

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VÝVOJ HPLC METODY PRO STANOVENÍ  
AMYGDALINU A SEROTONINU V DOPLŇKU  
STRAVY**

**Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Lucie Havlíková, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ 2015**

**Martina Parmová**

**Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Lucii Havlíkové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při sestavování této práce. Dále mé poděkování patří rodině, která mě podporovala, při celé délce mého studia. Speciálně mému tátovi, za trpělivost, kterou se mnou měl. A v neposlední řadě, bych také chtěla poděkovat všem svým blízkým, kteří mě dokázali podržet a rozesmát a nastavili rameno, pokud bylo třeba.

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

V Hradci Králové

dne:

## **ABSTRAKT**

Byla vyvinuta a validována metoda pro stanovení obsahu amygdalinu a serotoninu v doplňku stravy B17 APRICARC za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Pro získání analytů byla použita extrakce do 96% ethanolu. Jako vhodná chromatografická kolona byla zvolena kolona Ascentis® Express OH5 (3 x 100 mm, 2,7  $\mu$ m). Složení mobilní fáze pro analýzu bylo 10 mM acetátový pufr pH 3,8 s acetonitrilem v poměru 10:90 (v:v). Průtoková rychlost byla 0,8 ml/min, detekce amygdalinu byla prováděna pomocí UV detektoru (vlnová délka 215 nm) a pro detekci serotoninu byl využit fluorescenční detektor (Ex 280 nm, Em 340 nm).

Byl proveden test vhodnosti chromatografického systému, kde byly sledovány parametry: účinnost kolony, faktor symetrie píků, rozlišení a opakovatelnost analýzy. Při vlastní validaci byly sledovány parametry: přesnost, linearita, správnost, detekční a kvantitativní limit.

## **ABSTRACT**

The analytical method for the determination of amygdalin and serotonin supplement B17 APRICARC using high-performance liquid chromatography was developed and validated.

The 96 % ethanol was used for the extraction to obtain analytes. As a suitable chromatographic column was chosen the column Ascentis Express® OH5 (3 x 100 mm, 2,7 µm). The composition of the mobile phase for the analysis was 10 mM acetate buffer pH 3.8 : acetonitrile 10:90 (v:v). The flow rate was set on 0.8 mL / min, for the detection of amygdalin was used an UV detector (wavelength 215 nm) and for the detection of serotonin was used the fluorescence detector (Ex 280 nm , Em 340 nm ).

A suitability test of chromatographic system was performed and these parameters were pursued: column efficiency, resolution peak symmetry factor and repeatability of analysis. Within the actual validation these parameters were pursued: accuracy, linearity, precision, and limit of detection and quantification.

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
1.1	Cíl a popis zadání práce.....	8
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
2.1	Úvod pro HPLC.....	9
2.2	Problémy RPLC.....	9
2.3	HILIC .....	12
2.3.1	Separace.....	12
2.3.2	Stacionární fáze pro HILIC .....	12
2.3.3	Chování HILIC.....	14
2.3.4	Hlavní přednosti HILIC a jejich nevýhody .....	15
2.4	Validace .....	17
2.4.1	Test vhodnosti chromatografického systému .....	17
2.4.2	Validace analytické metody.....	19
2.5	Amygdalin.....	21
2.5.1	Popis, chemická struktura a vlastnosti .....	21
2.5.2	Farmakologické vlastnosti .....	22
2.5.3	Toxicita amygdalinu.....	23
2.6	Serotonin .....	24
2.6.1	Popis, chemická struktura a vlastnosti .....	24
2.6.2	Výskyt v přírodě.....	25
2.7	B17 APRICARC s meruňkovým olejem .....	25
2.7.1	Popis produktu .....	25
2.8	Rešerše .....	26
2.8.1	HPLC metody pro stanovení amygdalinu .....	26
2.8.2	extrakční techniky pro získání amygdalinu.....	27
2.8.3	HPLC metody pro stanovení serotoninu .....	28
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>30</b>
3.1	Úvod k experimentální části.....	30
3.1.1	Přístrojové vybavení.....	30
3.1.2	Kolony.....	30
3.1.3	Použité standardy vzorky a chemikálie .....	31
3.1.4	Konečné podmínky analýzy, příprava vzorku a standardu.....	32

<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Zjištění výchozích parametrů</b>	<b>34</b>
4.1.1	Výběr vhodné vlnové délky pro detekci	34
4.1.2	Výběr vhodné kolony	35
4.1.3	Rychlost průtoku	36
4.1.4	Vliv rozpouštědla na signál detektoru	36
<b>4.2</b>	<b>Závislost chování analytů na podmínkách prostředí za pomoci standardních roztoků</b>	<b>37</b>
4.2.1	Výsledky a jejich interpretace	38
<b>4.3</b>	<b>Extrakce a následná analýza amygdalinu v doplňku stravy</b>	<b>42</b>
4.3.1	Stanovení průměrné hmotnosti jedné tobolky	42
4.3.2	Hledání vhodné extrakční techniky	42
4.3.3	Vliv doby extrakce a množství extrakčního činidla	45
<b>4.4</b>	<b>Validace metody pro stanovení amygdalinu</b>	<b>46</b>
4.4.1	Test vhodnosti chromatografického systému	46
4.4.2	Validace analytické metody	49
<b>4.5</b>	<b>Extrakce a následná analýza serotoninu v doplňku stravy</b>	<b>54</b>
<b>4.6</b>	<b>Validace metody pro stanovení serotoninu</b>	<b>54</b>
4.6.1	Test vhodnosti chromatografického systému	54
4.6.2	Validace analytické metody	57
<b>4.7</b>	<b>Stanovení obsahu amygdalinu a serotoninu v kapslích</b>	<b>60</b>
4.7.1	Obsah amygdalinu	60
4.7.2	Obsah serotoninu	60
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK</b>	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b>	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY</b>	<b>69</b>

# 1 ÚVOD

Kvantitativní analýza je velmi důležitou součástí farmaceutického odvětví. V dnešní době je kladen velký důraz na bezpečnost a kvalitu přípravků a je tedy důležité, aby bylo možno stanovit obsah vybraných látek. Pro tento účel bývá stále často využívána kapalinová chromatografie.

## 1.1 Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce je vyvinout a validovat analytickou metodu vhodnou pro stanovení amygdalinu a serotoninu v přípravku B17 APRICARC s meruňkovým olejem za pomoci techniky HPLC s vhodnou detekcí. Pro amygdalin bude použita UV/VIS detekce a pro serotonin, vzhledem k očekávanému nízkému obsahu, bude využito fluorescenčního detektoru.

Protože je kapalinová chromatografie široce využívána, je také neustále zdokonalována a inovována. Jsou vyvíjeny nové způsoby detekce a citlivější detektory. Avšak největší inovace probíhá v oblasti vývoje nových analytických kolon.

Jedním z nových typů kolon jsou i kolony „HILIC“, které umožňují separaci zejména polárních a hydrofilních látek.

A právě na práci s těmito kolonami je zaměřená tato diplomová práce, jejímž cílem je také zaznamenat chování vybraných látek při měnících se analytických podmínkách a během optimalizace separačních podmínek.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Úvod pro HPLC

Kapalinová chromatografie je velmi často využívanou technikou v moderní analytické chemii. Jako první rozdělovací chromatografie byla využívána takzvaná chromatografie na normálních fázích (NPLC - normal phase liquid chromatography). Při chromatografii na normálních fázích je stacionární fáze polární (například silikagel) a mobilní fáze je nepolární (například hexan). Protože tento systém fází měl spoustu nevýhod, jako například použití velkého množství toxických rozpouštědel, nebo nízkou rozpustnost analytů v mobilní fázi, byla chromatografie na normálních fázích postupem času nahrazena systémem na obrácených fázích (RPLC - reverse phase liquid chromatography). V tomto případě je stacionární fází nepolární fáze, často bývá použit modifikovaný silikagel a mobilní fáze je polární, příkladem rozpouštědel může být například acetonitril nebo methanol [1].

A právě chromatografie na reverzních fázích, kde stacionární fází je modifikovaný silikagel, je stále nejrozšířenější technikou. Často bývá používána modifikace C18, kde na silikagelu jsou navázány oktadecylové řetězce.

### 2.2 Problémy RPLC

I v případě použití systému obrácených fází se objevují překážky, které omezují jeho využití v analýze. V této kapitole budou zmíněny hlavní problémy při použití chromatografie na systému reverzních fází, jejich důsledky a možné cesty řešení těchto problémů.

Při průchodu mobilní fáze kolonou dochází ke vzniku tlaku, ten je přímo úměrný průtokové rychlosti ( $F$ ), viskozitě mobilní fáze ( $\eta$ ) a délce kolony ( $L$ ) a nepřímo úměrný průřezu kolony ( $A$ ) a velikosti částic.

Tyto vztahy lze popsat následujícím vztahem (1):

$$\Delta P \sim \frac{F \cdot \eta \cdot L}{A \cdot d_p^2} \quad (1)$$

Kde  $\Delta P$  je tlaková ztráta na koloně a  $d_p$  je průměr částic náplně [2].

Pokud se tedy sníží velikost částic, je třeba vyššího tlaku pro dosažení požadovaného průtoku. S nárůstem pracovního tlaku v systému rostou nároky na kvalitu pumpy a technické provedení celé sestavy, což vede k vyšší ceně chromatografu.

Náplně analytických kolon bývají zpravidla porézní z důvodu zvětšení povrchu umožňujícího interakce. Při průchodu dělené směsi kolonou dochází k pronikání složek i do pórů, kde také interagují s funkčními skupinami. Vazby, které vznikají, mají krátké trvání, dochází ke zpomalení analytů a tím k separaci dle daných vlastností. Přejít částic do pórů a zpět je umožněn rozdílnými koncentracemi analytu uvnitř a vně částice. Doba potřebná k přechodu analytů není v celém průřezu kolony stejná, rozdílnost je dána difuzí analytů. Difuze řídí rychlost přechodu složek směsi a je závislá, mimo jiné, i na jejich velikosti. Čím je větší složka, tím pomaleji difunduje a tím dochází k rozšiřování chromatografických píků.

Jednou z možností jak odstranit tento nežádoucí jev je použití neporézních částic, tím ale dojde k velkému poklesu povrchu, který umožňuje interakce mezi analytem a stacionární fází. Díky tomu může s povrchem současně interagovat menší počet molekul a tím méně směsi je možné rozdělit. Ani použití většího množství menších částic nedokáže vyrovnat povrch klasických porézních částic. Proto kolony, kde jsou obsaženy malé neporézní částice, umožňují rozdělení pouze malého množství směsi a v tom případě je třeba citlivějších způsobů detekce [2].

### **„Fused-core“ částice (částice s pevným jádrem)**

Tento typ kolon vyvinul J. Kirkland. Jedná se o porézní částice s neporézním jádrem. Jádro je tvořené neporézním silikagelem a ten je obalen slinutými silikonovými nanočásticemi. Při analýze na kolonách, kde je použita tato technologie, vzniká menší zpětný tlak. Tento tlak je přibližně poloviční oproti tlaku na kolonách s porézními „sub 2  $\mu\text{m}$ “ (menší než 2  $\mu\text{m}$ ) částicemi o stejné délce. Díky tomu je k dosažení požadované rychlosti třeba nižšího tlaku. Nižší zpětný tlak proto umožňuje použití vyšších průtokových rychlostí a díky tomu je průběh analýzy urychlen.

Nižší zpětný tlak také umožňuje použití větších délek kolon a tím získání větší účinnosti kolony. Vysoký zpětný tlak generovaný u kolon s porézními „sub-2  $\mu\text{m}$ “ částicemi neumožňuje použití delších kolon, při zachování stejných podmínek ani při zapojení do systému UHPLC (ultra high performance liquid chromatography).

V porovnání s porézními částicemi je u částic s pevným jádrem menší difuze, díky tomu je snižena axiální disperze látek a tím je minimalizováno rozmývání píků. Při použití technologie částic s pevným jádrem nedochází k tak velkému poklesu povrchu jako při použití neporézních částic. Chybí zde pouze póry s velmi dlouhou difuzí. Povrch odpovídá přibližně 75% povrchu porézních částic při stejném průměru kolony. Díky většímu povrchu, než mají neporézní částice, je možné analyzovat větší objemy vzorků a tím klesá potřeba citlivějších způsobů detekce [2] [3].

Další velkou nevýhodou stacionárních fází používaných při RPLC je velmi omezená odolnost v bazickém a silně kyselém prostředí, což je problém například při analýze bazických látek, kde je potřebná úprava hodnoty pH prostředí. Silně kyselé prostředí potlačuje disociaci silanolových skupin a tím zabraňuje vzniku nežádoucích iontových interakcí mezi iontem báze a disociovanými silanoly. Naopak vysoké pH prostředí zabraňuje disociaci bází, čímž následně zvyšuje retenci na stacionární fázi a zlepšuje separaci a rozlišení. U fáze C18 je uváděno rozmezí přijatelných hodnot pH 3-9 případně 3-7 pokud se jedná o dlouhodobou stabilitu. Z toho je zřejmé, že možnost optimalizace mobilní fáze je omezená [4].

Problematická je také analýza polárních látek, kde na RPLC dochází ke špatné nebo žádné retenci a při NPLC bývá problémem rozpustnost v mobilní fázi. Právě pro analýzu polárních látek byla vyvinuta metoda kapalinové chromatografie zvaná HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography), která využívá hydrofilní interakce mezi stacionární fází a analyzovanými látkami. Termín HILIC poprvé použil A. Alpert v roce 1990, kdy byla tato metoda poprvé prezentována v odborném tisku. HILIC lze označit jako metodou spojující NPLC a RPLC [5].

## **2.3 HILIC**

V případě HILIC je eluce prováděna pomocí binárních mobilních fází, složených z organické a vodné složky, kde podíl organického rozpouštědla je více jak 60%. Vodná složka slouží jako silné eluční činidlo. Mobilní fáze bývá také označována jako vodně-organická. Podmínkou pro HILIC je, že stacionární fáze musí být polárnější než mobilní fáze [5] [6].

### **2.3.1 Separace**

Mechanismus separace není doposud plně objasněn a je považován za komplexní. Důležitou roli v něm hrají vodíkové vazby, iontové a hydrofobní interakce. Mezi faktory, rozhodující o míře uplatnění interakcí, patří typ stacionární fáze, která byla použita, typ rozpouštědla a analytu, pH mobilní fáze a její polarita.

Jako takzvaná primární interakce je označována hydrofilní interakce mezi analytem a polární stacionární fází. Aby k této interakci mohlo dojít je nutný vznik hydratované vrstvy, někdy označované jako difuzní vrstvy. Tato vrstva vzniká díky naadsorbování vody na polární centra stacionární fáze. Ostatní interakce jsou označovány jako druhotné [5] [7] [8] [9].

### **2.3.2 Stacionární fáze pro HILIC**

Jako stacionární fáze pro HILIC je možné použít široké spektrum různých typů kolon. Tyto kolony mohou na svém povrchu obsahovat iontové i neiontové skupiny. Základním materiálem bývá často silikagel, ale může se jednat i o jiné organické polymerní matrice. Existuje již mnoho stacionárních fází pro HILIC separaci. Předpokladem pro HILIC separaci je fakt, že stacionární fáze je polární. Používané fáze lze rozdělit do tří skupin neutrální, nabitě a zwitteriontové [6] [7].

