	98225	196845	265433	67306	62793	134129	1517
	98345	197275	266005	67664	62787	134682	1523
	98201	196654	265449	67468	62706	134490	1519
	98042	196303	265127	67545	62588	134285	1518
	98014	196249	264930	67495	62564	134318	1521
Průměr	98153	196722	265468	67477	62702	134181	1526
Směrodatná odchylka	132	330	335	117	104	417	10
RSD [%]	0,13	0,17	0,13	0,17	0,17	0,31	0,63

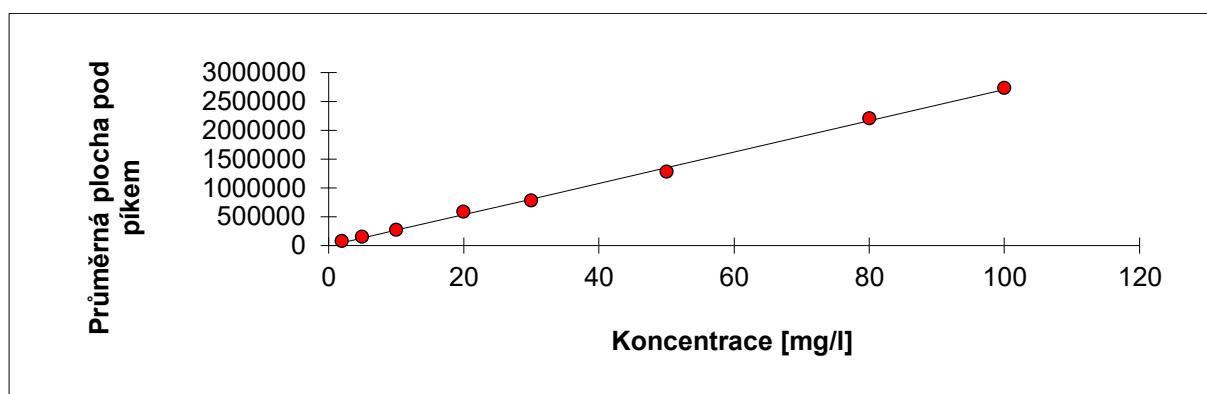
6.2.2 Linearita

Ke stanovení linearity byla využita kalibrační řada roztoků standardů o osmi koncentračních hladinách od 2 mg/l do 100 mg/l viz. kapitola 5.4.2.2. Celkem byly provedeny tři nástřiky roztoku od každé koncentrace. K výpočtu sloužily průměry ploch pod píky jednotlivých analyzovaných látek a pro vyhodnocení byla použita metoda lineární regrese.

6.2.2.1 Kalibrační závislost apigenin-7-glukosidu

Tabulka 25: Test linearity pro apigenin-7-glukosid.

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
2	65874
5	145228
10	263697
20	582199
30	768665
50	1274840
80	2196897
100	2720410



Obrázek 35: Kalibrační závislost apigenin-7-glukosidu.

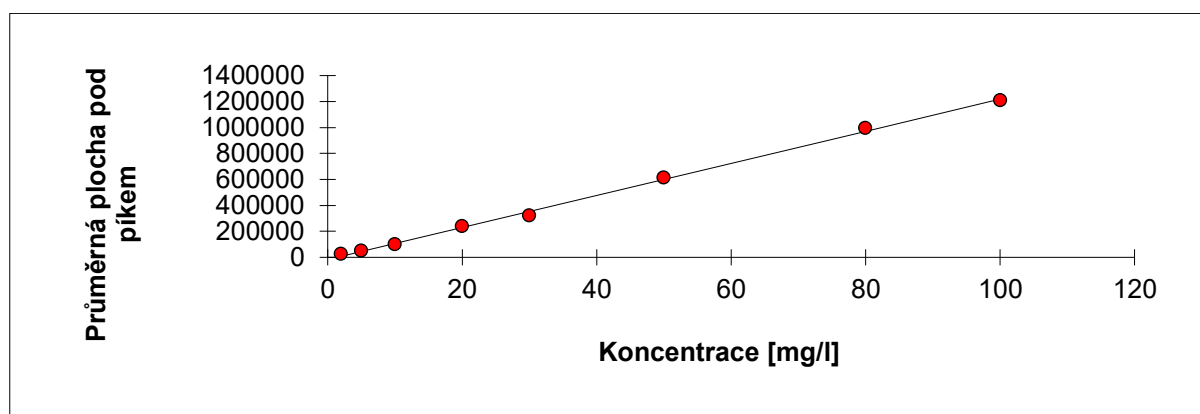
Tabulka 26: Parametry lineární regrese pro apigenin-7-glukosid.

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby ± 446 ± 22495
Směrnice	k =	27096	
Absolutní člen	q =	- 3719	
Korelační koeficient	r =	0,999187	
Reziduální odchylka	s =	43041	

6.2.2.2 Kalibrační závislost luteolinu

Tabulka 27: Test linearity pro luteolin.

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
2	21012
5	49343
10	97503
20	236784
30	318714
50	609879
80	993307
100	1206449



Obrázek 36: Kalibrační závislost luteolinu.

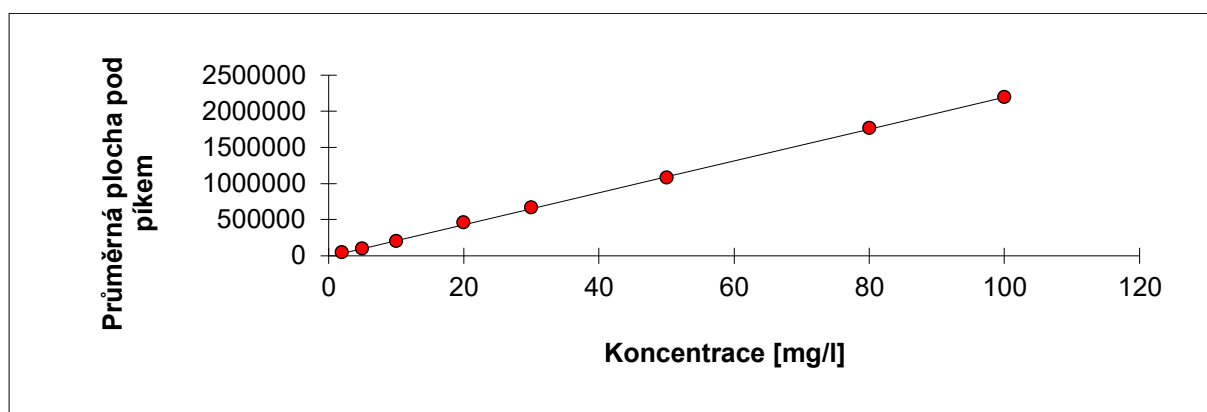
Tabulka 28: Parametry lineární regrese pro luteolin.

Statistické parametry pro regresi : $y = kx + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby ± 201 ± 10127
Směrnice	k =	12362	
Absolutní člen	q =	-17315	
Korelační koeficient	r =	0,999209	
Reziduální odchylka	s =	19377	

6.2.2.3 Kalibrační závislost kyseliny acetoxyvalerenové

Tabulka 29: Test linearitý pro kyselinu acetoxyvalerenovou.

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
2	39317
5	92233
10	195146
20	453827
30	662743
50	1077091
80	1760661
100	2192258



Obrázek 37: Kalibrační závislost kyseliny acetoxyvalerenové.

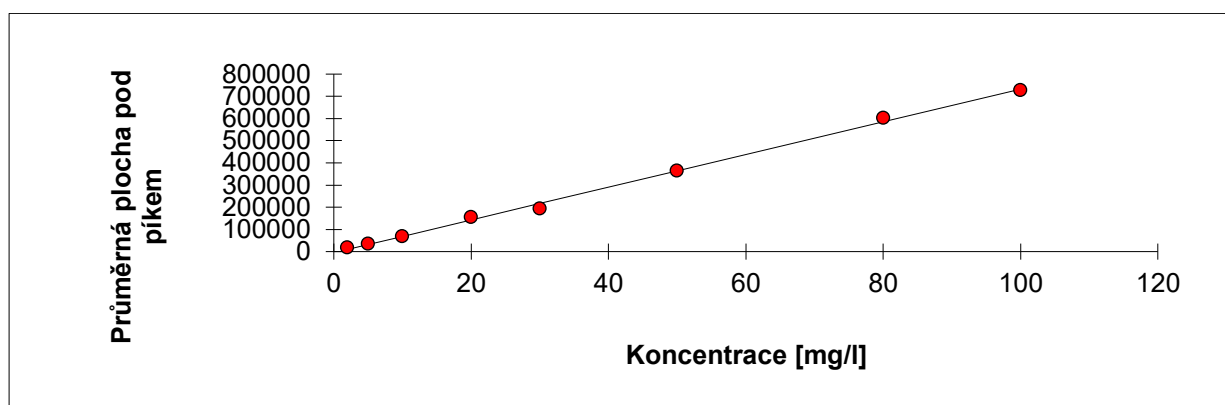
Tabulka 30: Parametry lineární regrese pro kyselinu acetoxyvalerenovou.

Statistické parametry pro regresi : $y = kx + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby ± 150 ± 7577
Směrnice	k =	22043	
Absolutní člen	q =	-9186	
Korelační koeficient	r =	0,999861	
Reziduální odchylka	s =	14498	

6.2.2.4 Kalibrační závislost kyseliny hydroxyvalerenové

Tabulka 31: Test linearitity pro kyselinu hydroxyvalerenovou.

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
2	16810
5	32452
10	67417
20	152567
30	192862
50	361788
80	600024
100	725698



Obrázek 38: Kalibrační závislost kyseliny hydroxyvalerenové.

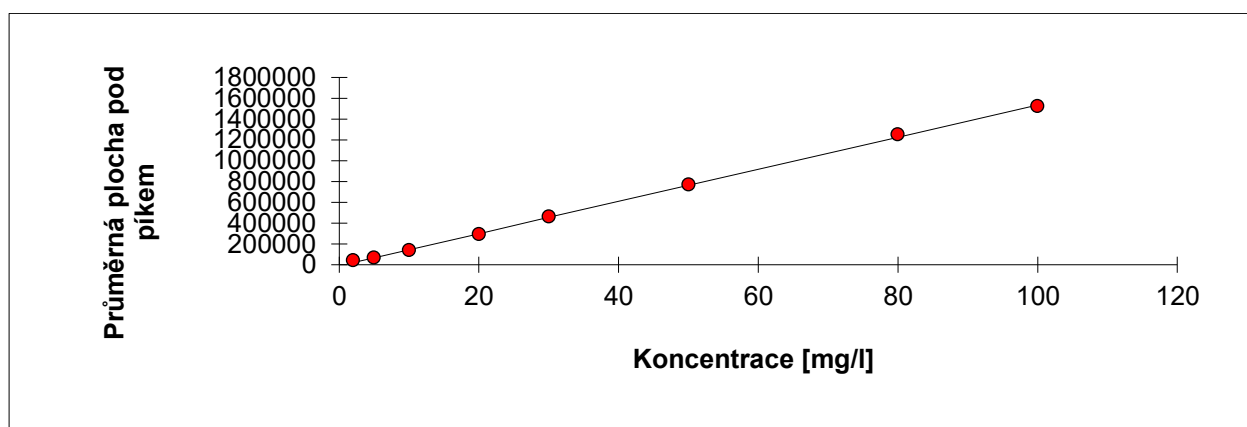
Tabulka 32: Parametry lineární regrese pro kyselinu hydroxyvalerenovou.

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby ± 132 ± 6665
Směrnice	k =	7370	
Absolutní člen	q =	-4916	
Korelační koeficient	r =	0,999036	
Reziduální odchylka	s =	12753	

6.2.2.5 Kalibrační závislost kyseliny valerenové

Tabulka 33: Test linearity pro kyselinu valerenovou.

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
2	39304
5	61280
10	133741
20	287996
30	456405
50	764201
80	1246458
100	1520392



Obrázek 39: Kalibrační závislost kyseliny valerenové.

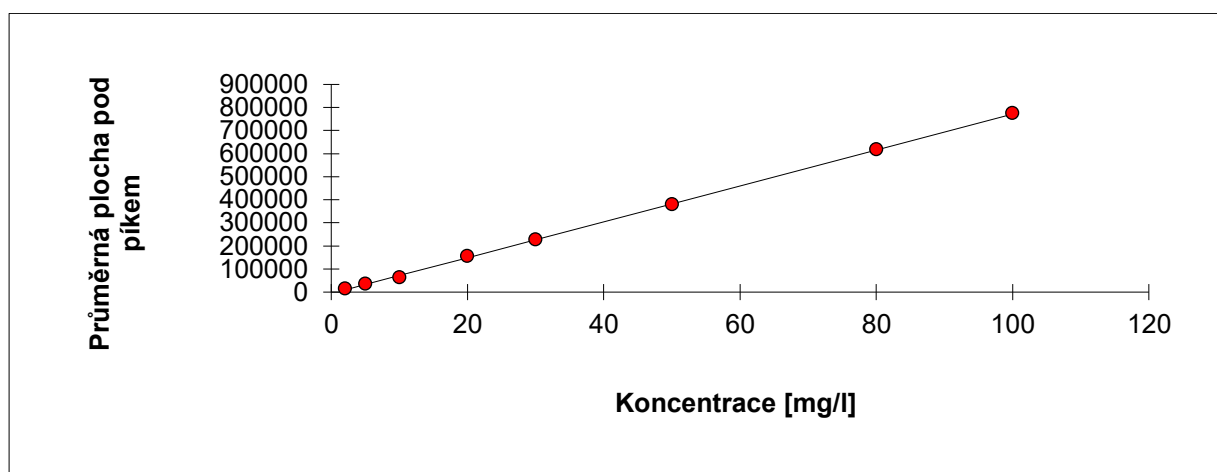
Tabulka 34: Parametry lineární regrese pro kyselinu valerenovou.

Statistické parametry pro regresi : $y = kx + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby ± 150 ± 7557
Směrnice	k =	15448	
Absolutní člen	q =	-9801	
Korelační koeficient	r =	0,999718	
Reziduální odchylka	s =	14458	

6.2.2.6 Kalibrační závislost acevaltrátu

Tabulka 35: Test linearitý pro acevaltrát.

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
2	13474
5	34702
10	62340
20	155103
30	225374
50	378011
80	616433
100	773182



Obrázek 40: Kalibrační závislost acevaltrátu.

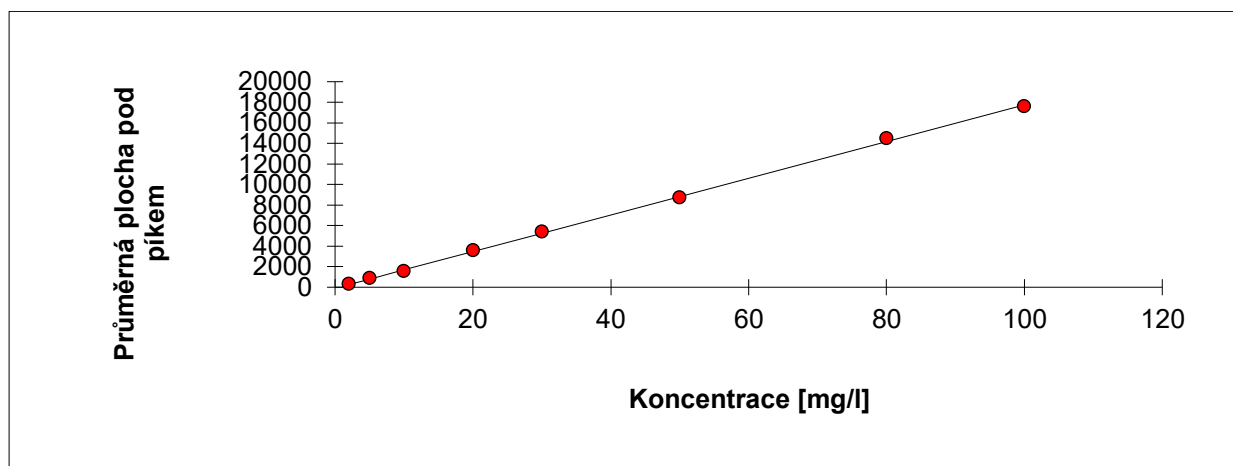
Tabulka 36: Parametry lineární regrese pro acevaltrát.

Statistické parametry pro regresi : $y = k x + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby ± 55 ± 2755
Směrnice	k =	7779	
Absolutní člen	q =	-6477	
Korelační koeficient	r =	0,999852	
Reziduální odchylka	s =	5271	

6.2.2.7 Kalibrační závislost valepotriátu

Tabulka 37: Test linearity pro valepotriát.

Koncentrace [mg/l]	Průměrná plocha pod píkem
2	272
5	836
10	1522
20	3533
30	5366
50	8679
80	14428
100	17583



Obrázek 41: Kalibrační závislost valepotriátu.

Tabulka 38: Parametry lineární regrese pro valepotriát.

Statistické parametry pro regresi : $y = kx + q$			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby ± 2 ± 84
Směrnice	k =	178	
Absolutní člen	q =	-95	
Korelační koeficient	r =	0,999738	
Reziduální odchylka	s =	161	

6.2.3 Správnost a přesnost – tobolky

K vyhodnocení správnosti metody byl analyzován doplněk stravy Sleepnox forte NatureVia®. Celkem bylo připraveno osm navážek vzorku s přídatkem sedmi standardů analyzovaných látek, tři pracovní roztoky standardu a tři roztoky vzorku bez přídatku standardů stanovovaných látek. Přesný postup přípravy roztoků popisuje kapitola 5.4.2.4. Jednotlivé připravené roztoky byly dávkovány na kolonu ve třech opakováních.

Tabulka 39: Parametr správnosti a přesnosti vyvinuté metody pro tobolky.

	Správnost [%]	Směrodatná odchylka	RSD [%]
LUT	100,85	1,68	1,66
ACETOXY	86,82	4,43	4,95
API	96,34	1,91	1,93
HYDROXY	92,65	2,69	2,86
ACE	91,71	3,03	3,22
VLR	91,38	2,16	2,30
VAL	106,04	2,81	2,73

6.2.4 Správnost a přesnost – kapky

K vyhodnocení správnosti metody pro doplňky stravy v tekuté lékové formě byl analyzován potravní doplněk Dr. Popov – Kozlík lékařský. Bylo připraveno osm navážek vzorku s přídatkem sedmi standardů analyzovaných látek, dále tři pracovní roztoky standardu a tři roztoky vzorku bez přídatku standardů stanovovaných látek. Přesný postup přípravy roztoků popisuje kapitola 5.4.2.5. Připravené roztoky byly dávkovány na kolonu ve třech opakováních.

Tabulka 40: Parametr správnosti a přesnosti vyvinuté metody pro kapky.