## **Neutrální**

Vyznačují se vysokou polaritou, která zajišťuje tvorbu vodíkových vazeb, ale neobsahují ionizovatelné skupiny, a proto se zde neuplatňují elektrostatické interakce. Příkladem mohou být diolové a nebo amidové fáze. Jsou často připravovány jednoduchou modifikací povrchu silikagelu. Amidové fáze jsou používány například pro separaci peptidů, oligosacharidů a glykoproteinů [7] [9].

### Ascentis® Express OH5

Jedná se o nový typ kolony, která má na silikagelovém nosiči navázány hydroxylové skupiny. Díky těmto hydroxylovým skupinám je zajištěná dostatečná hydrofilita povrchu a je zde možnost uplatnění hydrofilních vazeb. Iontové interakce jsou potlačeny. Kolona Ascentis® Express OH5 využívá technologii částic s pevným jádrem. Při použití této technologie dochází k omezení difuze analytů a také umožňuje použití vyšších průtokových rychlostí, díky polovičnímu tlaku, který při analýze na koloně vzniká. Tuto je možné použít kolonu i do systému UHPLC [3] [10].

Tato kolona nachází uplatnění při analýze kyselých, bazických nebo neutrálních polárních sloučenin [10].

## **Nabité**

Obsahují ionizovatelné skupiny a výrazně se zde uplatňují elektrostatické interakce. Do této skupiny lze zařadit například nemodifikovaný silikagel nebo aminopropylové modifikace silikagelu. Nemodifikovaný silikagel je upraven tak, aby na svém povrchu nesl snížený obsah silanolových skupin. Aminopropylové fáze mohou být použity pro analýzu kyselých látek. Tyto fáze se také ukázaly jako vhodné pro analýzu cukrů, protože zvyšují míru anomerní mutarotace, díky tomu nedochází k tvorbě dvojitých píků [5] [6] [7] [9].

### Zwitteriontové

Jedná se o novější stacionární fáze, u kterých se uplatňují slabé elektrostatické interakce. Zwitteriontové fáze obsahují jak negativní, tak i pozitivní náboj. Na povrchu fáze je navázána skupina sulfoalkylbetainu, kde pozitivní náboj nese kvarterní dusík a negativní sulfoskupina. Velmi dobře se osvědčily při současné analýze kationtů a aniontů.

Jako příklad lze uvést stacionární fázi známou pod obchodním názvem ZIC<sup>®</sup>-HILIC [5] [7] [9].

Nejčastěji používané jsou fáze na bázi silikagelu, jedná se buď o nemodifikovaný, nebo hybridní silikagel. Velmi často používanou modifikací je zavedení aminopropylvé skupiny

[5] [7] [9].

### **2.3.3 Chování HILIC**

I při HILIC separaci je možné ovlivňovat retenci analytů, podobně jako u NPLC se retence zvyšuje se zvyšující se polaritou analytu a se snížením polarity mobilní fáze. Snížení polarity lze dosáhnout snížením podílu vodné složky. Pro ovlivnění retence jsou používány přísady pufrů k mobilní fázi. Obvykle platí, že retence klesá se zvyšující se koncentrací solí, lze ale sledovat i opačný jev. Koncentrace solí obvykle bývá 5 až 50 mM.

Jak již bylo uvedeno výše, mobilní fáze obsahuje velké procento organické složky, často touto složkou bývá acetonitril, jeho obsah musí být vyšší než 50%. Pro zachování vhodných podmínek pro HILIC je nutné, aby vodná složka byla zastoupena alespoň z 2,5%. Čím polárnější organické rozpouštědlo je použito, tím vyšší je obvykle jeho eluční síla. Je zde také důležitá jeho schopnost podílet se na protondonorových a protonakceptorových interakcích. Čím je vyšší tato schopnost, tím je opět vyšší eluční síla. Acetonitril má v porovnání s ethanolem vyšší eluční sílu a ten má vyšší eluční sílu než methanol. Nejčastěji bývá při HILIC separaci používán acetonitril. Použití jiných rozpouštědel má obvykle za cíl změnit selektivitu systému. Pokud je malé procento (přibližně tak 5%) nahrazeno rozpouštědlem s vyšší eluční silou, je možné docílit zcela

jiné selektivity systému. Voda, jako nejsilnější eluent při použití HILIC separace, má výrazný vliv na retenci analytu. I malé zvýšení obsahu vody vede k velkému snížení retence analytu a u některých látek s nízkou retencí je potřeba snížit obsah vody až pod hodnotu 5%. Vodu lze v některých případech částečně nebo úplně nahradit jiným polárním rozpouštědlem, například methanolem nebo ethanolem. Pokud dojde ke kompletní náhradě vody, jedná se o takzvanou nevodnou HILIC chromatografii [7].

U některých typů kolon lze pozorovat změnu retence při použití nižších obsahů polární složky mobilní fáze. V těchto případech je chování analytů na HILIC koloně odpovídající chování při použití systémů s obrácenými fázemi (RPLC), kdy stoupá retenční čas se zvyšujícím se obsahem vody [6].

Na účinnost separace a částečně i na selektivitu má výrazný vliv rozpouštědlo, ve kterém je vzorek rozpuštěn. Je nutné, aby byl vzorek rozpuštěn v podobném nebo stejném rozpouštědle, jako je mobilní fáze, která byla použita pro separaci. Zpravidla bývá k rozpuštění vzorku použita přímo mobilní fáze. V případě, že analyzovaný roztok vzorku obsahuje vysoké procento vody, může docházet ke ztrátě účinnosti separace, snížení retence a také může docházet ke štěpení píku nebo ke změně jeho tvaru. Tyto změny bývají obvykle pozorovány u látek s nízkou retencí.

Pro HILIC separaci jsou typické malé objemy vzorku, které jsou vstříkovány do systému. Pokud jsou dávkované objemy vysoké, dochází k rozmývání píků analytů a tím dochází ke snížení separační účinnosti [7].

#### **2.3.4 Hlavní přednosti HILIC a jejich nevýhody**

HILIC je metoda vhodná pro analýzu polárních i bazických látek, pro které je analýza za pomoci klasické chromatografie na reverzních fázích problematická. Stala se důležitou metodou používanou například i ve farmaceutickém odvětví, protože umožňuje analýzu širokého spektra biologicky aktivních látek, jako jsou například aminokyseliny, peptidy, neurotransmitery, sacharidy, glykosidy, nukleotidy a mnoho dalších [7] [9].

Tato metoda je schopná nahradit špatně reprodukovatelnou NPLC, kde jsou navíc využívána toxická a drahá organická rozpouštědla.

Před analýzou biologických látek je často potřebná úprava a zpracování vzorku. Často využívané metody jsou precipitace nebo extrakce na tuhou fázi (SPE). Pro použití RPLC je po získání extraktů, supernatantů nebo eluátů, nutná následná úprava analyzovaného vzorku, spočívající většinou v odpaření přebytečného rozpouštědla, nekompatibilního s mobilní fází pro RPLC [9]. Na HILIC kolony je možné dávkovat přímo extrakty z organických vzorků, supernatanty z precipitace proteinů nebo eluáty z SPE, není zde potřeba odpaření a následná rekonstituce vzorku ve vhodnějším rozpouštědle. To umožňuje snížení počtu potřebných kroků při zpracování a analýze vzorků. Tím dochází k ušetření času a zjednodušení postupů, minimalizaci případných ztrát analytů při těchto operacích [8].

Protože rozpouštědla použitá pro mobilní fáze v systému HILIC mají nižší viskozitu, je zpětný tlak vznikající v systému nižší než pro RPLC a to umožňuje použití vyšších průtokových rychlostí [9].

Mobilní fáze pro HILIC mají také výhodné vlastnosti umožňující spojení s hmotnostní detekcí (MS). HILIC zde poskytuje zesílený signál v MS detekci, daný vyšší těkavostí rozpouštědel použitých v mobilní fází pro HILIC [9]. Současným trendem v analytické chemii je stále častější použití spojení HPLC a hmotnostní spektrometrie. Zejména se velmi často využívá spojení HPLC/MS/MS, kde chromatografie slouží pouze pro primární částečnou separaci (vyčištění) analytů. Hlavní analytickou funkci v tomto případě přebírá násobná hmotnostní spektrometrie. Proto je fakt umožňující spojení HILIC systému s hmotnostní spektrometrií velmi významný.

Hlavní nevýhodou HILIC je dostupnost a cena acetonitrilu, který je hlavní součástí mobilní fáze [9].



## 2.4 Validace

Validace je proces, při kterém je ověřována vhodnost analytické metody pro daný účel. Při tomto procesu jsou stanovovány výkonnostní parametry metody za použití přesně specifikovaných zařízení. Často je validace v těsném spojení s vývojem nové metody, kde je nutné ověřit, zda je vyvíjená metoda pro daný problém skutečně vhodná. Zda poskytuje výsledky, které jsou přesné, správné a že je možné danou metodu, při dodržení stejných podmínek opakovat i na jiném pracovišti [11].

Plná validace metody je časově náročný proces, zahrnující stanovení (ověření) celé řady parametrů. Jako je selektivita, robustnost, citlivost, mez detekce, mez stanovitelnosti, přesnost, správnost, pracovní rozsah a jiné. V praxi, u metod vycházejících z obecně známých a ověřených postupů, jako je HPLC, se tento proces redukuje na stanovení základních parametrů. A to je přesnost, linearita, správnost, mez detekce a stanovitelnosti, selektivita a robustnost.

### 2.4.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Test vhodnosti chromatografického systému je velmi důležitou součástí kontroly analytické metody. Slouží k ověření vhodnosti a vlastností chromatografických podmínek a k zajištění přiměřené účinnosti chromatografického systému [12].

#### Účinnost [12]

Účinnost chromatografické kolony je vyjádřena pomocí počtu pater (N). Pro výpočet počtu teoretických pater slouží vztah (2):

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

Kde  $t_R$  je retenční čas (nebo objem) a  $w_h$  je šířka píku v polovině jeho výšky.

### **Faktor symetrie** [12]

Faktor symetrie bývá označován jako  $A_s$ , zle ho vypočítat dle vztahu (3):

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2 \cdot d} \quad (3)$$

Kde  $w_{0,05}$  je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky a  $d$  je vzdálenost kolmice, která je spuštěná z vrcholku píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.

Pokud je faktor symetrie roven jedné, značí to ideálně symetrický pík. Lékopisným požadavkem je, aby byl faktor symetrie v intervalu 0,8 - 1,5.

### **Rozlišení ( $R_s$ )** [12]

Tento parametr slouží k vyjádření stupně separace píků. Rozlišení lze vypočítat dle vztahu (4):

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (4)$$

Kde  $t_{R1}$  a  $t_{R2}$  jsou retenční časy (platí že  $t_{R2} > t_{R1}$ )

$w_{h1}$  a  $w_{h2}$  jsou šířky píků v polovině jejich výšky

Píky jsou rozděleny na základní linii, pokud je rozlišení větší než 1,5

### **Opakovatelnost analýzy** [12]

Je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka pro několik po sobě se opakujících měřeních standardních roztoků. Je vyjádřena v procentech. Pro její výpočet lze použít vztah (5):

$$RSD = \frac{100}{\bar{y}} \cdot \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}} \quad (5)$$

Kde  $y_i$  jsou hodnoty získané z jednotlivých měření,  $\bar{y}$  je jejich průměr a  $n$  je počet jednotlivých hodnot.

## 2.4.2 Validace analytické metody

### Přesnost [11]

Opakovatelnost a reprodukovatelnost jsou dvě nejběžnější míry přesnosti. Pokud jsou měření prováděna stejným analytikem na stejném přístroji, jedná se o opakovatelnost. Pokud je vzorek analyzován v několika laboratořích, různými analytiky, jedná se o reprodukovatelnost. Přesnost je obvykle uváděna formou směrodatné odchylky nebo relativní směrodatné odchylky.

Předepsaným postupem se připraví minimálně šest vzorků. Následně jsou výsledky zprůměrovány, pro výpočet průměrné hodnoty ( $\bar{x}$ ) je použit následující vztah (6):

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot (x_1 + x_2 + \dots x_n) \quad (6)$$

Kde n je počet měření a jednotlivé hodnoty měření jsou označeny jako  $x_1$ ,  $x_2$  až  $x_n$ .

Směrodatná odchylka (s) je získána pomocí vztahu (7):

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (7)$$

Relativní směrodatná odchylka (RSD) je vyjádřena v procentech a lze jí získat pomocí následujícího vztahu (8):

$$RSD = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}} \quad (8)$$

### Linearita [11]

Sleduje, zda má závislost koncentrace analytu nebo jiné sledované vlastnosti, na signálu lineární charakter v daném rozsahu.

### Správnost [11] [13]

Správnost udává, jak moc se liší výsledek metody od správné hodnoty. Pro určení správnosti se používají tři metody. Zjištění výsledků pomocí jiné metody, která je správná a následné porovnání výsledků. Nebo analýzou modelového vzorku (placeba s přidaným standardem). Pokud není k dispozici placebo, používá metoda standardního přídatku, kde je stanovena výtěžnost. Je udávána v procentech.

Ke vzorku je přidáno známé množství analytu a vzorek je následně zpracován dle daného postupu. Výsledné hodnoty jsou využity pro výpočet výtěžnosti, dle následujícího vztahu (9):

$$R_i = 100 \cdot \frac{x_v - x_i}{x_0} \quad (9)$$

$x_v$  je výsledná hodnota naměřená v obohaceném roztoku

$x_i$  je hodnota naměřená bez přídavku

$x_0$  je hodnota přídavku

### **Mez detekce (LOD)** [7]

V případě, že jsou měřeny nízké koncentrace analytu, je třeba zjistit, jaká je nejnižší koncentrace analytu nebo úroveň vlastnosti, kterou je možno věrohodně detekovat, ne však stanovovat. Pro tento účel slouží stanovení detekčního limitu (LOD).

Jedna z možností určení detekčního limitu je z hodnocení směrodatné odchylky šumu a hodnot plochy, výšky a koncentrace látky. Detekční limit je pak vyjádřen jako trojnásobek získaných hodnot.

### **Mez stanovitelnosti (LOQ)** [7]

Charakterizuje nejnižší koncentraci analytu, kterou lze stanovit a která bude mít přijatelnou správnost a přesnost. Nazývá se také jako limit kvantifikace (LOQ). Získává se obdobným způsobem jako LOD. Výsledná hodnota je pak rovna desetinásobku získaných hodnot.

### **Selektivita** [11]

Slouží pro získání jistoty, že signál, nebo jiná měřená vlastnost, získané při analýze, odpovídají pouze analytu a nedochází k interferencím s jinými látkami, které mají podobné fyzikální nebo chemické vlastnosti.

Obvykle se posuzuje schopností měřit stanovovaný analyt ve zkoušených vzorcích, do kterých jsou záměrně přidány interferující složky. Dané složky jsou předpokládáné i v reálných vzorcích.