	Správnost [%]	Směrodatná odchylka	RSD [%]
LUT	100,02	3,24	3,24
ACETOXY	107,49	0,94	0,88
API	102,20	2,10	2,07
HYDROXY	102,39	1,91	1,89
ACE	105,21	0,64	0,61
VLR	98,88	1,58	1,59
VAL	103,35	2,99	3,03

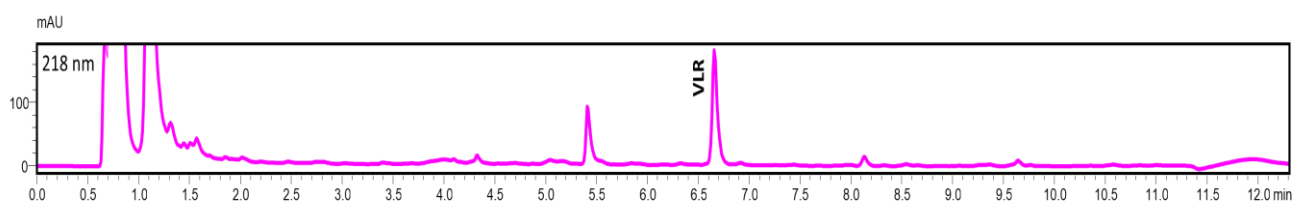
6.3 Stanovení vzorků

6.3.1 Tablety, kapsle

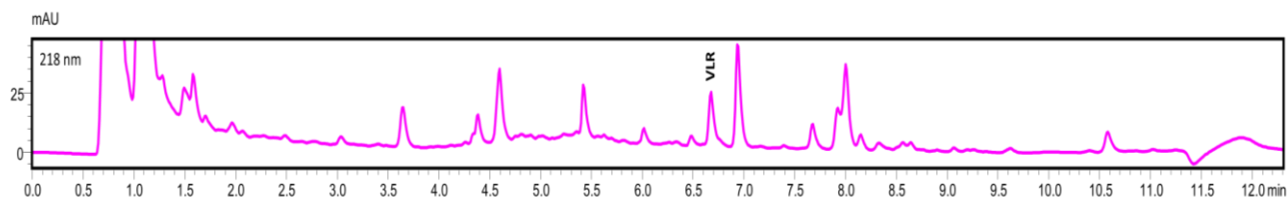
Příprava vzorků doplňků stravy ve formě tablet a kapslí probíhala postupem uvedeným v kapitole 5.4.3 – určením průměrné hmotnosti jedné kapsle / tablety navážením deseti takových jednotek a rozpuštěním v daných rozpouštědlech. Od každého ze vzorků potravního doplňku byly naváženy dvě navážky. Upravené roztoky vzorků byly třikrát nadávkovány na kolonu pro získání ploch píků a jejich následné zprůměrování.

Koncentrace látek obsažených v potravních doplncích byla vypočtena z průměrů ploch pod píkem standardu a analytu a koncentrace standardu. K výpočtu obsahu doplňku stravy v mg bylo zapotřebí provést přepočet s ohledem na celkovou hmotnost kapsle / tablety a objem extrakčního činidla.

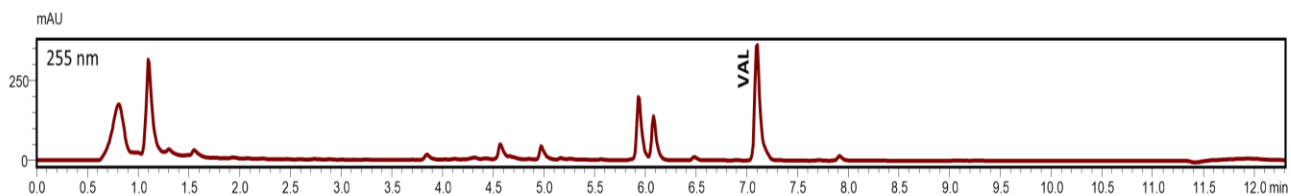
Obrázky uvedené níže zobrazují chromatogramy analyzovaných potravních doplňků. V jednotlivých doplncích stravy však nebyly zastoupeny všechny analyzované látky najednou. Zaměřili jsme se proto zejména na obsah kyseliny valerenové a valepotriátu, jelikož především u nich se předpokládá, že jsou hlavním nositelem účinku. Ostatní látky byly zastoupeny pouze ve stopovém množství.



Obrázek 42: Chromatogram doplňku stravy Kneipp.

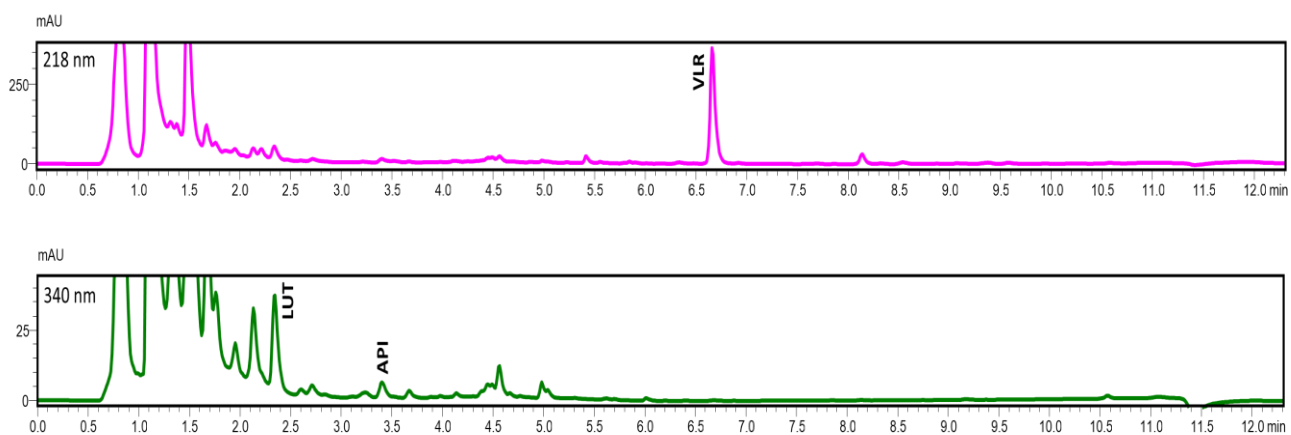


Obrázek 43: Chromatogram doplňku stravy Neospan forte.

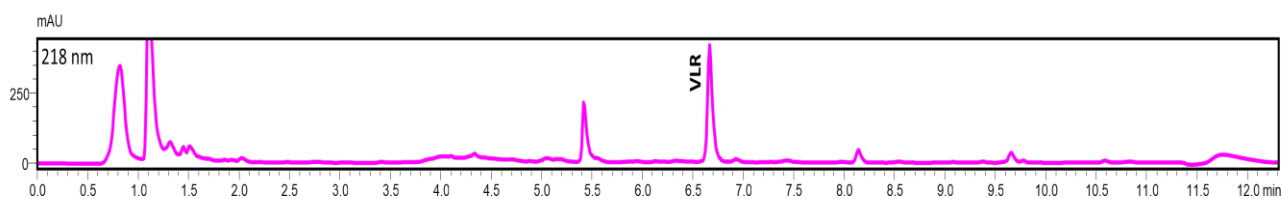


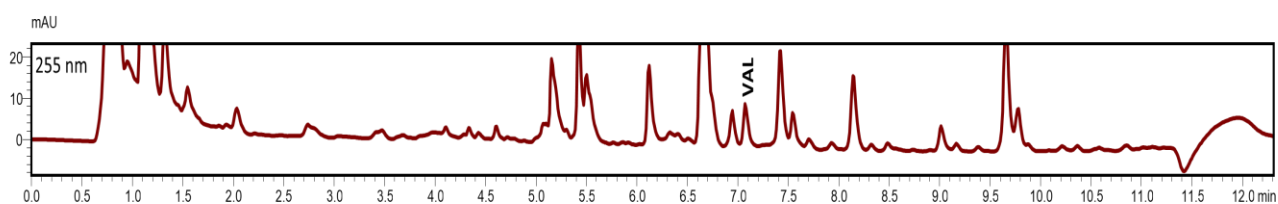
Obrázek 44: Chromatogram doplňku stravy Epiderma.

Pro porovnání jsou přiloženy chromatogramy s obsahem analyzovaných látek u registrovaných léčivých přípravků.



Obrázek 45: Chromatogram registrovaného léčivého přípravku Persen forte.





Obrázek 46: Chromatogram registrovaného léčivého přípravku Kneipp.

Tabulka 41: Obsah látek v doplňcích stravy deklarovaný výrobcem pro tablety, tobolky a dražé.

Značka	Doplňěk stravy	Obsah extraktu kozlíku lékařského [mg/1 cps./tbl./drg.]
Advance	Calmin	20
Allnature	Kozlík bylinný extrakt	100
Green-Swan Ph.	Anxiolan	250
Barnys®	HypnoX forte	150
Dr. Max	Happy Sleep	150
Epiderma®	Spi v klidu	300
Kneipp®	Kozlík plus	200
NatureVia®	Sleepnox forte	150
Naturvita	Antistres	12,5
Simply You Ph.	Neospan forte	200
Terezia	Spánek & Relax	100

Tabulka 42: Obsah látek v registrovaných léčivých přípravcích deklarovaný výrobcem pro tablety a tobolky.

Značka	Registrovaný léčivý přípravek	Obsah extraktu kozlíku lékařského [mg/1 cps./tbl.]
Kneipp®	Kozlík	500
Zentiva®	Persen forte	87,5

Tabulka 43: Stanovení analyzovaných látek v doplňcích stravy ve formě tablet, tobolek a dražé.