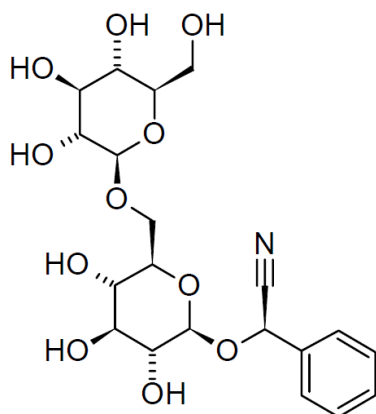
## 2.5 Amygdalin

Amygdalin je znám také pod jinými označeními jako například vitamín B17, laetril, mandelonitril a jiné. Přesto, že laetril je používán jako jiné označení pro amygdalin, nejedná se o stejnou látku. Označení Laetril vzniklo spojením slov „laevoratory“ (levotočivý) a mandelonitril. Aktivní formou amygdalinu je jeho pravotočivá forma (R-amygdalin), což je přírodní amygdalin [14] [15].

### 2.5.1 Popis, chemická struktura a vlastnosti

Amygdalin patří do skupiny kyanogenních glykosidů, což jsou sekundární metabolity rostlin, skládají z aglykonu a cukerné složky. Pro kyanogenní glykosidy je typická nitrilová skupina. logP amygdalinu je rovno -2,237 a pKa 12,69 [16] [17].

Strukturní vzorec amygdalinu je uveden na obrázku č. 1:



obrázek č. 1 - amygdalin (D-mandelonitril-β-D-glukosido-6-β-glukosid) [18]

Díky nitrilové skupině mají kyanogenní glykosidy schopnost uvolňovat ze své struktury, za pomoci enzymatické aktivity, kyanovodík, který je toxický. Slouží jako ochrana rostlin.

Jako příklad lze uvést enzymatickou degradaci amygdalinu, ta probíhá přes několik meziproductů. V první fázi dochází k odštěpení glukózy, za vzniku prunasinu. Tento děj je uskutečněn pomocí enzymu amygdalin lyazy. V další fázi je molekula prunasinu rozdělena na glukózu a mandelonitril, díky enzymu prunasin lyazy. V poslední řadě dochází ke vzniku kyanovodíku a benzaldehydu, tento krok je zajištěn hydroxynitril lyazou. Enzymy uvolňující kyanovodík ( $\beta$ -glukosidázy a hydroxynitril lyazy) se do styku s kyanogenními glykosidy dostávají při poškození tkáňových struktur rostliny, ke kterému dochází například při žvýkání nebo odírání.

Amygdalin je obsažen v semenech a plodech některých rostlin z čeledi Rosaceae, příkladem mohou být například meruňka, jabloň, broskvoň a jiné. Například v jádrech meruňky a hořkých mandlích je zastoupen ve vysokém obsahu. V hořkých mandlích zastupuje amygdalin až 5% obsahu. Amygdalin je považován za látku odpovědnou za léčivé účinky jader meruňek a hořkých mandlí, které jsou využívány k léčení některých chorob v tradiční medicíně [15] [16] [19].

### **2.5.2 Farmakologické vlastnosti**

V posledních letech jsou prováděny výzkumy zabývající se farmakologickými vlastnostmi amygdalinu, některé poznatky vychází z orientální medicíny, ve které je použití rostlinných produktů obsahujících amygdalin známo již velmi dlouhou dobu. Například semena z plodů meruňky a hořké mandle, ve kterých je amygdalin hlavní obsahovou složkou, jsou v orientální medicíně používány k léčbě astmatu, bronchitid, emfyzémů, nevolnosti, horečky, kašle a spousty dalších onemocnění dýchacího systému [20].

Amygdalin má podle některých studií pozitivní efekt na imunitní systém. Dále je také zkoumána jeho schopnost ovlivnit zánětlivé pochody při atherosklerotických dějích a možnost využití amygdalinu a jeho analogů v této problematice. Mezi další farmakologické vlastnosti přisuzované amygdalinu také patří analgetický, antiastmatický a antitusický efekt [20] [21].

Amygdalin je také zkoumán jako možný lék při léčbě rakoviny. Mimo jiné díky jeho vlivu na angiogenezi [22]. Amygdalin bývá v dnešní době využíván jako alternativní lék pro léčbu nádorů nebo jako doplňková léčba [14].

Všechny výše uvedené vlastnosti jsou předmětem intenzivního zkoumání, nejsou zatím medicínsky a vědecky plně doložené. Většina studií byla zatím provedena pouze na tkáňových strukturách, nebo na laboratorních zvířatech. Proto amygdalin není zatím součástí klasických terapeutických postupů.

### **2.5.3 Toxicita amygdalinu**

Jak již bylo zmíněno dříve, po perorálním podání je amygdalin rozkládán a mimo jiné z něj vzniká toxický kyanovodík. Z přírodních zdrojů obsahujících amygdalin, jako jsou hořké mandle, jádra meruněk višňi a podobně, se uvolňuje přibližně 3000 mg/kg (asi 0,3%) kyanovodíku. Jako dolní riziková hranice toxicity kyanovodíku je uváděno 0,5 mg/kg a letální dávka pro dospělého člověka je přibližně 50 mg [15] [19].

Příznaky otravy kyanovodíkem při nadměrném požití rostlinných zdrojů amygdalinu, nebo potravinových doplňků obsahujících amygdalin se dostaví od čtvrt hodiny až do hodiny po požití. Kyanovodík je označován také jako krevní jed, vyvolávající takzvané vnitřní udušení. V organismu kyanovodík způsobuje hypoxii a příznaky otravy jsou spojené s nedostatkem kyslíku v tkáních. Nedostatek kyslíku se projeví nejprve v nervové tkáni. Mezi časné příznaky otravy lze zařadit únavu, hučení v uších a bolest hlavy. Smrt nastává v důsledku nedostatku kyslíku v životně důležitých orgánech [19].

V organismu jsou přítomné obranné mechanismy proti otravám kyanovodíkem po požití kyanogenních glykosidů. Jedním z mechanismů je rychlá absorpce kyanovodíku a současně jeho zpomalené uvolňování z kyanogenních glykosidů. Ochrana je zajišťována i za pomoci enzymu rhodanasy, která přeměňuje kyanovodík na rhodanid. Jsou popsány případy, kdy vysoké dávky vitamínu C způsobily vážné otravy kyanovodíkem při současné konzumaci rostlinných zdrojů obsahující amygdalin. Vitamin C totiž podporuje vznik a uvolňování kyanovodíku z kyanogenních glykosidů do organismu a současně snižuje hladiny cysteinu, aminokyseliny, která se podílí na detoxikaci kyanovodíku [15] [16] [19].

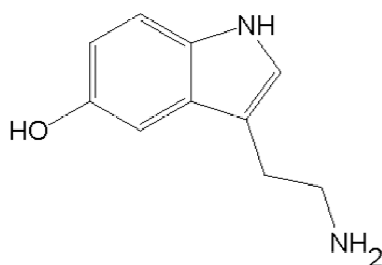
## 2.6 Serotonin

### 2.6.1 Popis, chemická struktura a vlastnosti

Serotonin je biologicky aktivní látka, jiné označení pro serotonin je 5-hydroxy tryptamin. Protože bývá často spojován s pozitivními pocity, je také občas nazýván jako hormon lásky nebo hormon štěstí a pohody.

Z chemického hlediska se jedná o indolamin. logP serotoninu je 0,545 a pKa je rovno 9,97 a 10,73 [17].

Strukturní vzorec serotoninu je uveden na obrázku č. 2



obrázek č. 2 - Serotonin (5-hydroxytryptamin) [23]

V lidském těle má serotonin mnoho funkcí. Patří do skupiny neurotransmiterů, které jsou nezbytné pro normální funkci lidského mozku, ovlivňuje lidské chování, nálady, cirkadiální rytmy teplotu těla a jiné. Snížená hladina serotoninu v centrálním nervovém systému může mít za následek deprese, poruchy spánku a jiné. Zvýšená hladina naopak může způsobovat mánie, panické chování, zmatenost. Na periférii je serotonin obsažen v krevních destičkách a má vliv na krevní srážlivost, dále je produkován v buňkách trávicího traktu a ovlivňuje funkci trávicího systému.

Serotonin, který je přítomen na periférii neprochází hematoencefalickou bariérou a neovlivňuje centrální nervový systém. Proto i serotonin přímo získaný z potravy má vliv pouze na periférii. Serotonin může v těle vznikat i z prekurzorů jako je esenciální aminokyselina L-tryptofan (viz příloha č. 1). Průchod L-tryptofanu přes hematoencefalickou bariéru je zajištěn pomocí transportéru. Proto potrava obsahující L-tryptofan může zvýšit hladinu serotoninu i v centrálním nervovém systému [24].



### **2.6.2 Výskyt v přírodě**

Serotonin je možné ho nalézt i v mnoha rostlinách, jeho obsah však není příliš vysoký. Jednotky obsahu serotoninu v daných přírodních materiálech se pohybují většinou v řádech  $\mu\text{g/g}$  hmoty a nižší.

Pro orientaci jsou uvedeny některé obsahy serotoninu v rostlinách [25].

- brukev řepka olejka (obsah serotoninu přibližně  $110 \mu\text{g/g}$  nesusušené rostliny)
- plod ananasu (přibližně  $1,5 \mu\text{g/g}$  nesusušeného plodu)
- plod slivoně (přibližně  $10 \mu\text{g/g}$  nesusušeného plodu)

Serotonin lze najít i v dalších rostlinách, jako je například rakytník řešetlákovitý, který je mimo jiné i součástí doplňku stravy B17 APRICARC .

Plody a olej z rakytníku jsou tradičně používány k léčbě a prevenci některých nemocí jako například psychotické poruchy, dále je rakytník používán pro zlepšení funkce imunitního systému a trávicího traktu [26] [27] [28].

## **2.7 B17 APRICARC s meruňkovým olejem**

### **2.7.1 Popis produktu**

Želatinové tobolky doplňku stravy B17 APRICARC jsou naplněny směsí s obsahem mletých sušených meruňkových jader a olejů z meruňkových jader. Směs dále obsahuje mleté sušené plody rakytníku řešetlákového, mletou hlívu ústřičnou a prášek lyofilizované reishi. Výrobce uvádí, že základními prospěšnými látkami v tomto doplňku je amygdalin, který je obsažen v jádrech meruněk a imunoglukany, obsažené v reishi a hlívě [28] [29].

## 2.8 Rešerše

Byly vyhledány články, zabývající se stanovením amygdalinu a serotoninu pomocí techniky HPLC, některé poznatky z této kapitoly byly využity v experimentální části. K vytvoření literární rešerše byly použity internetové zdroje: Sciencedirect, Web of knowledge a Google.

### 2.8.1 HPLC metody pro stanovení amygdalinu

kolona	C18 (150 mm × 4,60 mm, 3 μm)
mobilní fáze	isokratická eluce, methanol : voda (25:75, v:v)
průtok	1 ml/min
nástřik	5 μl
detekce	UV 214 nm
články	[16] [30]

kolona	C18 (4,6 mm × 250 mm, 5 μm)
mobilní fáze	isokratická eluce, acetonitril : voda (13:87, v:v)
průtok	1 ml/min
nástřik	10 μl
detekce	UV 214 nm
článek	[31]

kolona	C18 (2,1 mm × 150 mm, 5 μm)
mobilní fáze	isokratická eluce, acetonitril : 5mM octan amonný s obsahem 0,05% kyseliny mravenčí (20:80, v:v)
průtok	300 μl /min
nástřik	10 μl
detekce	MS
článek	[32]

kolona	C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm)
mobilní fáze	isokratická eluce, methanol : voda (35:65, v:v)
průtok	1 ml/min
nástřik	10 μl
detekce	UV 210 nm
článek	[33]

kolona	C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm)
mobilní fáze	isokratická eluce, acetonitril: voda (20:80, v:v)
průtok	1,5 ml/min
nástřik	20 μl
detekce	UV 218 nm
článek	[34]

kolona	C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm)
mobilní fáze	10 mM fosforečnan sodný (pH 3.1) obsahující 8,5% acetonitrilu
průtok	1,2 ml/min
nástřik	10 μl
detekce	UV 214 nm
článek	[35]

### 2.8.2 extrakční techniky pro získání amygdalinu

zpracování vzorku	povaření rozdrcených vzorků ve vroucím ethanolu pod zpětným chladičem, odpaření ethanolu, přidání diethyletheru k odparku, následné odpaření diethyletheru a rozpuštění amygdalinu ve vodě a příprava pro HPLC
články	[16] [30]

zpracování vzorku	trojnásobná extrakce do methanolu, následné spojení extraktů a odpaření methanolu. Rozpuštění odparku v destilované vodě, následná úprava pro HPLC
článek	[31]

### 2.8.3 HPLC metody pro stanovení serotoninu

kolona	C18 (100 mm × 3,2 mm, 3 μm)
mobilní fáze	isokratická eluce, acetonitril : methanol : 20 mM kyselina mravenčí, 10mM dihydrogen fosforečnan sodný, 3,25 mM oktansulfonová kyselina, 3 mM heptansulfonová kyselina, 0,1 mM EDTA, 2 mM chlorid draselný, 6 ml/l kyselina fosforečná a 2 ml/l diethylamin (7:3:90, v:v:v), pH 3,0
průtok	0,6 ml/min
nástřik	20 μl
detekce	elektrochemický detektor
článek	[36]

kolona	C18 (rozměry neuvedeny)
mobilní fáze	isokratická eluce, 50 mM kyselina fosforečná, 50 mM kyselina citronová 400 mg/l oktansulfonová kyselina 0,1 mM EDTA, 8 mM chlorid draselný : methanol (97: 3, v:v), pH 3,75
detekce	elektrochemický detektor
článek	[37]

kolona	C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm)
mobilní fáze	isokratická eluce, acetátový pufr (12 mM octová kyselina, 0,26 mM EDTA) : methanol (86:14, v:v), pH 3,5
průtok	1 ml/min
nástřik	20 μl
detekce	fluorescenční detektor (279 nm a 320 nm)
článek	[38]

kolona	C18 (100 mm × 4 mm, 3 μm)
mobilní fáze	isokratická eluce, 0,05 M citrát-fosforečnanový pufr, 0,1 mM EDTA, 1mM oktansulfonát sodný : methanol (96,5:3,5, v:v), pH 3,5
průtok	1 ml/min
detekce	elektrochemický detektor
článek	[39]

kolona	C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm)
mobilní fáze	isokratická eluce, kyselina citronová (12,2 mM), octan amonný (11,6 mM), oktansulfonát sodný (2,5 mM), dibuthylamin fosfát (3,3 mM, pH 2,5), EDTA (1,1 mM)
průtok	0,5 ml/min
nástřik	fluorescenční detektor (280 nm a 340 nm)
detekce	20 μl
článek	[40]

kolona	C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 μm)
mobilní fáze	gradientová eluce, acetonitril : voda
průtok	1,2 ml/min
nástřik	20 μl
detekce	UV 254 nm
článek	[41]

kolona	ZIC-HILIC column (100 mm × 2,1 mm, 3 μm)
mobilní fáze	isokratická eluce, methanol : vodná fáze (55:45, v:v), vodná fáze: 20 mM mravenčan amonný, pH 3,0
průtok	200 μl/min
nástřik	3 μl
detekce	MS
článek	[42]

kolona	Atlantis HILIC silica (50 mm × 2,1 mm, 3 μm)
mobilní fáze	gradientová eluce, acetonitril : 100 mM mravenčan amonný, pH 3,0
průtok	0,35 ml/min
nástřik	35 μl
detekce	elektrochemická detekce + MS
článek	[43]

Na základě provedené rešerše bylo zjištěno, že metoda pro současné stanovení serotoninu a amygdalinu na HILIC kolonách zatím nebyla publikována.

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Úvod k experimentální části**

Všechna měření byla prováděna v laboratořích katedry analytické chemie farmaceutické fakulty v Hradci králové.

Tato práce je zaměřena na vlastnosti analytických kolon s technologií HILIC a proto byly pro analýzu vybrány a zkoušeny kolony z této skupiny.

#### **3.1.1 Přístrojové vybavení**

Sestava pro HPLC: Shimadzu LC - 2010C, Shimadzu corp., software Clas VP 6.13

UHPLC system Acquity UPLC (Waters), software Empower (použit při analýze serotoninu)

UV spektrofotometr Hewlett Packard 8453

Fluorescenční spektrometr RF-1501, Shimadzu

Analytické váhy, Sartorius

Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec, Badelin

Centrifuga EBA 21, Hettich Zentrifugen

Laboratorní pH metr Hanna instruments, pH 212

Filtrační zařízení pro filtraci mobilní fáze Millipore

#### **3.1.2 Kolony**

Obelisc<sup>®</sup> (3,2 x 150 mm, 5 μm), výrobce: Sielc technologies

Luna<sup>®</sup> (3 x 100, 3 μm), výrobce: Phenomenex

Atlantis<sup>®</sup> HILIC silica (21 x 100 mm, 3 μm), výrobce: Waters

Ascentis<sup>®</sup> Express OH5 (3 x 100 mm, 2,7 μm), výrobce: Sigma-Aldrich

Kolonky pro SPE - Oasis HLB 30 mg, výrobce: Waters

### **3.1.3 Použité standardy vzorky a chemikálie**

#### **Standardy**

Serotonin, Sigma-Aldrich, šarže: 091M5163V

Amygdalin, Sigma-Aldrich, šarže: BCBK4301V

#### **Vzorek**

přípravek B17 APRICARC, Terezia Company, šarže: 4KUKB241

přípravek B17 APRICARC, Terezia Company, šarže: 4KUK5922

#### **Ostatní chemikálie**

Acetonitril pro HPLC CHROMASOLV®, Sigma-Aldrich®, šarže: SZBE035AV

Methanol HPLC, Lach-Ner, s.r.o., šarže: 2013-4407

Ethanol, Lach-Ner, s.r.o., šarže: PP/2010/12219

Kyselina octová ledová, Sigma-Aldrich®, šarže: SZBD1070V

Octan amonný, Sigma-Aldrich®, šarže: SZBD2550V

Diethylether, Penta, šarže: 1312111212

Amoniak, Penta, šarže: 16022550211

### **3.1.4 Konečné podmínky analýzy, příprava vzorku a standardu**

#### **3.1.4.1 Konečné podmínky analýzy**

##### **Analytická kolona**

Ascentis<sup>®</sup> Expres OH5 (100 x 3 mm, 2,7 µm)

##### **mobilní fáze**

10 mM acetátový pufr pH 3,8 s acetonitrilem v poměru 10:90 (v:v)

##### **Průtok**

0,8 ml/min

##### **Dávkovaný objem**

5 µl

##### **Detekce**

UV detektor, vlnová délka je 215 nm - amygdalin

Fluorescenční detektor, Ex 280 nm, Em 340 nm - serotonin

##### **Režim**

isokratický

##### **Teplota**

40°C

##### **Doba analýzy**

6 minut



### 3.1.4.2 Příprava standardu

#### Amygdalin

Připraví se zásobní roztok amygdalinu v methanolu o koncentraci 1 mg/ml. Do pětimililitrové odměrné baňky je přeneseno 0,3 ml zásobního roztoku amygdalinu a je doplněno směsí ethanol:acetonitril (1:9) do pěti mililitrů. Tímto postupem je získán standardní roztok amygdalinu o koncentraci 0,06 mg/ml.

#### Serotonin

Připraví se zásobní roztok serotoninu v 96% ethanolu o koncentraci 1,0 mg/10,00 ml. Roztok se čtyřikrát naředí stejným rozpouštědlem. Takto je získán standardní roztok serotoninu o koncentraci 0,25 µg/ml.

### 3.1.4.3 Příprava vzorku

#### Amygdalin

V centrifugační zkumavce je smícháno navážené množství vzorku (přesně asi 0,39 gramů) a 10 mililitrů 96% ethanolu. Zkumavka je na 30 minut vložena do chlazené ultrazvukové lázně. Následně je zkumavka s obsahem centrifugována po dobu 4 minut při rychlosti otáčení 1300 x g. Pomocí injekční stříkačky je odebrán supernatant a filtrován přes 0,22 µm PTFE filtr. Vzorek se desetkrát naředí acetonitrilem a analyzuje pomocí HPLC.

#### Serotonin

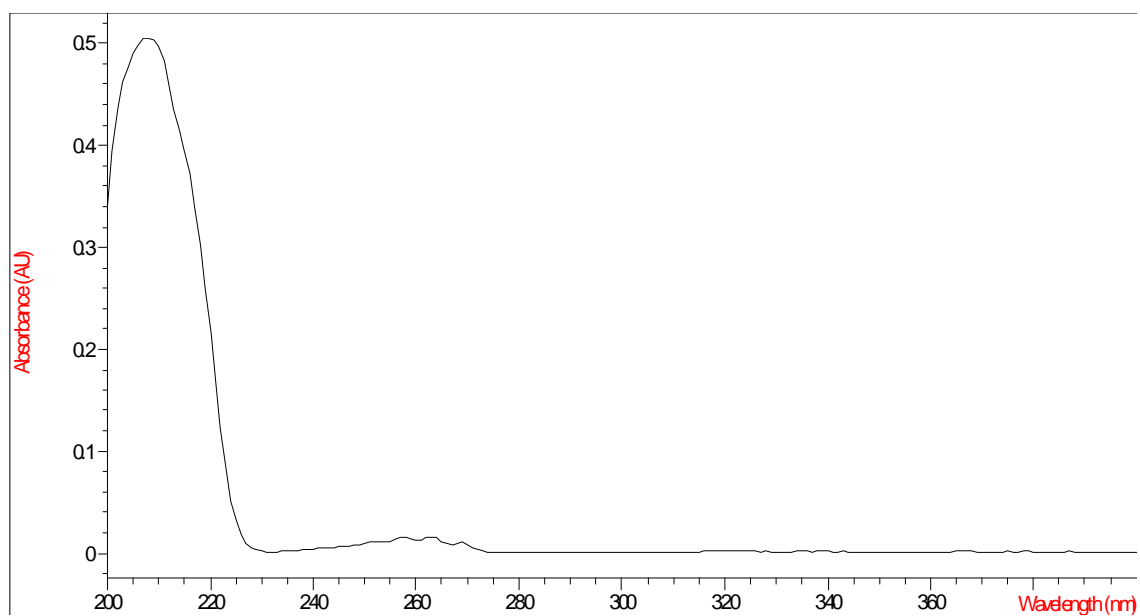
Postup zpracování vzorku při stanovení obsahu serotoninu je shodný jako v případě stanovení amygdalinu. Avšak získaný extrakt není dále ředěn, jako je tomu u amygdalinu, ale je přímo dávkován na kolonu.

## 4 Výsledky a diskuze

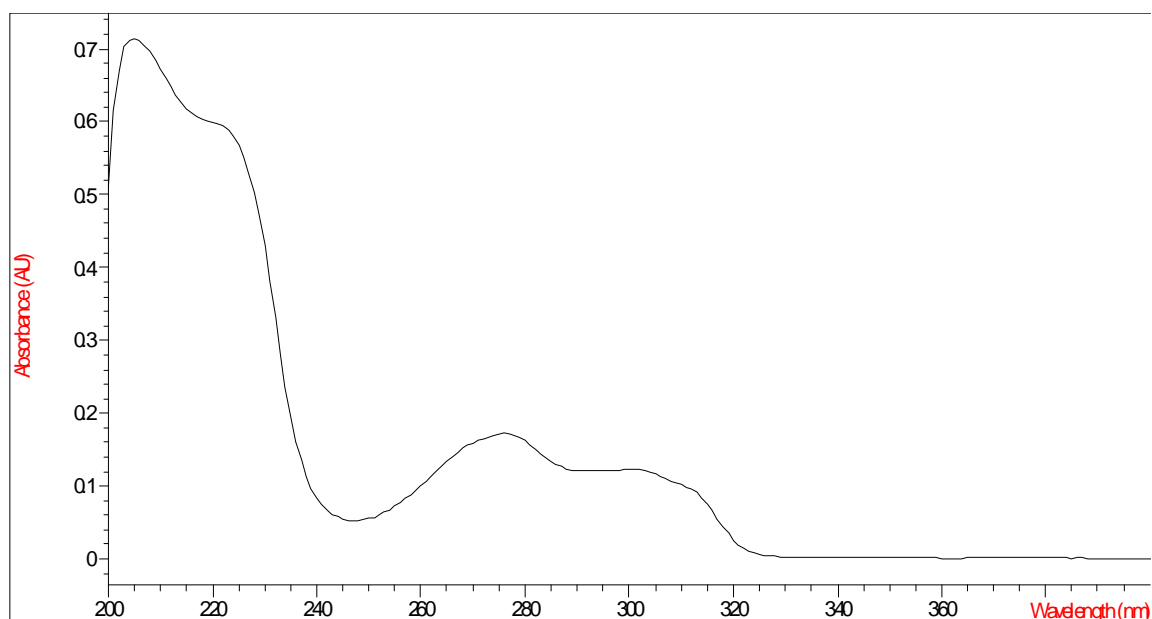
### 4.1 Zjištění výchozích parametrů

#### 4.1.1 Výběr vhodné vlnové délky pro detekci

Byly připraveny roztoky standardů serotoninu a amygdalinu v methanolu, jejich koncentrace byla přibližně 0,5 mg/ml. Jejich pomocí byla proměřena UV spektra a nalezeny vhodné hodnoty vlnových délek pro detekci. Amygdalin vykazoval jedno výrazné absorpční maximum při 208 nm a druhé velmi malé při hodnotě 260 nm (viz obrázek č. 3). Serotonin vykazoval dvě maxima při 205 nm a 270 nm (viz obrázek č. 4).



obrázek č. 3 - absorpční UV spektrum amygdalinu



obrázek č. 4 - absorpční UV spektrum serotoninu

Pro finální nastavení UV detektoru byla vybrána vlnová délka 215 nm.

#### 4.1.2 Výběr vhodné kolony

Nalezení vhodných chromatografických podmínek při systému reverzních fází pro amygdalin, není obtížné, důvodem využití technologie HILIC, je problematické nalezení podmínek pro stanovení serotoninu, vzhledem k jeho bazickým vlastnostem.

Výchozí složení mobilní fáze bylo stanoveno na základě potřeb HILIC kolon a zkušeností katedry analytické chemie. Byla použita směs acetonitrilu, který zastupoval organickou fází a 10 mM roztoku octanu amonného, zastupujícího vodnou fází.

Jako standardy byly použity methanolové roztoky amygdalinu a serotoninu o koncentraci 0,5 mg/ml.

Jako první byla vyzkoušena kolona Obelisc<sup>®</sup>. Tato kolona vyžadovala úpravu pH octanu amonného na 5,00 dle pokynů výrobce. Poměr fází byl nejprve 75% organické fáze a 25% vodné fáze a následně 90% organické a 10% vodné fáze. Ani v jednom případě nedošlo k zadržování amygdalinu na koloně, proto byla tato kolona prohlášena za nevhodnou.

Jako další byla vyzkoušena kolona Luna<sup>®</sup>. Poměr složek v mobilní fázi byl 90% organická a 10% vodná a následně 95% a 5%. I v tomto případě byl amygdalin eluován společně s mrtvým objemem. Proto bylo přistoupeno k vyzkoušení další kolony.

Třetí kolona byla Atlantis<sup>®</sup> HILIC silica při poměru fází 90% organická a 10% vodná fáze a poté 95% a 5%. Ani tato kolona neposkytovala vhodnou retenci amygdalinu.

Jako poslední byla vyzkoušena kolona Ascentis<sup>®</sup> Express OH5, při poměru fází 90% organická a 10% vodná fáze. Zde již amygdalin vykazoval retenci, a proto byla kolona Ascentis<sup>®</sup> Express OH5 vybrána jako vhodná pro další optimalizaci dané metody.

#### **4.1.3 Rychlost průtoku**

Rychlost průtoku byla stanovena na 0,8 ml/min. Při této rychlosti se tlak v systému pohyboval v hodnotách do 20 MPa, které byly přijatelné pro analýzu.

#### **4.1.4 Vliv rozpouštědla na signál detektoru**

##### **Příprava standardních roztoků**

Standardní roztok amygdalinu byl připraven rozpuštěním 20 mg standardu v 5 ml 90% acetonitrilu. Obdobným způsobem byl připraven standardní roztok serotoninu, jehož navážka byla 10 mg.

##### **Postup**

Bylo smícháno 500 µl standardního roztoku amygdalinu a 500 µl standardního roztoku serotoninu a následně bylo přidáno 9 ml daného rozpouštědla. Použitá rozpouštědla byla methanol, 96% ethanol, acetonitril a směsi jednotlivých rozpouštědel s vodou v poměru 75:15 (v:v).

Byla sledována plocha a tvar píku serotoninu i amygdalinu. Výsledné chromatogramy byly následně vyhodnoceny a bylo vybráno nejvhodnější rozpouštědlo.

Největší plochy byly sledovány u ethanolu, v případě použití acetonitrilu byly plochy menší asi o deset procent, než v případě ethanolu. Na druhé straně pokud byl použit acetonitril jako rozpouštědlo, byly píky mnohem symetričtější. Na základě výsledků byl jako optimální rozpouštědlo stanoven acetonitril.

#### **4.2 Závislost chování analytů na podmínkách prostředí za pomoci standardních roztoků**

Byly připraveny standardy amygdalinu a serotoninu. Ve směsi 800  $\mu$ l acetonitrilu a 200  $\mu$ l vody byly rozpuštěny 2 mg amygdalinu. Obdobným způsobem byl připraven standardní roztok serotoninu o koncentraci 0,5 mg/ml. Oba standardy byly následně smíchány v jedné vialce a využity k měření.

Měření probíhalo za průtoku 0,8 ml/min a teplotě 40°C. Doba měření byla stanovena na 25 minut. Objem nástřiku standardu byl 2  $\mu$ l.

Změny vlastností mobilní fáze byly zajištěny obměnou pH vodné fáze i rozdílným poměrem mezi fází organickou a vodnou.

Poměry fází byly obměňovány v řadě organická:vodná fáze 95:05, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 40:60, 20:80, 10:90, 05:95. Jako vodná fáze byl použit nejprve 10 mM roztok octanu amonného o hodnotě pH 6,8, následně bylo pH zvýšeno na 8,3 a poté sníženo na 5,3 a 3,8 roztokem amoniaku, anebo kyselinou octovou. Dále byl použit 50 mM roztok octanu amonného o pH 6,8. Jako další byla použita kyselina octová o koncentraci 0,5%, hodnota pH byla 2,94.

Každé měření bylo provedeno dvakrát a naměřené hodnoty ploch píků a retenčních časů byly zprůměrovány a zaznamenány.