Testovaný potravní doplněk	Množství analyzované látky v jedné kapsli / tabletě / dražé [mg]						
	LUT	ACETOXY	API	HYDROXY	ACE	VLR	VAL
Advance - Calmin	-	-	-	-	-	-	-
Allnature - Kozlík	-	-	-	-	-	-	0,03
Green-Swan Ph. - Anxiolan	-	-	-	-	-	-	0,04
Barnys® - HypnoX forte	-	-	-	-	-	-	-
Dr. Max - Happy Sleep	-	-	-	-	-	-	-
Epiderma® - Spi v klidu	-	-	-	-	-	-	70,13
Kneipp® - Kozlík plus	-	-	-	-	-	0,34	-
NatureVia® - Sleepnox forte	-	-	-	-	-	-	-
Naturvita - Antistres	-	-	-	-	-	-	0,22
Simply You Ph. - Neospan forte	-	-	-	-	-	0,05	-
Terezia - Spánek & Relax	-	-	-	-	-	-	-

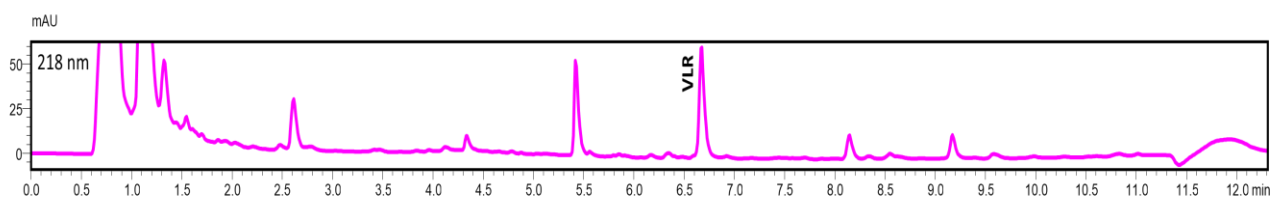
Tabulka 44: Stanovení analyzovaných látek v léčivých přípravcích ve formě tablet a tobolek.

Testovaný léčivý přípravek	Množství analyzované látky v jedné kapsli / tabletě [mg]						
	LUT	ACETOXY	API	HYDROXY	ACE	VLR	VAL
Kneipp® - Kozlík	–	–	–	–	–	0,82	1,59
Zentiva® - Persen Forte	0,10	–	0,01	–	–	0,70	–

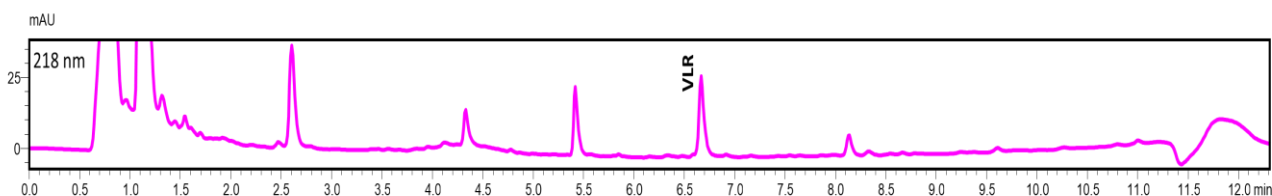
6.3.2 Kapky

Testované potravní doplňky ve formě kapek byly připraveny dle kapitoly 5.4.3. Od každého doplňku stravy byly otestovány dva vzorky. Na kolonu byly nadávkovány tři nástřiky pro získání průměrných ploch pod píkem analyzovaných látek. K výpočtu koncentrace obsahových látek ve vzorcích byl použit postup jako u pevných lékových forem.

Následující obrázky zobrazují chromatogramy analyzovaných doplňků stravy ve formě kapek.



Obrázek 47: Chromatogram potravního doplňku Tinctura valerianae.



Obrázek 48: Chromatogram potravního doplňku ve formě kapek – Dr. Popov.

Tabulka 45: Obsah látek v doplňcích stravy deklarovaný výrobcem pro kapky.

Značka	Doplněk stravy	Obsah extraktu kozlíku lékařského v doporučené denní dávce [mg]
Dr. Popov	Kozlík lékařský	51 (doporučená denní dávka 60 kapek)
Green idea	Kozlík lékařský extrakt	60-120 (doporučená denní dávka 15-30 kapek 2x denně)
Česká lékárna holding (Dr. Max - e-laboratoř)	Tinctura valerianae	výrobce neuvádí

Tabulka 46: Stanovení analyzovaných látek v doplňcích stravy – kapky.

Testovaný přípravek	Množství analyzované látky v 10 ml roztoku [mg/l]						
	LUT	ACETOXY	API	HYDROXY	ACE	VLR	VAL
Dr. Popov	–	–	–	–	–	66,77	–
Green idea	–	–	–	–	–	–	–
Česká lékárna holding (Dr. Max - e-laboratoř)	–	–	–	–	–	135,01	–

7 Závěr

Tato diplomová práce se zaměřovala na vývoj, optimalizaci a validaci chromatografické metody pro stanovení sedmi obsahových látek kozlíku lékařského – apigenin-7-glukosidu, luteolinu, kyseliny valerénové, kyseliny acetoxyvalerénové, kyseliny hydroxyvalerénové, acevaltrátu a valepotriátu ve čtrnácti testovaných potravních doplňcích pevné i tekuté lékové formy. Jmenovitě se jedná o: Advance Calmin, Allnature Kozlík bylinný extrakt, Anxiolan od firmy Green-Swan Pharmaceuticals CR, a.s., Barnys HypnoX forte od Biopol GN, Dr. Max Happy Sleep, Epiderma Spi v klidu, Kneipp Kozlík plus, Naturevia Sleepnox forte, Naturvita Antistres, Neospan forte od Simply You Pharmaceuticals a.s., Terezia Spánek & Relax, Dr. Popov Kozlík lékařský, Green idea Kozlík lékařský extrakt a Tinctura valerianae od Česká lékárna holding a.s.. Pro porovnání obsahových látek byly také analyzovány registrované léčivé přípravky – Kneipp Kozlík 500 mg a Persen forte – Zentiva Group, a.s..

Pro výslednou validovanou metodu byla použita gradientová eluce se složením mobilní fáze A: acetonitril, mobilní fáze B: 0,1% H₃PO₄. Celková doba analýzy činila necelých 7,5 minuty za použití kolony Luna Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, s velikostí částic 1,6 μm a s gradientem 5B. Nastříkovaný objem byl 2 μl a průtoková rychlost 0,4 ml/min. Analýza probíhala za konstantní teploty 30 °C. Analyzované látky byly detekovány pomocí PDA detektoru při vlnových délkách 218 nm pro kyselinu valerénovou, 231 nm pro kyselinu acetoxyvalerénovou, 255 nm pro kyselinu hydroxyvalerénovou, acevaltrát a valepotriát, 340 nm pro apigenin-7-glukosid a luteolin.

Vyvinutá a validovaná metoda disponuje krátkou dobou analýzy s velmi malou spotřebou použitých rozpouštědel a testovaných vzorků.

Obsahové látky extraktů na bázi kozlíku lékařského v analyzovaných potravních doplňcích byly obsaženy ve velmi malých množstvích. Příčinou může být nevhodné skladování a následné zpracování rostlinných částí (sušení) nebo již výběr samotných rostlin s ohledem na jejich stanoviště či kvalitu půdy. Získané výsledky pro stanovení analyzovaných látek v potravních doplňcích shrnují tabulky 43 a 46. Obsah látek v registrovaných léčivých přípravcích shrnuje tabulka 44.

Výrobci uvádějí množství rostlinného extraktu v miligramech, nikoliv však zastoupení jednotlivých analyzovaných látek nebo případně jejich sumu. Klíčová je pro nás však kyselina valerénová, které je přisuzován hlavní účinek a také obsah valepotriátu. Český lékopis vyžaduje u Kozlíkového extraktu suchého obsah nejméně 0,25 % seskviterpenových kyselin, který je vztažen především na kyselinu valerénovou. Množství extraktu kozlíku lékařského je producenty pevných lékových forem uváděn na obsah v jedné tobolce, tabletě nebo dražé. Z hlediska obsahu látek v testovaných doplňcích stravy v pevné lékové formě se jevil jako nejkvalitnější potravní doplněk Epiderma® Spi v klidu. V porovnání s množstvím látek v ostatních přípravcích vyšel nejlépe. Značné bylo zastoupení valepotriátu, který činil 23,38 % z deklarovaného množství kozlíkového extraktu výrobce.

Jako druhý vyšel nejlépe doplněk Antistres od firmy Naturvita. Celkové množství rostlinného extraktu činilo 1,76 %, přičemž byl naměřen obsah valepotriátu.

Nejméně kvalitní přípravky, ve kterých námi vyvinutou metodou nebyly nalezeny žádné ze stanovovaných látek byl Calmin – Advance, Hypnox forte – Barnys®, Happy Sleep Dr. Max, Sleepnox forte – NatureVia® a Terezia Spánek & Relax. V ostatních doplňcích stravy bylo zastoupení analyzovaných látek s ohledem na deklarovaný obsah výrobcem menší než 1 %.

V tekuté lékové formě vyšla nejlépe ze třech testovaných potravních doplňků Tinctura valerianae od Česká lékárna holding se zastoupením kyseliny valerénové, avšak výrobce neuvádí množství extraktu kozlíku v doporučené denní dávce. Množství kyseliny valerénové bylo na rozdíl od Dr. Popov – Kozlík lékařský v této tinktuře zhruba dvojnásobné. Přítomnost jakékoliv stanovované látky nebyla potvrzena námi vyvinutou metodou u přípravku Green idea – Kozlík lékařský extrakt.