#### 4.2.1 Výsledky a jejich interpretace

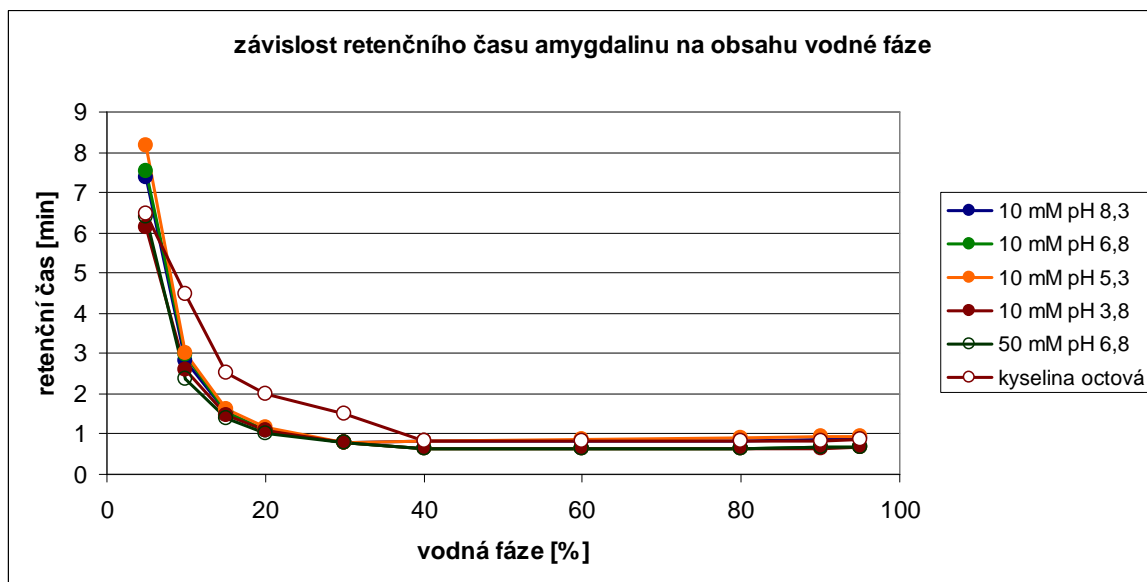
Výsledné hodnoty parametrů separace jsou uvedeny v příloze č. 2.

Pro hodnoty pH vyšší než 3,8 při obsahu vodné fáze 5% byl retenční čas vyšší než zvolená doba analýzy - 25 min. Proto nejsou hodnoty v tabulce ani v grafických záznamech uvedeny.

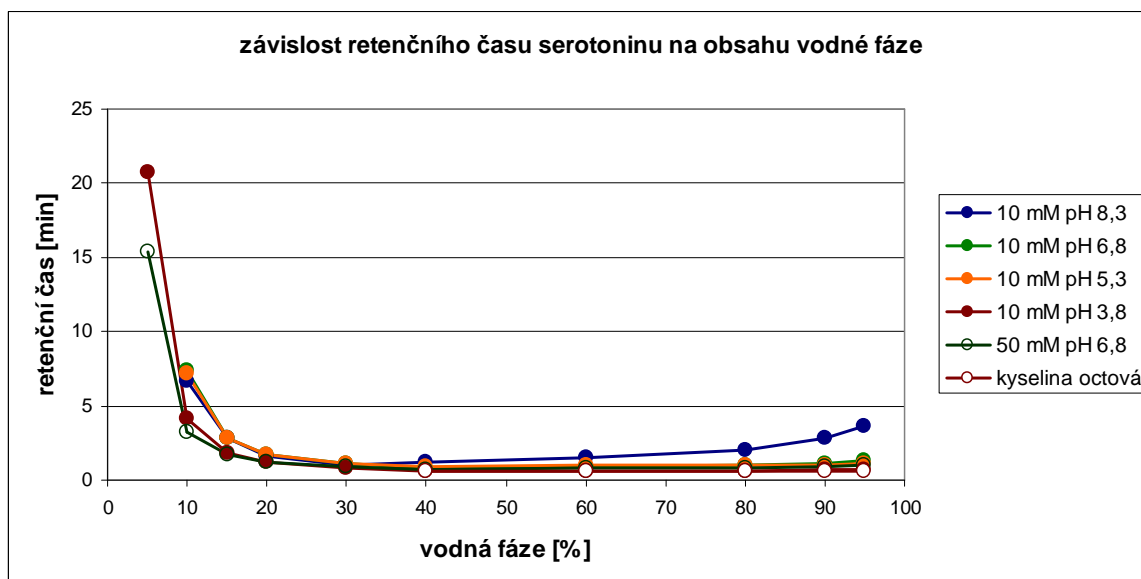
Při použití kyseliny octové, jako součásti mobilní fáze, došlo ke změnám vlastností serotoninu. Při poměru fází 95:05 byl retenční čas serotoninu 7,79 min a pík měl šířku 3,5 minut, při navýšení poměru vodné fáze na 90:10 se serotonin eluoval jako dvojitý pík. Při dalším navýšování poměru vodné fáze už serotonin nebyl zadržován na koloně a byl eluován společně s mrtvým objemem.

Dále byl také vyzkoušen 25 mM octan amonný při pH 3,8. Při poměru fází 95:05 se amygdalin a serotonin eluovaly dohromady. Serotonin tvořil pík podobný píku za použití kyseliny octové při poměru fází 95:05. Další měření už nebylo prováděno a tato vodná fáze byla prohlášena za nevhodnou.

#### Grafické zpracování výsledků a jejich interpretace



Obrázek č. 5 - graf závislosti retenčního času amygdalinu na složení mobilní fáze

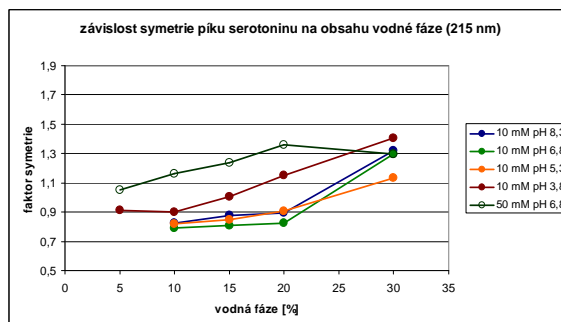
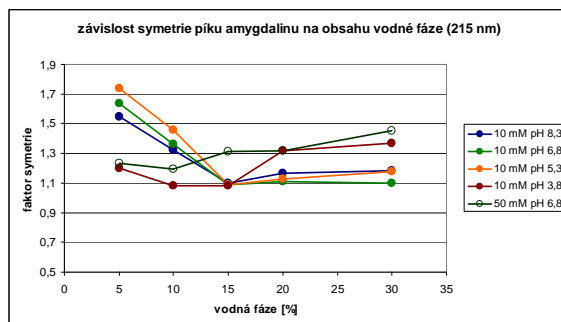


Obrázek č. 6 - graf závislosti retenčního času serotoninu na složení mobilní fáze

Na základě naměřených dat (viz obrázky č. 5 a 6) byla zjištěna silná závislost retenčního času obou látek na obsahu vodné fáze. Zejména v případě serotoninu při nízké koncentraci vodné fáze došlo k významnému nárůstu retenčního času, což je typické pro HILIC. Se zvyšujícím se obsahem vodné fáze došlo k poklesu retence obou analytů. V další části bylo studováno chování obou látek v takzvaném reverzním modu (obsah vodné fáze vyšší než 30%).

Výsledky ukázaly, že s narůstajícím obsahem vody (nad 30%) se retenční čas amygdalinu významně nemění a pohybuje se pod hodnotou jedné minuty. V případě serotoninu, bylo po překročení hranice 30% možné sledovat opětovné narůstání retenčního času se vzrůstajícím obsahem vodné fáze. Tento jev byl nejvíce patrný v případě 10 mM octanu amonného při pH 8,3. Jak již bylo dříve popsáno, pokud byla jako vodná fáze použita kyselina octová, nebyl serotonin na koloně zadržován, pokud byl obsah fáze maximálně 30%, při navýšení obsahu vodné fáze došlo k zadržování na koloně, retenční čas se pohyboval kolem 0,6 minut a jeho změna nebyla příliš výrazná. Tento jev byl již dříve popsán v teoretické části (2.3.3). Dochází ke změnám vlastností kolony a retenční vlastnosti kolony jsou podobné jako při použití systému obrácených fází (RPLC), tedy se zvyšujícím se obsahem vodné složky mobilní fáze, roste retenční čas analytů.

Změna pH vodné složky mobilní fáze neměla větší vliv na retenční čas amygdalinu. S klesající hodnotou pH roste retenční čas, ale při pH=3,8 náhle klesne pod hodnotu naměřenou při vyšších hodnotách pH. Tento jev je nejvíce patrný při 5% obsahu vodné fáze. Naopak retence serotoninu byla ovlivněna změnou pH mobilní fáze výrazněji. Vyšší hodnota pH vede k silnější retenci serotoninu při vyšším obsahu acetonitrilu v mobilní fázi, naopak při pH 3,8 byl zaznamenán výrazný pokles retenčního času.



obrázek č. 7 - graf závislosti faktoru symetrie amygdalinu na složení mobilní fáze při 215 nm

obrázek č. 8 - graf závislosti faktoru symetrie serotoninu na složení mobilní fáze při 215 nm

Z grafů na obrázcích č.7 a 8 je patrné, že s klesajícím obsahem vodné fáze při hodnotách pH vyšší než 3,8 výrazně roste faktor symetrie piku amygdalinu. V případě serotoninu faktor symetrie piku naopak roste s narůstajícím obsahem vodné fáze pro všechny proměřené hodnoty pH. Bylo pozorováno výrazně odlišné chování kolony při hodnotě pH 3,8 od ostatních hodnot.

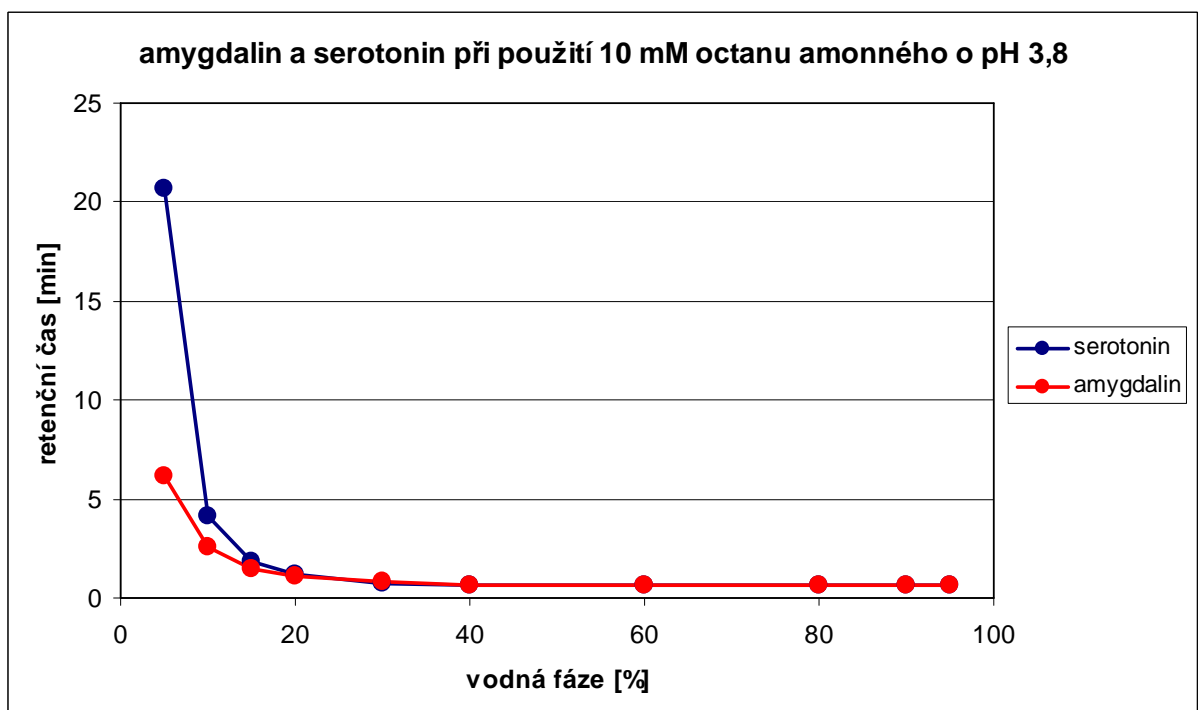
V příloze č. 3 a 4 jsou uvedeny i grafy závislosti faktoru symetrie píků amygdalinu a serotoninu na složení mobilní fáze i pro obsah vodné fáze vyšší než 30%. Nebyla pozorovaná žádná výrazná závislost, pokud jde o vztah mezi složením či koncentrací mobilní fáze a faktorem symetrie piku. Hodnoty faktoru symetrie pro amygdalin se pohybovaly v rozmezí 0,9 - 1,5 a pro serotonin 0,9 - 1,7.



Výsledky z této části, sloužily jako podklad pro určení vhodné mobilní fáze další části práce tj. analýzy amygdalinu z doplňku stravy.

Jako nejvhodnější složení se ukázalo 90% organické a 10% vodné fáze, kde vodnou fází je 10 mM octan amonný o pH 3,8. Při tomto složení se serotonin eluoval v čase 4 minuty a píky amygdalinu a serotoninu měly vhodný faktor symetrie, do hodnoty 1,5.

V závěru kapitoly je uveden graf (viz obrázek č. 9), znázorňující změny retenčních časů amygdalinu a serotoninu v závislosti na obsahu vodné fáze, kde vodnou fází je 10 mM octan amonný o pH 3,8.



obrázek č. 9 - graf závislosti retence amygdalinu a serotoninu na obsahu vodné fáze o pH 3,8

### **4.3 Extrakce a následná analýza amygdalinu v doplňku stravy**

#### **4.3.1 Stanovení průměrné hmotnosti jedné tobolky**

Pomocí deseti tobolek přípravku APRICARC B17 byla stanovena průměrná hmotnost obsahu jedné tobolky. Vážení bylo provedeno diferenčně, na analytických vahách, kdy byla nejprve zvážena celá kapsle a po vysypání obsahu byla zvážena prázdná želatinová tobolka.

Průměrná hmotnost obsahu jedné kapsle přípravku činila  $0,3952 \pm 0,0312$  g.

#### **4.3.2 Hledání vhodné extrakční techniky**

Rozhodovacím kritériem v této části práce byla dokonalá separace píku amygdalinu od ostatních látek, vysoká účinnost zvoleného extrakčního postupu a kvalitní chromatografické stanovení (výška píku, faktor symetrie). V neposlední řadě vlastní proces extrakce. Preferovány byly postupy s méně kroky, u kterých je menší riziko ztratit a chyb.

Jako standard, pro porovnání retenčních časů, byl použit amygdalin ve směsi 800  $\mu$ l acetonitrilu a 200  $\mu$ l vody, jeho koncentrace byla 0,25 mg/ml.

Některé extrakční postupy vycházely z výsledků provedené rešerše (kapitola 2.8.3.).

#### **Extrakce do vody**

Do centrifugační zkumavky bylo odváženo přesně asi 0,39 g vzorku a přidáno 5 ml destilované vody. Zkumavka byla uzavřena, promíchána a vložena do ultrazvukové lázně na 20 minut při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek centrifugován po dobu čtyř minut při rychlosti 1300 x g a následně byl supernatant odebrán a vytřepán se třemi mililitry n-hexanu, ten zde sloužil pro odstranění tuků v extraktu. Vodná fáze byla oddělena pro analýzu, zbytek n-hexanu ve vodné fázi byl odfoukán pod proudem vzduchu. Před nástřikem byl získaný roztok filtrován přes 0,22  $\mu$ m PTFE filtr. Nastřikováno bylo 10  $\mu$ l vzorku.

Tento postup se neosvědčil, protože společně s amygdalinem bylo vyextrahováno velké množství nečistot, které znemožňovalo získání odděleného píku amygdalinu.

### **Extrakce do acetonitrilu**

V centrifugační zkumavce bylo smícháno přesně asi 0,39 g vzorku a 5 ml acetonitrilu. Vzorek v uzavřené zkumavce byl promíchán a vložen do ultrazvukové lázně na 20 minut při laboratorní teplotě. Poté byl vzorek centrifugován po dobu čtyř minut při rychlosti 1300 x g. Byl odebrán supernatant a ten byl zfiltrován přes 0,22 µm PTFE filtr. Nastříkováno bylo 10 µl vzorku. Výsledkem tohoto postupu byl odseparovaný pík amygdalinu o malé výšce.

### **Extrakce na tuhou fázi SPE**

Pro SPE byly použity kolonky Oasis HLB 30 mg. Vodný výluh vzorku, který byl připraven stejně jako v bodě extrakce do vody, byl zfiltrován přes 0,22 µm PTFE filtr a takto připravený výluh byl použit pro SPE. Nejprve byly kolonky v SPE aktivovány pomocí dvou mililitrů acetonitrilu, poté byly promyty dvěma mililitry vody a následně byl přidán vodný výluh vzorku. Dále byla kolonka promyta dvěma mililitry vody. Poté byl vzorek eluován dvěma mililitry acetonitrilu.

Tato metoda se neukázala jako vhodná, protože výsledný chromatogram neposkytoval izolovaný pík amygdalinu a také proto, že se kolonky rychle zanášely a extrakce trvala velmi dlouho.

### **Extrakce do ethanolu a následná precipitace amygdalinu v diethyletheru**

0,39 g vzorku bylo v centrifugační zkumavce smícháno s 5 ml 96% ethanolu. Uzavřená zkumavka byla protřepána a vložena do ultrazvukové lázně o laboratorní teplotě na 20 minut. Poté byla vložena do centrifugy na čtyři minuty při rychlosti otáčení 1300 x g. Supernatant byl přenesen do skleněné zkumavky a ethanol byl odpařen pod proudem vzduchu. K odparku byl přidán jeden mililitr diethyletheru, který byl v zápětí odfoukán. Odparek byl rozpuštěn ve směsi 800 µl acetonitrilu a 200 µl vody. Roztok byl filtrován přes 0,22 µm PTFE filtr a nastříkováno bylo 10 µl. Tento postup neposkytl žádný pík amygdalinu.

### **Extrakce do methanolu**

K 0,39 g vzorku v centrifugační zkumavce bylo přidáno 5 ml methanolu. Uzavřená zkumavka byla protřepána a vložena na 20 minut do ultrazvukové lázně, v níž byla udržována laboratorní teplota. Po dvaceti minutách byla zkumavka vyjmuta a vložena do centrifugy na čtyři minuty při rychlosti otáčení 1300 x g. Supernatant byl zfiltrován přes 0,22 µm PTFE filtr a analyzován. Nastříkované množství činilo 10 µl. Výsledkem tohoto postupu byl vysoký pík amygdalinu.

Protože v chromatogramu bylo přítomné také velké množství balastních látek, které se eluovaly v okolí amygdalinu, bylo 100 µl extraktu naředěno 900 µl acetonitrilu. Nástřík činil opět 10 µl. Výsledkem tohoto postupu byl izolovaný pík.

### **Extrakce do ethanolu**

V centrifugační zkumavce bylo smícháno 0,39 g vzorku a 5 ml 96% ethanolu, po uzavření byla zkumavka protřepána a vložena do ultrazvukové lázně na dobu 20 minut. V lázni byla udržována laboratorní teplota. Po dvaceti minutách byla zkumavka vyjmuta a centrifugována po dobu čtyř minut při rychlosti 1300 x g. Supernatant byl přefiltrován přes 0,22 µm PTFE filtr a analyzován. Nastříkované množství bylo 10 µl.

Protože se výsledný chromatogram podobal chromatogramu při extrakci methanolem, byl extrakt také naředěn stejným způsobem a analyzováno bylo opět 10 µl. Výsledkem tohoto postupu byl opět izolovaný pík.

#### **4.3.2.1 Vyhodnocení výsledků**

Porovnáním výšky a kvality píků bylo zjištěno, že extrakce do methanolu a ethanolu jsou nejvýhodnější, obě poskytují dostatečně vysoký pík. Výsledným extrakčním postupem byla zvolena extrakce do ethanolu. Protože výsledný chromatogram byl čistší a píky měli lepší tvar.

Oba postupy, byly také vyzkoušeny pro serotonin, za použití fluorescenčního detektoru. Výsledky obou postupů byly porovnatelné.

#### **4.3.3 Vliv doby extrakce a množství extrakčního činidla**

Ke vzorkům o navážkách 0,39 g bylo přidáno 5 nebo 10 ml 96% ethanolu. Doba extrakce byla 10, 20 a 30 minut. Postup byl stejný jako v bodě extrakce ethanolom.

Byla sestavena závislost a výsledky byly vyhodnoceny.

Z dostupných výsledků bylo rozhodnuto, že nejvíce amygdalinu je získáno při extrakci pomocí 10 ml ethanolu po dobu 30 minut.

## 4.4 Validace metody pro stanovení amygdalinu

### 4.4.1 Test vhodnosti chromatografického systému

#### 4.4.1.1 Opakovatelnost analýzy

Připravený standardní roztok amygdalinu (viz kapitola 3.1.4.2 - příprava roztoku standardu) byl opakovaně dávkován na kolonu. Do tabulky byly zaznamenány plochy píků a retenční časy. Ze šesti měření byla určena směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Výpočet byl proveden pomocí programu Microsoft Excel. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1.

tabulka č. 1 - Opakovatelnost analýzy pro amygdalin

číslo měření	Retenční čas (min)	Plocha píku
1	2,19	334971
2	2,19	329771
3	2,18	334439
4	2,18	330414
5	2,17	334222
6	2,18	337373
průměr	2,18	333532
směrodatná odchylka	0,008345	2897,923
RSD (%)	<b>0,38</b>	<b>0,87</b>

Relativní směrodatná odchylka byla menší než 1% a tím byla prokázána dostatečná opakovatelnost analýzy.

Získaná data byla také dále použita pro určení účinnosti chromatografické kolony, faktoru symetrie a rozlišovací schopnost kolony.

#### 4.4.1.2 Účinnost chromatografické kolony

Byly použity tři chromatogramy z měření opakovatelnosti analýzy. Výpočet počtu pater byl proveden pomocí softwaru chromatografu. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 2.

tabulka č. 2 - počet teoretických pater

měření	N
1	5500
2	5520
3	5540
průměr	<b>5520</b>

Účinnost chromatografické kolony byla 5520 pater.

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

Ze tří chromatogramů získaných při měření opakovatelnosti analýzy, byl pomocí chromatografického softwaru zjištěn faktor symetrie píku. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 3.

tabulka č. 3 - faktor symetrie píku amygdalinu

měření	$A_s$
1	1,09
2	1,06
3	1,07
průměr	<b>1,07</b>

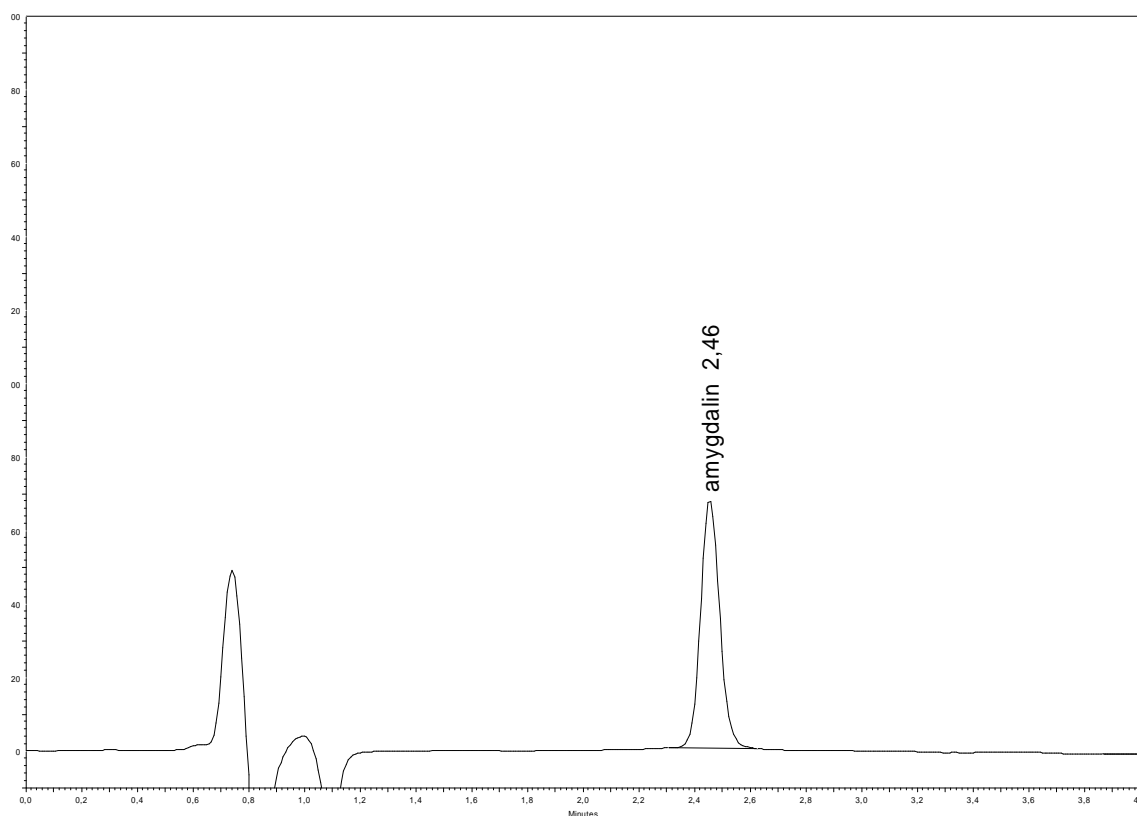
Lékopisným požadavkem je, aby zjištěná hodnota byla v intervalu 0,8 - 1,5. Výsledky jsou vyhovující, protože výsledná průměrná hodnota byla 1,07.

#### 4.4.1.4 Rozlišení ( $R_s$ )

Ze tří chromatogramů získaných při měření opakovatelnosti analýzy, byla pomocí softwaru zjištěna hodnota rozlišení ( $R_s$ ). Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 4 a na obrázku č. 10 je uveden chromatografický záznam standardního roztoku amygdalinu.

tabulka č. 4 - Rozlišení píku amygdalinu

měření	$R_s$
1	6,72
2	6,69
3	6,66
průměr	<b>6,69</b>



obrázek č. 10 - Chromatografický záznam standardního roztoku amygdalinu



## 4.4.2 Validace analytické metody

### 4.4.2.1 Přesnost

Bylo připraveno šest vzorků, dle postupu uvedeného v kapitole příprava vzorku (3.1.4.3). Ze dvou nástřiků byl vypočítán průměr ploch píku a výsledek byl přepočítán na stejnou hmotnost (tj. 0,39 g). Výsledné hodnoty byly zaznamenány do tabulky a byly vypočteny statistické ukazatele, průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 5.

tabulka č. 5 - Přesnost stanovení amygdalinu

vzorek číslo.	plocha píku při hmotnosti 0,39 g
1	123034
2	130042
3	150383
4	121388
5	140327
6	123556
průměr	<b>131455</b>
směrodatná odchylka	<b>11607,22</b>
RSD (%)	<b>8,83</b>

Relativní směrodatná odchylka byla 8,83%. Vysoká hodnota relativní směrodatné odchylky může být způsobena malou homogenitou náplně v tobolkách, v každé tobolce byl vizuálně patrný částečně rozdílný obsah částic. V některé tobolce byly více patrné květy v jiné sušené části plodů a podobně, tím může být vysvětlena velká variabilita obsahu amygdalinu.

#### 4.4.2.2 Linearita

Byl připraven zásobní roztok amygdalinu o koncentraci přesně asi 10 mg/10 ml v methanolu. 6,0 ml připraveného zásobního roztoku bylo přeneseno do odměrné baňky 50,00 ml a doplněno směsí ethanol:acetonitril (1:9) po rysku. Tímto postupem vznikl zásobní roztok o koncentraci přesně asi 1,2 mg/10ml, jeho postupným ředěním pomocí směsi ethanol:acetonitril (1:9) byla připravena řada standardních roztoků o koncentraci 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200%, kde 200% byl samotný zásobní roztok. Každý roztok byl dvakrát nastříknut a byl vypočítán průměr. Do tabulky byly zaznamenány průměrné hodnoty ploch píků a koncentrace standardu amygdalinu (viz tabulka č. 6). Z dostupných dat byla pomocí programu Excel vytvořena kalibrační křivka. Parametry kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulce č. 7 a její grafické znázornění je v příloze č. 5.

tabulka č. 6 - Linearita

koncentrace amygdalinu (mg/10 ml)	průměr ploch píků
0,06	33239
0,12	57137
0,30	158985
0,45	238990
0,60	321331
0,89	481452
1,20	637187

tabulka č. 7 - Parametry kalibrační křivky pro amygdalin

regresivní funkce:	$y = kx + q$
počet bodů:	7
rovnice přímky:	$y = 538261x - 1698,6$
koeficient korelace R:	0,9998

#### 4.4.2.3 Správnost

Byl stanoven průměrný obsah amygdalinu v jedné kapsli (APRICARC, š.č. 4KUK5922) při navážce 0,39 g ( $x_0$ ). Toto měření probíhalo s jinou šarží přípravku než měření v kapitole přesnost a průměrný obsah amygdalinu byl v této šarži jiný. Výsledky byly vyhodnoceny z kalibrační křivky zhotovené v den měření.

Pro určení správnosti byla použita metoda standardního přídávku. Byly připraveny tři standardní roztoky amygdalinu o známé koncentraci. Ke vzorku bylo přidáno známé množství amygdalinu (viz tabulka č. 8). Následně byl vzorek zpracován dle postupu uvedeného v kapitole příprava vzorku (3.1.4.3). Celkem bylo analyzováno osmnáct vzorků. Vždy bylo u jednotlivého přídávku zastoupeno šest vzorků. Získané roztoky byly analyzovány, nástřik byl proveden dvakrát a výsledné hodnoty byly zprůměrovány.