Pokud bychom porovnávali doplňky stravy pevné a tekuté lékové formy v jedné dávce mezi sebou, s ohledem na množství valepotriátu bychom volili pevnou lékovou formu přípravku Epiderma®. Pro nejvyšší obsah kyseliny valerénové ze všech testovaných vzorků by byla volbou Tinctura valerianae.

I přes naměřená velmi malá množství látek z extraktu kozlíku lékařského v jednotlivých doplňcích stravy může být účinek některých přípravků zaručen obsahem dalších rostlinných extraktů, které se používají při problémech se spánkem a obtížemi s ním souvisejícími. Ve většině případů se jedná o kombinaci bylin, s výjimkou doplňků stravy Allnature – Kozlík bylinný extrakt, Kneipp – Kozlík plus a tekutých lékových forem. Nejčastěji jsou přítomny extrakty z chmele otáčivého, mučenky pletní, meduňky lékařské nebo levandule lékařské. Zajímavé by bylo stanovit obsah dalších látek rostlinných extraktů u těchto přípravků.

Registrované léčivé přípravky musí splňovat požadavky lékopisu. Léčivý přípravek Kneipp – Kozlík 500 mg obsahuje jako léčivou látku Valerianae radix pulverata (kozlíkový kořen práškový). Požadavek na obsah seskviterpenových kyselin, vyjádřeno jako kyselina valerénová je nejméně 0,10 %. Po otestování vzorku tohoto přípravku činil obsah seskviterpenových kyselin 0,14 %, čímž je požadavek splněn. Druhý registrovaný léčivý přípravek Persen forte od Zentivy obsahuje jako účinnou látku Valerianae extractum siccum (kozlíkový extrakt suchý). Česká lékopis požaduje obsah nejméně 0,25 % seskviterpenových kyselin, vyjádřeno jako kyselina valerénová. Přípravek se svým obsahem 0,25 % kyseliny valerénové rovněž požadavek splňuje.

8 Seznam použité literatury

- [1] *Kozlík lékařský 200 mg (90 cps.)*. Online. VitaHarmony. Dostupné z: <https://www.vitaminy-mineraly.cz/kozlik-lekarsky-200-mg/>. [cit. 2024-03-14].
- [2] *Kozlík lékařský - Valeriana officinalis L.* Online. Z Hnízda. 2020. Dostupné z: <https://www.z-hnizda.cz/l/kozlik-lekarsky-valeriana-officinalis-l/>. [cit. 2024-03-14].
- [3] VŠOLKOVÁ, Gabriela. *Kozlík lékařský*. ČESKÝ ROZHLAS. *Ostrava* [online]. 2003. Dostupné z: <https://ostrava.rozhlas.cz/kozlik-lekarsky-7031321>. [cit. 2024-03-14].
- [4] *Kozlík lékařský*. Online. Pro Zdravé Žití. Dostupné z: <https://www.prozdraveziti.cz/kozlik-lekarsky>. [cit. 2024-03-14].
- [5] *Jaký je rozdíl mezi lékem a doplňkem stravy?* Online. O lécích.cz. Dostupné z: <https://www.olecich.cz/encyklopedie/jaky-je-rozdil-mezi-lekem-a-doplnekem-stravy>. [cit. 2024-03-14].
- [6] *Doplňk stravy*. Online. Národní zdravotnický informační portál. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/477>. [cit. 2024-03-14].
- [7] *Rozlišení doplňků stravy od léčivých přípravků*. Online. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplunku-stravy-od-lecivych-pripravku>. [cit. 2024-03-14].
- [8] JAHODÁŘ, Luděk. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 2., upr. a dopl. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1791-6.
- [9] *Léčivé rostliny*. Přeložil Jana JINDROVÁ. Ottův průvodce přírodou. Praha: Ottovo nakladatelství, 2010. ISBN 978-80-7360-588-9.
- [10] *MAYER, Johannes Gottfried; UEHLEKE, Bernhard a SAUM, Kilian. Bylinky z klášterní lékárny: více než 100 léčivých rostlin: přesné receptury pro úspěšné domácí použití. Vydání třetí (zkrácené). Ilustroval Susanne BRÄUNIG, ilustroval Harald VORBRUGG, přeložil Rudolf RADA. Praha: Knižní klub, 2015. ISBN 978-80-242-4819-6.*
- [11] DUGAS, Dionýz. *Bylinkový receptář: nejlepší recepty lidové medicíny*. 3. vydání. Praha: Ottovo nakladatelství, 2015. ISBN 978-80-7451-460-9.
- [12] *Český lékopis 2017: Pharmacopoea bohemica MMXVII (Ph. B. MMXVII)*. 4. díl, Evropská část, Národní část. Praha: Grada, 2017. ISBN 978-80-2710500-7.
- [13] *ROTOVÁ, Gabriela. Fytoterapeutika s tlumivým účinkem na CNS ... kozlík lékařský*. Online. Equichannel.cz. 2022. Dostupné z: <https://equichannel.cz/clanky/zdravi-a>

- veterinarni-pece/fytoterapeutika-s-tlumivym-ucinkem-na-cns-kozlik-lekarsky. [cit. 2024-03-15].
- [14] PINDER, Natalie E.; LIGOCKI, Isaac Y.; HORTON, Brent M. a HOOVER, John E. Valerenic acid reduces anxiety-like behavior in young adult, female (C57BL/6J) mice. Online. *Behavioural Brain Research*. 2024, roč. 457. ISSN 01664328. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114717>. [cit. 2024-02-20].
- [15] HATTESOHL, Miguel; FEISTEL, Björn; SIEVERS, Hartwig; LEHNFELD, Romanus; HEGGER, Mirjam et al. Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. Online. *Phytomedicine*. 2008, roč. 15, č. 1-2, s. 2-15. ISSN 09447113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.11.027>. [cit. 2024-02-20].
- [16] WILLS, R.B.H. a SHOHET, D. Changes in valerenic acids content of valerian root (*Valeriana officinalis* L. s.l.) during long-term storage. Online. *Food Chemistry*. 2009, roč. 115, č. 1, s. 250-253. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.011>. [cit. 2024-02-25].
- [17] *Valerenic acid*. Online. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. PubChem. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Valerenic-acid#section=2D-Structure>. [cit. 2024-03-26].
- [18] *(E)-3-[(1R,4S,7R,7aR)-1-acetyloxy-3,7-dimethyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-1H-inden-4-yl]-2-methylprop-2-enoic acid*. Online. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. PubChem. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6537490#section=2D-Structure>. [cit. 2024-03-26].
- [19] *Hydroxyvalerenic acid*. Online. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. PubChem. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6537505>. [cit. 2024-03-26].
- [20] ZENTRICH, Josef Antonín. *Zentrichova encyklopedie fytoterapie: Aencyclopaedia phytotherapeutica Centriciana*. Olomouc: Fontána, 2014. ISBN 978-80-7336-771-8.
- [21] *Valtrate*. Online. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. PubChem. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/442436#section=2D-Structure>. [cit. 2024-03-26].
- [22] *Acevaltrate*. Online. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. PubChem. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65717#section=2D-Structure>. [cit. 2024-03-26].

- [23] TŮMOVÁ, Lenka. *Valerianae radix – možné interakce s ostatními léky*. Online. Praktické lékárenství. 2008. Dostupné z: <https://www.solen.cz/pdfs/lek/2008/01/06.pdf>. [cit. 2024-03-05].
- [24] *Kozlík lékařský pro klidnější nervy*. Online. Kneipp. Dostupné z: https://shop.kneipp.com/cz_cs/magazin/filosofie-kneippu/lexikon-bylin-a-lecivych-rostlin/herbar/kozlik-lekarsky/?gclid=Cj0KCQjw6pLZBRCxARIsALaaY9YP5cAX2Kj_iLV1T2CRSTP8100TPELkHZClwd659oNB0lebXqjhqjUaAg7cEALw_wcB. [cit. 2024-03-05].
- [25] MAŤHOVÁ, Michaela. *Kozlík lékařský*. Online. Bylinkový ráj. Dostupné z: <https://bylinkovyraj.net/kozlik-lekarsky/>. [cit. 2024-03-05].
- [26] *Kozlík lékařský (Valeriana officinalis)*. Online. Herbal Store. 2017. Dostupné z: <https://www.herbal-store.cz/clanek/52/kozlik-lekarsky-valeriana-officinalis/>. [cit. 2024-03-05].
- [27] *KOZLÍK LÉKAŘSKÝ (Valeriana officinalis) - sběr a sušení*. Online. BYLINÁŘ – INTERAKTIVNÍ STUDIJNÍ MATERIÁL O LÉČIVÝCH ROSTLINÁCH PRO ŽÁKY A UČITELE PRVNÍHO STUPNĚ ZÁKLADNÍ ŠKOLY. Dostupné z: https://www.ped.muni.cz/wchem/sm/dp/davidova/www_zaci1/kozlik_sber.html. [cit. 2024-03-05].
- [28] GONULALAN, Ekrem-Murat; BAYAZEID, Omer; YALCIN, Funda-Nuray a DEMIREZER, Lutfiye-Omur. The roles of valerenic acid on BDNF expression in the SH-SY5Y cell. Online. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2018, roč. 26, č. 7, s. 960-964. ISSN 13190164. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.05.005>. [cit. 2024-03-27].
- [29] ČERNOCHOVÁ, Ellen. *Šanta a kozlík - co jsou zač a proč je musíte mít?* Online. Svět kočiček. Dostupné z: <https://www.svetkocicek.cz/jak-pecovat-o-kocku/santa-a-kozlik-co-jsou-zac-a-proc-je-musite-mit/>. [cit. 2024-03-06].
- [30] *Valerian: The Catnip Alternative*. Online. Cheshire & Wain. 2022. Dostupné z: <https://www.cheshireandwain.com/blogs/journal/what-is-valerian-and-are-cats-attracted>. [cit. 2024-03-06].
- [31] ŠTAUD, František. *Hypnosedativa/anxiolytika*. Online. KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové UK. Dostupné z: https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KFLT/?path=farmakologie+ii+-+letni+semestr%5cfarmakologie+letni+semestr%5csp+farmacie_p%c5%99edn%c3%a1%c5%a1ky+farmakologie+ii_texty. [cit. 2024-03-06].
- [32] WEIR, C.J.; MITCHELL, S.J. a LAMBERT, J.J. Role of GABAA receptor subtypes in the behavioural effects of intravenous general anaesthetics. Online. *British Journal of*