Správnost stanovení obsahu je zastoupena veličinou výtěžnost  $R_i$  (%), která byla vypočítána pomocí vztahu (9) uvedeného v kapitole (2.4.2):

Nalezené hodnoty správnosti a RSD (%) pro jednotlivé přídávky byly zprůměrovány. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 8 na konci kapitoly.

tabulka č. 8 - Stanovení správnosti

přídavek 0,38 mg				
číslo vzorku	$x_i$ (mg)	$x_v$ (mg)	$x_0$ (mg)	$R_i$ (%)
1	2,3154	1,91	0,38	106,68
2	2,3126	1,91	0,38	105,95
3	2,2864	1,91	0,38	99,05
4	2,2764	1,91	0,38	96,42
5	2,2764	1,91	0,38	96,42
6	2,2715	1,91	0,38	95,13
průměr				<b>99,94</b>
směrodatná odchylka				<b>5,10</b>
RSD (%)				<b>5,11</b>
přídavek 1,15 mg				
číslo vzorku	$x_i$ (mg)	$x_v$ (mg)	$x_0$ (mg)	$R_i$ (%)
1	3,1716	1,91	1,15	109,70
2	3,1654	1,91	1,15	109,17
3	3,0545	1,91	1,15	99,52
4	3,1655	1,91	1,15	109,17
5	3,0748	1,91	1,15	101,29
6	3,1745	1,91	1,15	109,96
průměr				<b>106,47</b>
směrodatná odchylka				<b>4,74</b>
RSD (%)				<b>4,45</b>
přídavek 1,71 mg				
číslo vzorku	$x_i$ (mg)	$x_v$ (mg)	$x_0$ (mg)	$R_i$ (%)
1	3,6845	1,91	1,71	103,77
2	3,6845	1,91	1,71	103,77
3	3,7184	1,91	1,71	105,75
4	3,7598	1,91	1,71	108,18
5	3,6418	1,91	1,71	101,27
6	3,539	1,91	1,71	95,26
průměr				<b>103,00</b>
směrodatná odchylka				<b>4,44</b>
RSD (%)				<b>4,31</b>

Hodnoty správnosti byly v rozmezí 99,94-106,47% a hodnota RSD (%) v rozmezí 4,31-5,11. Jak již bylo zmíněno výše, je možné, že vyšší hodnoty jsou způsobeny velkou nehomogenitou vzorku.

#### 4.4.2.4 Stabilita roztoku standardu

Pro stanovení stability byl použit standardní roztok amygdalinu (3.1.4.2 - příprava standardního roztoku amygdalinu). Ten byl přenesen do dvou vialek a změřen. Celkem byly provedeny tři nástřiky. Výsledky byly zprůměrovány a výsledná hodnota byla plocha píku v čase t=0. Obě vialky byly následně překryty parafilmem a poté byla jedna vialka ponechána na světle při laboratorní teplotě a druhá byla dána do lednice. Měření bylo opakováno po 24 a 48 hodinách. Vždy byl vypočítán průměr z nástřiků a hodnoty byly zaznamenány do tabulky (viz tabulka č. 9).

tabulka č. 9 - stabilita

čas (hod)	plocha píku při T=4°C	S <sub>T</sub> (%)	plocha píku při T=20°C	S <sub>T</sub> (%)
0	334960	0,00	326158	0,00
24	332969	0,59	324328	0,56
48	336315	0,40	326257	0,03

Stabilita byla hodnocena pomocí vztahu (10):

$$S_T (\%) = 100 \cdot \frac{|A_i - A_0|}{A_0} \quad (10)$$

Kde A<sub>0</sub> je plocha píku v čase 0. A<sub>i</sub> je plocha v testovaném intervalu.

Pokud je změna větší než 1%, je roztok hodnocen jako nestabilní. Z tabulky vyplývá, že roztok standardu je stabilní po dobu 48 hodin při uchování za snížené i laboratorní teplotě.

#### 4.4.2.5 Detekční a kvantitativní limit

Oba parametry byly stanoveny dle postupu uvedeného v kapitole 2.4.2 - LOD a LOQ.

Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 10.

tabulka č. 10 - detekční a kvantitativní limit

LOD [mg/10ml]	0,0015
LOQ [mg/10ml]	0,0050

#### 4.5 Extrakce a následná analýza serotoninu v doplňku stravy

Při analýze serotoninu byl použit jiný chromatograf s fluorescenčním detektorem a to UHPLC system Acquity UPLC (Waters), software Empower.

Jako způsob detekce byl použit fluorescenční detektor, důvodem použití tohoto detektoru byly předpokládané nízké hodnoty obsahu serotoninu.

#### 4.6 Validace metody pro stanovení serotoninu

##### 4.6.1 Test vhodnosti chromatografického systému

###### 4.6.1.1 Opakovatelnost analýzy

Připravený standardní roztok serotoninu (viz kapitola 3.1.4.2 - příprava roztoku standardu serotoninu) byl opakovaně dávkován na kolonu. Do tabulky byly zaznamenány plochy píků a retenční časy. Ze šesti měření byla určena směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Výpočet byl proveden pomocí programu Microsoft Excel. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 11.

tabulka č. 11 - Opakovatelnost analýzy pro serotonin

číslo měření	Retenční čas (min)	Plocha píku
1	3,64	35979
2	3,64	36540
3	3,64	36851
4	3,65	36675
5	3,65	36906
6	3,65	36490
průměr	<b>3,65</b>	<b>36573,50</b>
směrodatná odchylka	<b>0,01</b>	<b>334,48</b>
RSD (%)	<b>0,15</b>	<b>0,91</b>

Získaná data byla také dále použita pro určení účinnosti chromatografické kolony, faktoru symetrie a rozlišovací schopnost kolony.

#### 4.6.1.2 Účinnost chromatografické kolony

Byly použity tři chromatogramy z měření opakovatelnosti analýzy. Pro výpočet počtu teoretických pater byl použit vztah (2) uvedený v kapitole 2.4.1.

tabulka č. 12 - počet teoretických pater

měření	N
1	1482
2	1473
3	1525
průměr	<b>1493</b>

Účinnost chromatografické kolony byla 1493 pater

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

Ze tří chromatogramů získaných při měření opakovatelnosti analýzy, byl podle vztahu (3) v kapitole 2.4.1 vypočten faktor symetrie píku. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 13.

tabulka č. 13 - faktor symetrie píku serotoninu

měření	$A_s$
1	1,07
2	1,11
3	1,01
průměr	<b>1,06</b>

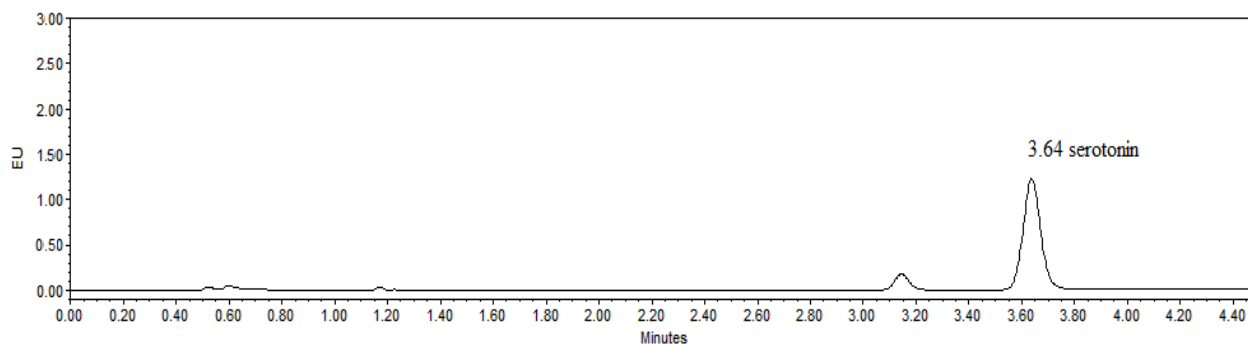
Hodnoty faktoru symetrie jsou vyhovující, protože splňují požadavek, aby hodnota byla v rozmezí 0,8 - 1,5

#### 4.6.1.4 Rozlišení ( $R_s$ )

Ze tří chromatogramů získaných při měření opakovatelnosti analýzy, byla pomocí softwaru zjištěna hodnota rozlišení ( $R_s$ ). V tabulce č. 14 jsou uvedeny výsledné hodnoty. Chromatografický záznam standardního roztoku serotoninu je uveden na obrázku č. 11.

tabulka č. 14 - Rozlišení píku serotoninu

měření	$R_s$
1	4,42
2	4,52
3	4,29
průměr	<b>4,41</b>



obrázek č. 11 - Chromatografický záznam standardního roztoku serotoninu



## 4.6.2 Validace analytické metody

### 4.6.2.1 Přesnost

Bylo připraveno šest vzorků, dle postupu uvedeného v kapitole 3.1.4.3. - příprava vzorku. Ze dvou nástřiků byl vypočítán průměr ploch píku a výsledek byl přepočítán na stejnou hmotnost (tj. 0,39 g). Výsledné hodnoty byly zaznamenány do tabulky a byly vypočteny statistické ukazatele, průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. V tabulce č. 15 jsou uvedeny výsledné hodnoty.

tabulka č. 15 - Přesnost stanovení serotoninu

vzorek číslo.	plocha píku při hmotnosti 0,39 g
1	35214
2	35358
3	36315
4	39798
5	35546
6	38665
průměr	<b>36816</b>
směrodatná odchylka	<b>1943</b>
RSD (%)	<b>5,28</b>

Relativní směrodatná odchylka byla 5,28 %. Jak již bylo zmíněno výše, vyšší hodnota relativní směrodatné odchylky může být způsobena například nehomogenitou vzorku.

### 4.6.2.2 Linearita

Linearita byla hodnocena pomocí 6 připravených kalibračních roztoků o koncentraci serotoninu 1,16 – 5,80 µg/10 ml ethanolu 96%. Každý roztok byl dvakrát dávkován na kolonu a byl vypočítán průměr. Do tabulky byly zaznamenány průměrné hodnoty ploch píků a koncentrace standardu serotoninu (viz tabulka č. 16). Z dostupných dat byla, pomocí programu Excel, vytvořena kalibrační křivka. Parametry získané kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulce č. 17 a její grafické znázornění je v příloze č. 6.

tabulka č. 16 - Linearita

koncentrace serotoninu ( $\mu\text{g}/10 \text{ ml}$ )	průměr ploch píků
1,16	18123
1,74	28456
2,32	39841
2,90	53214
3,48	65145
5,80	110123

tabulka č. 17 - Parametry kalibrační křivky pro serotonin

regresivní funkce:	$y = kx + q$
počet bodů:	6
rovnice přímký:	$y = 20028x - 5596,1$
koeficient korelace R:	0,9993

#### 4.6.2.3 Správnost

V den měření byla znovu sestrojena kalibrační křivka, která byla použita pro stanovení průměrného obsahu serotoninu v jedné kapsli o průměrné hmotnosti 0,39 g ( $x_0$ ). Pro určení správnosti byla použita metoda standardního přídávku. Byly připraveny tři standardní roztoky serotoninu o známé koncentraci. Ke vzorku bylo přidáno známé množství serotoninu uvedené v tabulce č. 18. Následně byl vzorek zpracován dle postupu uvedeného v kapitole 3.1.4.3 - příprava vzorku. Celkem bylo analyzováno osmnáct vzorků. Vždy bylo u jednotlivého přídávku zastoupeno šest vzorků. Nástřik byl proveden dvakrát a výsledné hodnoty byly zprůměrovány.

Správnost stanovení obsahu je zastoupena veličinou výtěžnost  $R_i$  (%), která byla vypočítána pomocí vztahu (9) uvedeného v kapitole 2.4.2

Výsledné hodnoty jsou uvedené v tabulce č. 18 na konci kapitoly.

tabulka č. 18 - Stanovení správnosti

přídavek 0,5 µg				
číslo vzorku	$x_i$ (µg)	$x_v$ (µg)	$x_0$ (µg)	$R_i$ (%)
1	2,9765	2,43	0,50	109,30
2	2,9045	2,43	0,50	94,90
3	2,9423	2,43	0,50	102,46
4	2,9112	2,43	0,50	96,24
5	2,9078	2,43	0,50	95,56
6	2,9656	2,43	0,50	107,12
průměr				<b>100,93</b>
směrodatná odchylka				<b>6,29</b>
RSD (%)				<b>6,23</b>
přídavek 1,5 µg				
číslo vzorku	$x_i$ (µg)	$x_v$ (µg)	$x_0$ (µg)	$R_i$ (%)
1	3,9856	2,43	1,50	103,71
2	3,8915	2,43	1,50	97,43
3	3,9615	2,43	1,50	102,10
4	4,0651	2,43	1,50	109,01
5	4,0123	2,43	1,50	105,49
6	4,0257	2,43	1,50	106,38
průměr				<b>104,02</b>
směrodatná odchylka				<b>3,99</b>
RSD (%)				<b>3,84</b>
přídavek 2,5 µg				
číslo vzorku	$x_i$ (µg)	$x_v$ (µg)	$x_0$ (µg)	$R_i$ (%)
1	4,9562	2,43	2,50	101,05
2	5,156	2,43	2,50	109,04
3	5,156	2,43	2,50	109,04
4	5,1254	2,43	2,50	107,82
5	4,856	2,43	2,50	97,04
6	4,856	2,43	2,50	97,04
průměr				<b>103,50</b>
směrodatná odchylka				<b>5,82</b>
RSD (%)				<b>5,63</b>

Hodnoty správnosti byly v rozmezí 100,93 - 104,02% a hodnota RSD (%) v rozmezí 3,84 - 6,23.

#### 4.6.2.4 Detekční a kvantitativní limit

Detekční a kvantitativní limit byl získán stejným způsobem jako v kapitole 4.4.2.5. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 19.

tabulka č. 19 - detekční a kvantitativní limit

LOD [ $\mu\text{g}/10\text{ml}$ ]	0,13
LOQ [ $\mu\text{g}/10\text{ml}$ ]	0,41

### 4.7 Stanovení obsahu amygdalinu a serotoninu v kapslích

#### 4.7.1 Obsah amygdalinu

Hodnoty získané v kapitole přesnost (4.4.2.1) byly použity pro výpočet průměrného obsahu amygdalinu v jedné kapsli. Pro výpočet byla použita rovnice kalibrační křivky získaná v kapitole linearita (4.4.2.2). Kde hodnota  $y$  byla průměr ploch píků při navážce vzorku 0,39 g a hodnota  $x$  byl obsah amygdalinu.

Průměrný obsah amygdalinu činil 2,474 mg.

#### 4.7.2 Obsah serotoninu

Naměřené hodnoty v kapitole přesnost (4.6.2.1) byly použity k výpočtu průměrného obsahu serotoninu. Výsledky byly vyhodnoceny z kalibrační křivky uvedené v kapitole 4.6.2.2 pro serotonin.

Výsledný obsah serotoninu v 0,39 g vzorku byl 2,12  $\mu\text{g}$ .

## 5 ZÁVĚR

Byla vyvinuta a validována HPLC metoda a extrakční technika pro stanovení serotoninu a amygdalinu v doplňku stravy B17 APRICARC.

Jako vhodná extrakční technika byla zvolena extrakce do 96% ethanolu. Analýza byla prováděna na koloně Ascentis® Express OH5 (3 x 100 mm, 2,7 µm). Byly stanoveny chromatografické podmínky vhodné pro analýzu. Mobilní fáze byla složena z 10 mM acetátového pufru o pH 3,8 a z acetonitrilu v poměru 10:90 (v:v). Průtoková rychlost byla 0,8 ml/min. Detekce amygdalinu byla prováděna pomocí UV detektoru (vlnová délka 215 nm) a pro detekci serotoninu byl využit fluorescenční detektor (Ex 280 nm, Em 340 nm)

Nalezené podmínky chromatografického stanovení s využitím HILIC kolony Ascentis® Express OH5 (3 x 100 mm, 2,7 µm) umožňují současné stanovení serotoninu i amygdalinu. Vzhledem k faktu, že obsah amygdalinu ve vzorku je vysoký, může být výhodné (nutné) vzorek pro stanovení amygdalinu před analýzou naředit. Naopak serotonin je v přípravku obsažen v nízkých hladinách, a proto není vhodné vzorek ředit.