- Anaesthesia*. 2017, roč. 119, s. i167-i175. ISSN 00070912. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/bja/aex369>. [cit. 2024-03-06].
- [33] MARTIN, Jan a MARTINOVÁ, Denisa. *Léčivé rostliny s hypnotickým a sedativním účinkem*. Online. Praktické lékárenství. 2014. Dostupné z: <https://farmaciepropraxi.cz/pdfs/lek/2014/06/08.pdf>. [cit. 2024-03-07].
- [34] SAVAGE, Karen; FIRTH, Joseph; STOUGH, Con a SARRIS, Jerome. GABA-modulating phytomedicines for anxiety: A systematic review of preclinical and clinical evidence. Online. *Phytotherapy Research*. 2018, roč. 32, č. 1, s. 3-18. ISSN 0951-418X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ptr.5940>. [cit. 2024-03-28].
- [35] BENKE, Dietmar; BARBERIS, Andrea; KOPP, Sascha; ALTMANN, Karl-Heinz; SCHUBIGER, Monika et al. GABAA receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerianic acid, a major constituent of valerian root extracts. Online. *Neuropharmacology*. 2009, roč. 56, č. 1, s. 174-181. ISSN 00283908. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.013>. [cit. 2024-02-21].
- [36] FELGENTREFF, F.; BECKER, A.; MEIER, B. a BRATTSTRÖM, A. Valerian extract characterized by high valerianic acid and low acetoxy valerianic acid contents demonstrates anxiolytic activity. Online. *Phytomedicine*. 2012, roč. 19, č. 13, s. 1216-1222. ISSN 09447113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.08.003>. [cit. 2024-02-20].
- [37] KHOM, S.; BABURIN, I.; TIMIN, E.; HOHAUS, A.; TRAUNER, G. et al. Valerianic acid potentiates and inhibits GABAA receptors: Molecular mechanism and subunit specificity. Online. *Neuropharmacology*. 2007, roč. 53, č. 1, s. 178-187. ISSN 00283908. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.04.018>. [cit. 2024-02-25].
- [38] *Kozlík lékařský*. Online. Bylinky Revue. 2022. Dostupné z: <https://www.mojebylinky.cz/bylinky-lexikon/kozlik-lekarsky/>. [cit. 2024-03-07].
- [39] ŠARÍKOVÁ, Monika. *Kozlík lékařský pro klidné nervy, hluboký spánek i zdravé trávení*. Online. Blendea. 2021. Dostupné z: <https://www.blendea.cz/kozlik-lekarsky/>. [cit. 2024-03-07].
- [40] *Kozlík lékařský - účinky a použití*. Online. Herbalus. 2022. Dostupné z: <https://www.herbalus.cz/blog/7424763-kozlik-lekarsky-spanek-ucinky-a-pouziti>. [cit. 2024-03-07].
- [41] VAŠUTOVÁ, Kateřina. *Spánek a vybrané poruchy spánku a bdění*. Online. Praktické lékárenství. 2009. Dostupné z: <https://farmaciepropraxi.cz/pdfs/lek/2009/01/04.pdf>. [cit. 2024-03-07].

- [42] Státní zdravotní ústav. *Spánek a zdraví*. Online. Národní zdravotnický informační portál. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/216-spanek-a-zdravi>. [cit. 2024-03-09].
- [43] MCNAMARA, Patrick; JOHNSON, Patricia; MCLAREN, Deirdre; HARRIS, Erica; BEAUHARNAIS, Catherine et al. Rem And Nrem Sleep Mentation. Online. In: . International Review of Neurobiology. Elsevier, 2010, s. 69-86. ISBN 9780123813220. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(10\)92004-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(10)92004-7). [cit. 2024-03-04].
- [44] Pradeep C Bollu. *Normal Sleep, Sleep Physiology, and Sleep Deprivation*. Online. Medscape. 2019. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1188226-overview?form=fpf>. [cit. 2024-03-09].
- [45] FARMAKOTERAPEUTICKÉ INFORMACE MĚSÍČNÍK PRO LÉKAŘE A FARMACEUTY. *Poruchy spánku*. Online. Státní ústav pro kontrolu léčiv. 2009. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/sukl/kveten-2009>. [cit. 2024-03-09].
- [46] ARNAUD, Christian; GAUTHIER, Pierre a GOTTESMANN, Claude. Study of a GABA c receptor antagonist on sleep-waking behavior in rats. Online. *Psychopharmacology*. 2001, roč. 154, č. 4, s. 415-419. ISSN 0033-3158. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s002130000653>. [cit. 2024-02-27].
- [47] BARANWAL, Navya; YU, Phoebe K. a SIEGEL, Noah S. Sleep physiology, pathophysiology, and sleep hygiene. Online. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2023, roč. 77, s. 59-69. ISSN 00330620. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2023.02.005>. [cit. 2024-02-27].
- [48] *Nespavost - spánková hygiena*. Online. Institut klinické a experimentální medicíny. Dostupné z: <https://www.ikem.cz/cs/nespavost-spankova-hygiena/a-1997/>. [cit. 2024-02-27].
- [49] ROTH, Thomas. Insomnia: Definition, Prevalence, Etiology, and Consequences. Online. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. 2007, roč. 3, č. 5 suppl. ISSN 1550-9389. Dostupné z: <https://doi.org/10.5664/jcsm.26929>. [cit. 2024-02-29].
- [50] Insomnia overview: epidemiology, pathophysiology, diagnosis and monitoring, and nonpharmacologic therapy. Online. *The American Journal of Managed Care*. 2020, roč. 26, č. Suppl 4, s. S76-S84. ISSN 1936-2692. Dostupné z: <https://doi.org/10.37765/ajmc.2020.42769>. [cit. 2024-03-02].
- [51] BENT, Stephen; PADULA, Amy; MOORE, Dan; PATTERSON, Michael a MEHLING, Wolf. Valerian for Sleep: A Systematic Review and Meta-Analysis. Online. *The American Journal of Medicine*. 2006, roč. 119, č. 12, s. 1005-1012. ISSN 00029343. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.02.026>. [cit. 2024-03-02].

- [52] PATEL, Dhaval; STEINBERG, Joel a PATEL, Pragnesh. Insomnia in the Elderly: A Review. Online. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. 2018, roč. 14, č. 06, s. 1017-1024. ISSN 1550-9389. Dostupné z: <https://doi.org/10.5664/jcsm.7172>. [cit. 2024-03-05].
- [53] PŘÍHODOVÁ, Iva. *Farmakoterapie poruch spánku*. Online. Remedia. 2017. Dostupné z: <https://www.remédia.cz/rubriky/prehledy-nazory-diskuse/farmakoterapie-poruch-spanku-8774/>. [cit. 2024-03-06].
- [54] BRUNI, Oliviero; FERINI-STRAMBI, Luigi; GIACOMONI, Elena a PELLEGRINO, Paolo. Herbal Remedies and Their Possible Effect on the GABAergic System and Sleep. Online. *Nutrients*. 2021, roč. 13, č. 2. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu13020530>. [cit. 2024-03-06].
- [55] MATYSOVÁ, Ludmila. *Principy separačních metod*. Online. KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové UK. Dostupné z: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/?path=farmacie%5canalytick%c3%a1+chemie+a+instrument%c3%a1ln%c3%ad+metody%5ckomentovan%c3%a9+prezentace%5cim%5cp%c5%99edn%c3%a1%c5%a1ky>. [cit. 2024-03-06].
- [56] *Kapalinová chromatografie s různými typy detekce pro analýzu biologicky významných látek*. Online. Mendelova univerzita v Brně. Dostupné z: https://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/nanobiometalnet/ucebni-pumucky/UP_6_Kapalinova%20chromatografie%20s%20ruznymi%20typy%20detekce%20pro%20analyzu%20biologicky%20vyznamnych%20latek.pdf. [cit. 2024-03-27].
- [57] *High performance liquid chromatography - HPLC*. Online. Microbiologynote. Dostupné z: https://microbiologynote.com/cs/high-performance-liquid-chromatography-hplc/#Advantages_of_High-Performance_Liquid_Chromatography_HPLC. [cit. 2024-03-28].
- [58] COUFAL, Pavel. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*. Online. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>. [cit. 2024-03-28].
- [59] *Separační metody v analytické chemii II*. Online. KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové UK. Dostupné z: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/?path=farmacie%5canalytick%c3%a1+chemie+a+instrument%c3%a1ln%c3%ad+metody%5ckomentovan%c3%a9+prezentace%5cim%5cp%c5%99edn%c3%a1%c5%a1ky>. [cit. 2024-03-06].
- [60] SKLENÁŘOVÁ, Hana. *SEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY - VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE*. Online. Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické

- fakultě Univerzity Karlovy. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/242277/mod_resource/content/3/HPLC.pdf. [cit. 2024-03-28].
- [61] SKLENÁŘOVÁ, Hana. *SEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY - ÚVOD, PRINCIP, ROZDĚLENÍ*. Online. Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/223859/mod_resource/content/3/Separacni_analyticke_metody_uvod.pdf. [cit. 2024-03-28].
- [62] KOVAŘÍKOVÁ, Petra a STARIAT, Ján. *HPLC – HISTORIE A ZÁKLADNÍ PRINCIPY*. Online. Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215462/mod_resource/content/7/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%201_HPLC%20-%20Historie%20a%20zakladni%20principy.pdf. [cit. 2024-03-28].
- [63] KOVAŘÍKOVÁ, Petra a STARIAT, Ján. *HPLC - POPIS ZÁKLADNÍHO HARDWARU*. Online. Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/215460/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%202_HPLC%20instrumentace.pdf. [cit. 2024-03-28].
- [64] KOVAŘÍKOVÁ, Petra a STARIAT, Ján. *HPLC-DETEKTORY*. Online. Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/219169/mod_resource/content/4/HPLC_kurz/Lekce_PDF/Lekce%203_Detektory.pdf. [cit. 2024-03-28].
- [65] KOVAŘÍKOVÁ, Petra a STARIAT, Ján. *HPLC – STACIONÁRNÍ FÁZE A SEPARAČNÍ MÓDY*. Online. Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/399298/mod_resource/content/1/Lekce%204_Stac%20faze%20a%20separacni%20mody.pdf. [cit. 2024-03-28].
- [66] GROZIC, Kristina. *Components and Steps of High-performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis*. Online. BioRender. Dostupné z: <https://www.biorender.com/template/components-and-steps-of-high-performance-liquid-chromatography-hplc-analysis>. [cit. 2024-03-28].
- [67] KOVAŘÍKOVÁ, Petra a STARIAT, Ján. *RYCHLÁ CHROMATOGRFIE, ULTRA-VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE*. Online. Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/466603/mod_resource/content/1/Lekce%205_UHPLC_uprava2017.pdf. [cit. 2024-03-29].

- [68] *UHPLC – the technology and packing*. Online. Manufacturing Chemist. 2014. Dostupné z: <https://manufacturingchemist.com/uhplc-the-technology-and-packing--97250>. [cit. 2024-03-29].
- [69] KOVAŘÍKOVÁ, Petra a STARIAT, Ján. *SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE*. Online. Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy. Dostupné z: https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/241562/mod_resource/content/6/Lekce%206_M_S.pdf. [cit. 2024-03-29].
- [70] GAO, X.Q. a BJÖRK, L. Valerenic acid derivatives and valepotriates among individuals, varieties and species of Valeriana. Online. *Fitoterapia*. 2000, roč. 71, č. 1, s. 19-24. ISSN 0367326X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(99\)00094-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(99)00094-5). [cit. 2024-03-29].
- [71] GHAFARI, Saeedeh; ESMAEILI, Somayeh; AREF, Hamedeh; NAGHIBI, Farzaneh a MOSADDEGH, Mahmoud. Qualitative and Quantitative Analysis of Some Brands of Valerian Pharmaceutical Products. Online. *Studies on Ethno-Medicine*. 2017, roč. 3, č. 1, s. 61-64. ISSN 0973-5070. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/09735070.2009.11886339>. [cit. 2024-03-05].
- [72] NAVARRETE, Andres; AVULA, Bharathi; CHOI, Young-Whan a KHAN, Ikhlas A. Chemical Fingerprinting of Valeriana Species: Simultaneous Determination of Valerenic Acids, Flavonoids, and Phenylpropanoids Using Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. Online. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2006, roč. 89, č. 1, s. 8-15. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.1.8>. [cit. 2024-03-05].
- [73] KULIKOV, Artem U. Micellar LC Separation of Sesquiterpenic Acids and Their Determination in Valeriana officinalis L. Root and Extracts. Online. *Chromatography Research International*. 2012, roč. 2012, s. 1-8. ISSN 2090-3502. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2012/564243>. [cit. 2024-03-05].
- [74] SCHIEFFER, Gary W. Use of Solid-Phase Extraction for Improving HPLC Assays of Triterpene Glycosides in Gotu Kola (*Centella asiatica*), Parthenolide in Feverfew (*Tanacetum parthenium*), and Valerenic Acids in Valerian (*Valeriana officinalis*). Online. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2017, roč. 28, č. 4, s. 581-592. ISSN 1082-6076. Dostupné z: <https://doi.org/10.1081/JLC-200047215>. [cit. 2024-03-29].
- [75] ALKHARFY, K. M. a FRYE, R. F. Effect of valerian, valerian/hops extracts, and valerenic acid on glucuronidation in vitro. Online. *Xenobiotica*. 2008, roč. 37, č. 2, s. 113-123. ISSN 0049-8254. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00498250601050420>. [cit. 2024-03-29].

- [76] CATANI, Maria Valeria; RINALDI, Federica; TULLIO, Valentina; GASPERI, Valeria a SAVINI, Isabella. Comparative Analysis of Phenolic Composition of Six Commercially Available Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Extracts: Potential Biological Implications. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 19. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms221910601>. [cit. 2024-03-29].
- [77] CHEN, Zaixing; YING, Xixiang; MENG, Shu; ZHU, Xu; JIANG, Hong et al. LC determination of luteolin-7- O - β - D -glucoside and apigenin-7- O - β - D -glucoside in rat plasma after administration of *Humulus scandens* extract and its application to pharmacokinetic studies. Online. *Natural Product Research*. 2012, roč. 26, č. 6, s. 530-539. ISSN 1478-6419. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.532127>. [cit. 2024-03-29].
- [78] *Advance Calmin dobrý spánek 60 kapslí*. Online. Pilulka. Dostupné z: <https://www.pilulka.cz/calmin-60-cps-dobry-spanek>. [cit. 2024-03-02].
- [79] *Allnature Kozlík bylinný extrakt 60 kapslí*. Online. Heureka. Dostupné z: <https://doplňky-stravy.heureka.cz/allnature-kozlik-bylinny-extrakt-60-kapsli/#prehled/>. [cit. 2024-03-02].
- [80] *Epiderma Spi v klidu*. Online. Zboží.cz. Dostupné z: <https://www.zbozi.cz/vyrobek/epiderma-spi-v-klidu/>. [cit. 2024-03-02].
- [81] *Naturvita Antistres 60 kapslí*. Online. Dr.Max. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/antistres-naturvita-60-kapsli>. [cit. 2024-03-02].
- [82] *HypnoX[®] forte 20 tablet*. Online. Barny's. Dostupné z: <https://www.barnys.cz/cs/spanek-nervozita-a-stres/19-hypnox-forte.html>. [cit. 2024-03-02].
- [83] *Dr.Max Happy Sleep 30 kapslí*. Online. Heureka. Dostupné z: <https://doplňky-stravy.heureka.cz/dr-max-happy-sleep-30-kapsli/#prehled/>. [cit. 2024-03-02].
- [84] *Neospan Forte 15 Tobolek*. Online. Chytrá lékárna. Dostupné z: <https://www.chytralekarna.cz/doplňky-stravy-a-vyziva/spanek-nervy-stres/neospan-forte-tob-15-8594059735959>. [cit. 2024-03-02].
- [85] *Terezia Spánek & Relax 60 kapslí*. Online. Dr.Max. Dostupné z: <https://www.drmax.cz/terezia-spanek-relax-cps-60>. [cit. 2024-03-02].
- [86] *SLEEPNOX FORTE*. Online. Naturevia. Dostupné z: <https://www.naturevia.cz/e-shop/nervova-soustava/sleepnox-forte-5/>. [cit. 2024-03-02].

- [87] *Kneipp kozlík plus proti nespavosti a neklidu, 40 ks.* Online. Dm. Dostupné z: <https://www.dm.cz/kneipp-kozlik-plus-proti-nespavosti-a-neklidu-p4008233111131.html>. [cit. 2024-03-02].
- [88] *GS Anxiolan, 30 tablet, 1+1 ZDARMA.* Online. GSKlub.cz. Dostupné z: <https://www.gsklub.cz/produkt/gs-anxiolan-30-tablet-11-zdarma/>. [cit. 2024-03-02].
- [89] *Dr. Popov Kozlík lékařský.* Online. Zboží.cz. Dostupné z: <https://www.zbozi.cz/vyrobek/dr-popov-kozlik-lekarsky/>. [cit. 2024-03-01].
- [90] *BALDRIÁNSKÉ KAPKY - KOZLÍK LÉKAŘSKÝ 50 ML Při nervozitě a nespavosti.* Online. Green Idea - TOPVET. Dostupné z: <https://www.greenidea.cz/doplňky-stravy/bylinne-extrakt-y-lihove-tinkury/822-kozlik-lekarsky-baldrianske-kapky>. [cit. 2024-03-01].
- [91] *Valerianae tinctura 40g (pipeta).* Online. E-laboratoř. Dostupné z: <https://www.e-laborator.cz/zbozi/valerianae-tinctura-40g-pipeta>. [cit. 2024-03-01].
- [92] BOS, Rein; WOERDENBAG, Herman J a PRAS, Niesko. Determination of valepotriates. Online. *Journal of Chromatography A*. 2002, roč. 967, č. 1, s. 131-146. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00036-5). [cit. 2024-03-05].
- [93] BICCHI, Carlo; BINELLO, Arianna; RUBIOLO, Patrizia. Packed column SFC/UV versus HPLC/UV analysis of valerenic acids and valepotriates in extracts of *Valeriana officinalis* L. Online. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 2000, 11.3: 179-183. Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(200005/06\)11:3<179::AID-PCA515>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<179::AID-PCA515>3.0.CO;2-5). [cit. 2024-03-05].

9 Seznam obrázků a tabulek

9.1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Ilustrovaný obrázek kozlíku lékařského [13].	13
Obrázek 2: Strukturní vzorec kyseliny valerénové [17].	14
Obrázek 3: Strukturní vzorec kyseliny acetoxyvalerénové [18].	15
Obrázek 4: Strukturní vzorec kyseliny hydroxyvalerénové [19].	15
Obrázek 5: Strukturní vzorec valepotriátu [21].	16
Obrázek 6: Strukturní vzorec acevaltrátu [22].	16
Obrázek 7: GABA _A -receptor (obrázek převzat a upraven ze zdroje [32]).	19
Obrázek 8: Schéma a popis HPLC systému (převzato a upraveno ze zdroje [66]).	27
Obrázek 9: Van Deemterova křivka [68].	28
Obrázek 10: Testované potravní doplňky [78–88].	35
Obrázek 11: Testované kapky [89–91].	36
Obrázek 12: Absorpční spektrum kyseliny valerénové.	44
Obrázek 13: Absorpční spektrum kyseliny acetoxyvalerénové.	44
Obrázek 14: Absorpční spektrum kyseliny hydroxyvalerénové.	45
Obrázek 15: Absorpční spektrum acevaltrátu.	45
Obrázek 16: Absorpční spektrum valepotriátu.	45
Obrázek 17: Absorpční spektrum apigenin-7-glukosidu.	45
Obrázek 18: Absorpční spektrum luteolinu.	46
Obrázek 19: Chromatogram znázorňující vývoj analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm s velikostí částic 3 μm při teplotě 30 °C a gradientové eluci se složením mobilní fáze A: acetonitril, B: 0,1% kyselina mravenčí.	47
Obrázek 20: Chromatogram znázorňující vývoj analytické metody. Separace probíhala na koloně YMC-Triart C18 ExRS 150 x 4,6 mm s velikostí částic 3 μm při teplotě 30 °C a gradientové eluci se složením mobilní fáze A: acetonitril, B: 0,1% kyselina fosforečná.	48
Obrázek 21: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 3 mm, 2 μm s gradientem 1A.	54
Obrázek 22: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 3 mm, 2 μm s gradientem 2A.	54

Obrázek 23: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 3 mm, 2 µm s gradientem 3A.	55
Obrázek 24: Chromatogram průběhu separace na koloně Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 x 3 mm, 2 µm s gradientem 5A.	55
Obrázek 25: Chromatogram průběhu separace na koloně CHROMSHELL® C18 Polar 150 x 4,6 mm, 2,6 µm s gradientem 1.	56
Obrázek 26: Chromatogram průběhu separace na koloně CHROMSHELL® C18 Polar 150 x 4,6 mm, 2,6 µm s gradientem 2.	56
Obrázek 27: Chromatogram průběhu separace na koloně CHROMSHELL® C18 Polar 150 x 4,6 mm, 2,6 µm s gradientem 3.	57
Obrázek 28: Chromatogram průběhu separace na koloně CHROMSHELL® C18 Polar 150 x 4,6 mm, 2,6 µm s gradientem 5.	57
Obrázek 29: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna® Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 1,6 µm s gradientem 1B.	58
Obrázek 30: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna® Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 1,6 µm s gradientem 2B.	58
Obrázek 31: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna® Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 1,6 µm s gradientem 3B.	59
Obrázek 32: Chromatogram průběhu separace na koloně Luna® Omega PS C18 100 Å 150 x 2,1 mm, 1,6 µm s gradientem 5B.	59
Obrázek 33: Chromatogram testu způsobilosti chromatografického systému naměřený při vlnové délce 255 nm.	61
Obrázek 34: Chromatogramy zobrazující test způsobilosti chromatografického systému naměřené při vlnových délkách 218, 231, 255 a 340 nm.	62
Obrázek 35: Kalibrační závislost apigenin-7-glukosidu.	67
Obrázek 36: Kalibrační závislost luteolinu.	68
Obrázek 37: Kalibrační závislost kyseliny acetoxyvalerenové.	69
Obrázek 38: Kalibrační závislost kyseliny hydroxyvalerenové.	70
Obrázek 39: Kalibrační závislost kyseliny valerenové.	71
Obrázek 40: Kalibrační závislost acevaltrátu.	72
Obrázek 41: Kalibrační závislost valepotriátu.	73
Obrázek 42: Chromatogram doplňku stravy Kneipp.	75

Obrázek 43: Chromatogram doplňku stravy Neospan forte.	76
Obrázek 44: Chromatogram doplňku stravy Epiderma.	76
Obrázek 45: Chromatogram registrovaného léčivého přípravku Persen forte.....	76
Obrázek 46: Chromatogram registrovaného léčivého přípravku Kneipp.	77
Obrázek 47: Chromatogram potravního doplňku Tinctura valerianae.....	80
Obrázek 48: Chromatogram potravního doplňku ve formě kapek – Dr. Popov.....	80

9.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled možností stanovení apigenin-7-glukosidu, luteolinu, kyseliny acetoxyvalerenové, kyseliny hydroxyvalerenové, kyseliny valerenové, acevaltrátu a valepotriátu.	31
Tabulka 2: Příprava zásobních roztoků standardů pro optimalizaci metody.	37
Tabulka 3: Příprava roztoků standardů pro validaci metody.	39
Tabulka 4: Ředění roztoků standardů pro kalibrační řadu.	40
Tabulka 5: Finální gradient pro validaci metody.	43
Tabulka 6: Shrnutí jednotlivých vlnových délek pro detekci stanovovaných látek.	46
Tabulka 7: Průběh gradientu č. 1.	48
Tabulka 8: Průběh gradientu č. 2.	49
Tabulka 9: Průběh gradientu č. 3.	49
Tabulka 10: Průběh gradientu č. 4.	49
Tabulka 11: Průběh gradientu č. 5.	50
Tabulka 12: Průběh gradientu č. 1A.	50
Tabulka 13: Průběh gradientu č. 2A.	50
Tabulka 14: Průběh gradientu č. 3A.	51
Tabulka 15: Průběh gradientu č. 5A.	51
Tabulka 16: Průběh gradientu č. 1B.	51
Tabulka 17: Průběh gradientu č. 2B.	52
Tabulka 18: Průběh gradientu č. 3B.	52
Tabulka 19: Průběh gradientu č. 5B.	52
Tabulka 20: Přehled testovaných kolon v rámci optimalizace metody.	53
Tabulka 21: Vyhodnocení parametrů testu způsobilosti chromatografického systému.	60
Tabulka 22: Opakovatelnost ploch píků analyzovaných látek měřená pro koncentraci 100 mg/l.	63
Tabulka 23: Opakovatelnost ploch píků analyzovaných látek měřená pro koncentraci 50 mg/l.	64
Tabulka 24: Opakovatelnost ploch píků analyzovaných látek měřená pro koncentraci 10 mg/l.	65
Tabulka 25: Test linearity pro apigenin-7-glukosid.	67

Tabulka 26: Parametry lineární regrese pro apigenin-7-glukosid.....	67
Tabulka 27: Test linearity pro luteolin.	68
Tabulka 28: Parametry lineární regrese pro luteolin.	68
Tabulka 29: Test linearity pro kyselinu acetoxyvalerenovou.	69
Tabulka 30: Parametry lineární regrese pro kyselinu acetoxyvalerenovou.....	69
Tabulka 31: Test linearity pro kyselinu hydroxyvalerenovou.....	70
Tabulka 32: Parametry lineární regrese pro kyselinu hydroxyvalerenovou.	70
Tabulka 33: Test linearity pro kyselinu valerenovou.	71
Tabulka 34: Parametry lineární regrese pro kyselinu valerenovou.	71
Tabulka 35: Test linearity pro acevaltrát.....	72
Tabulka 36: Parametry lineární regrese pro acevaltrát.	72
Tabulka 37: Test linearity pro valepotriát.	73
Tabulka 38: Parametry lineární regrese pro valepotriát.....	73
Tabulka 39: Parametr správnosti a přesnosti vyvinuté metody pro tobolky.	74
Tabulka 40: Parametr správnosti a přesnosti vyvinuté metody pro kapky.....	75
Tabulka 41: Obsah látek v doplňcích stravy deklarovaný výrobcem pro tablety, tobolky a dražé.	77
Tabulka 42: Obsah látek v registrovaných léčivých přípravcích deklarovaný výrobcem pro tablety a tobolky.....	78
Tabulka 43: Stanovení analyzovaných látek v doplňcích stravy ve formě tablet, tobolek a dražé.	79
Tabulka 44: Stanovení analyzovaných látek v léčivých přípravcích ve formě tablet a tobolek.	80
Tabulka 45: Obsah látek v doplňcích stravy deklarovaný výrobcem pro kapky.....	81
Tabulka 46: Stanovení analyzovaných látek v doplňcích stravy – kapky.....	81