Byly nalezeny parametry metod stanovení pro oba analyty. Přesnost metody pro stanovení amygdalinu byla v rozmezí 4,31-5,11 % (vyjádřeno jako relativní směrodatné odchylky měření), správnost byla 99,94-106,47%. Jako mez detekce byla stanovena koncentrace 15,0 µg/100 ml a mez stanovitelnosti 50,0 µg/100 ml. Pro serotonin byla hodnota přesnosti 3,84 - 6,23%, správnosti 100,93 - 104,02%, meze detekce 1,3 µg/100 ml a meze stanovitelnosti 4,1 µg/100ml.

Tato práce byla zaměřena na práci s HILIC kolonami, cílem bylo mimo jiné sledovat chování analytů za různých podmínek separace. Byla zjištěna závislost retenčního času a obsahu vodné fáze, čím vyšší byl obsah vodné fáze, tím nižší byla retence analytů. Bylo zjištěno, že chování serotoninu na koloně bylo více ovlivněno složením mobilní fáze než u amygdalinu.

HILIC kolony jsou výhodné pro tento typ analýz svými chromatografickými vlastnostmi, avšak jejich životnost je výrazně nižší než u standardních kolon typu C18. Je proto nutné zvážit, zda je výhodnější pro daný analytický problém použít levnější kolonu typu C18 s vyšší životností, která ale nemá tak výhodné vlastnosti pro některé typy analytů (například pro serotonin), nebo dražší kolonu s nižší životností, zato však s výhodnějšími vlastnostmi. Pro stanovení analytů, jako je serotonin je použití HILIC kolon výhodné, protože není třeba používat jiné metody pro potlačení nežádoucího chování serotoninu na koloně (chvostování na kolonách typu C18).

## 6 SEZNAM ZKRATEK

- AcAm = ammonium acetate  
= octan amonný
- EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid  
= ethylendiamintetraoctová kyselina
- HILIC = hydrophilic interaction liquid chromatography  
= chromatografie hydrofilních interakcí
- LOD = limit of detection  
= limit detekce, neboli mez detekce
- LOQ = limit of quantification  
= limit kvantifikace, neboli mez stanovitelnosti
- MS = mass spectrometry  
= hmotnostní spektrometrie
- NPLC = normal phase liquid chromatography  
= chromatografie na systému normálních fází
- RPLC = reverse phase liquid chromatography  
= chromatografie na systému reverzních fází
- SPE = solid phase extraction  
= extrakce na tuhé fázi
- RSD = relative standard deviation  
= relativní směrodatná odchylka
- UHPLC = ultra high performance liquid chromatography  
= ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003
- [2] ŠVEC, František. Co dnes hýbe Kapalinovou chromatografií?. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, č. 103, s. 266-270.  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_04\\_266-270.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_04_266-270.pdf)
- [3] Ascentis Express HPLC Columns with Fused-Core Technology: Extreme Performance on Any LC System. *Sigma-aldrich.com* [online]. [cit. 2014-09-16].  
Dostupné z: [http://www.lsc.gr/attachments/file/ascentis\\_express.pdf](http://www.lsc.gr/attachments/file/ascentis_express.pdf)
- [4] SÝKORA, David a kol. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2007, č. 101, s. 190-199.  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007\\_03\\_190-199.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_03_190-199.pdf)
- [5] VACEK, Jan a kol. Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2009, č. 103, s. 381-385.  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009\\_05\\_381-385.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_05_381-385.pdf)
- [6] JANDERA, P. HILIC chromatografie: Perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *CHEMagazín: časopis pro chemicko-technologickou a laboratorní praxi*. Pardubice: Ing. Miloslav Rotrekl, 2011, XXI, č. 2.
- [7] NOVÁKOVÁ, Lucie a DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, Michal Douša, 2013, 299 s.
- [8] LÄMMERHOFER, Michael. HILIC and mixed-mode chromatography: The rising stars in separation science. *Journal of Separation Science*. 2010, vol. 33, 6-7, s. 679-680.
- [9] PERIAT, Aurélie et al. Advances in hydrophilic interaction liquid chromatography for pharmaceutical analysis. *Chromatographyonline.com* [online]. 2013 [cit. 2014-10-19].  
Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/advances-hydrophilic-interaction-liquid-chromatography-pharmaceutical-analysis>
- [10] Ascentis® Express OH5, 2.7µm HPLC Columns. *Sigma-aldrich.com* [online]. [cit. 2015-11-09].  
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=110860770>



- [11] *Vhodnost analytických metod pro daný účel: laboratorní příručka pro validaci metod a související činnosti*. 1. vyd. Editor Miloslav Suchánek. Praha: Eurachem-ČR, c1999, iii, 61 s. Kvalimetrie, 9. ISBN 80-901-8687-4.
- [12] *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, 1176 s. ISBN 978-802-4729-947.
- [13] ŠABARTOVÁ, Jitka. Kontrolní metody: Validace analytických metod v kontrole léčiv. *Věstník SÚKL*. Praha: Státní ústav pro kontrolu léčiv, [1994], 6 - 8.
- [14] FUKUDA, Toshiyuki et al. Anti-tumor Promoting Effect of Glycosides from *Prunus persica* Seeds. *Biological*. 2003, vol. 26, issue 2, s. 734-735
- [15] KALAČ, Pavel. Amygdalin, laetril a alternativní léčba rakoviny. *Výživa a potraviny: časopis Společnosti pro výživu*. Praha: Výživaservis s. r. o., 2012, č. 3.
- [16] BOLARINWA, Islamiyat F. et al. Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK. *Food Chemistry*. 2014, č. 152, s. 133-139.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613016245>
- [17] American Chemical Society, SciFinder, Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2015 ACD/Labs)
- [18] OPLETAL, Lubomír a kol. Přírodní látky hořké chuti. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2007, č. 101, s. 895-906.  
Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007\\_11\\_895-906.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_11_895-906.pdf)
- [19] Kyanovodík. INFORMAČNÍ CENTRUM MINISTERSTVA ZEMĚDĚLSTVÍ. *Bezpecnostpotravin.cz* [online]. [cit. 2015-02-10].  
Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92521.aspx>
- [20] CHANG, Hyun-Kyung et al. Armeniacaee semen Extract Suppresses Lipopolysaccharide-Induced Expressions of Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase in Mouse BV2 Microglial Cells. *Biological*. 2005, vol. 28, issue 3, s. 449-454.
- [21] JIAGANG, Deng et al. Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice through the induction of regulatory T cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, vol. 411, issue 3, s. 523-529.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X11011752>
- [22] KHAGHANI, Shahnaz et al. Amygdalin inhibits angiogenesis in the cultured endothelial cells of diabetic rats. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2012, vol. 55, issue 2, s. 211-214.

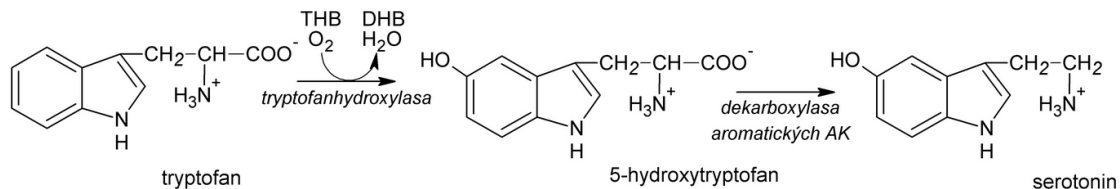
- [23] 5-Hydroxytryptamine. CHEMICAL SYNTHESIS DATABASE. *ChemSynthesis: Chemical database* [online]. 2008-2015 [cit. 2015-04-06].  
Dostupné z: <http://www.chemsynthesis.com/base/chemical-structure-1513.html>
- [24] HUANG, Xin et al. Simultaneous analysis of serotonin, melatonin, piceid and resveratrol in fruits using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011, vol. 1218, issue 25, s. 3890-3899.
- [25] AKULA, Ramakrishna et al. Phytoserotonin. *Plant Signaling*. 2011, vol. 6, issue 6, s. 800-809.
- [26] BRAD, I. et al. Characterization Of Sea Buckthorn Fruits And Copses In Terms Of Serotonin And Microelements. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 2007, roč. 1, November 30.
- [27] BATOOL, Farhat et al. Oral Supplementation of Sea Buckthorn (*Hippophae Rhamnoides* L. Spp. *Turkestanica*) Fruit Extract Modifies Haloperidol Induced Behavioral Deficits and Increases Brain Serotonin Metabolism. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2009, roč. 17, č. 4, s. 257-263.
- [28] B17 APRICARC s meruňkovým olejem 50 kapslí+10 kapslí ZDARMA. *Celostnimedica.cz: informační server o zdraví* [online]. [cit. 2015-02-11].  
Dostupné z: <http://www.celostnimedica.cz/produkty/b17-apricarc-s-merunkovym-olejem.html>
- [29] B17 APRICARC s meruňkovým olejem. *TEREZIA COMPANY* [online]. [cit. 2015-02-11].  
Dostupné z: [http://www.terezia.eu/cz/produkt/b17\\_apricarc\\_s\\_merunkovym\\_olejem](http://www.terezia.eu/cz/produkt/b17_apricarc_s_merunkovym_olejem)
- [30] BOLARINWA, Islamiyat F. et al. Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. *Food Chemistry*. 2015, vol. 170, s. 31-51.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614013077>
- [31] WANG, Tao et al. Separation and purification of amygdalin from thinned bayberry kernels by macroporous adsorption resins. *Journal of Chromatography B*. 2015, vol. 975, s. 52-58.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023214006795>
- [32] LI, Xiaobing et al. A sensitive LC–MS/MS method for simultaneous determination of amygdalin and paeoniflorin in human plasma and its application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, vol. 92, s. 160-164.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708514000272>
- [33] CHANG, Jun and Yan ZHANG. Catalytic degradation of amygdalin by extracellular enzymes from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. 2012, vol. 47, issue 2, s. 195-200.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511311003874>

- [34] SÁNCHEZ-PÉREZ, Raquel et al. Influence of the pollinizer in the amygdalin content of almonds. *Scientia Horticulturae*. 2012, vol. 139, s. 62-65.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423812001033>
- [35] KOO, Ja-Yong et al. Quantitative determination of amygdalin epimers from armeniacaee semen by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2005, vol. 814, issue 1, s. 69-73.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023204008116>
- [36] CRUMEYROLLE-ARIAS, Michèle et al. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2014, roč. 42, s. 207-217.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306453014000390>
- [37] SZYMAŃSKA, Krystyna et al. Phenotypic features of children with neurodevelopmental diseases in relation to biogenic amines. *Respiratory Physiology*. 2014.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569904814003310>
- [38] BENEDETTO, Giuseppe Egidio De et al. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014, vol. 98, s. 266-270.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708514002878>
- [39] ANTKIEWICZ-MICHALUK, Lucyna et al. Withdrawal from repeated administration of a low dose of reserpine induced opposing adaptive changes in the noradrenaline and serotonin system function: A behavioral and neurochemical ex vivo and in vivo studies in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2015, vol. 57, s. 146-154.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584614002000>
- [40] UMEDA, Sumiyo et al. A reverse-phase HPLC and fluorescence detection method for measurement of 5-hydroxytryptamine (serotonin) in Planaria. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005, vol. 51, issue 1, s. 73-76.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056871904000607>
- [41] RESTUCCIA, Donatella et al. Brewing effect on levels of biogenic amines in different coffee samples as determined by LC-UV. *Food Chemistry*. 2015, vol. 175, s. 143-150.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461401872X>

- [42] TANG, Ya-Bin et al. Simultaneous determination of the repertoire of classical neurotransmitters released from embryonal carcinoma stem cells using online microdialysis coupled with hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2014, vol. 849, s. 70-79.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267014010769>
- [43] PETTEYS, Brian J. et al. Performance characteristics of an LC–MS/MS method for the determination of plasma metanephrines. *Clinica Chimica Acta*. 2012, vol. 413, 19-20, s. 1459-1465.  
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898112003087>
- [44] Přeměna aminokyselin na specializované produkty. [online]. [cit. 2015-02-14].  
Dostupné z: <http://dl1.cuni.cz/mod/page/view.php?id=174291>

## 8 PŘÍLOHY

příloha č. 1 - Schéma vzniku serotoninu z esenciální aminokyseliny tryptofan [44]



příloha č. 2 - naměřené parametry separace pro různé složení mobilní fáze

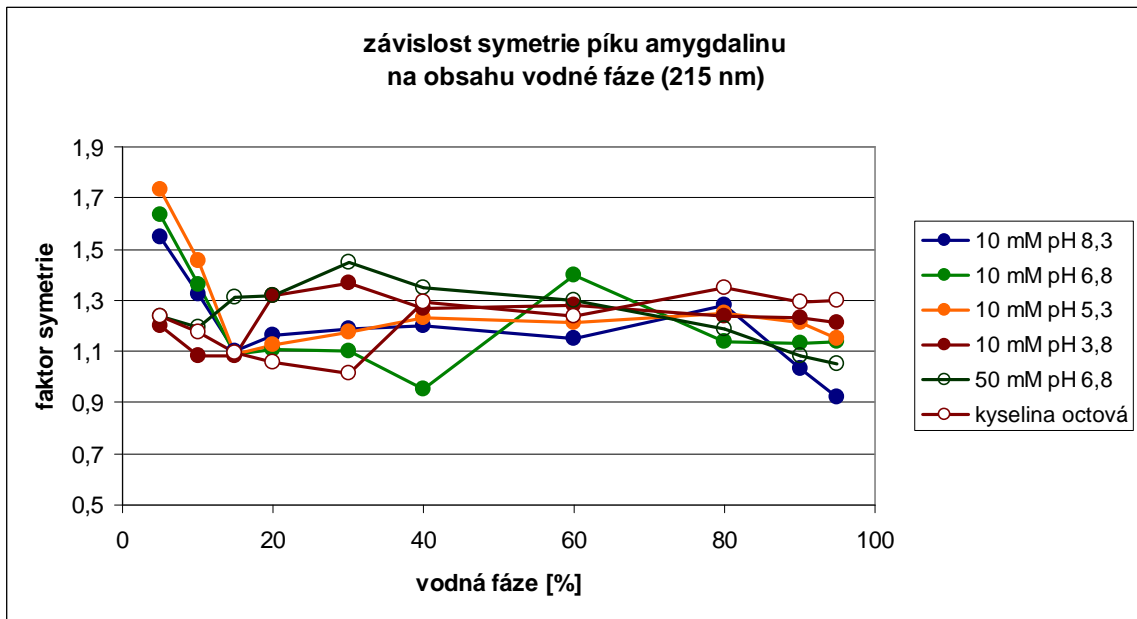
	SEROTONIN		AMYGDALIN	
vodná fáze* (10mM AcAm pH 6,8)	retenční faktor [min]	faktor symetrie při 215 nm	retenční faktor [min]	faktor symetrie při 215 nm
5	-	-	7,54	1,64
10	7,37	0,79	2,97	1,36
15	2,83	0,81	1,55	1,09
20	1,73	0,83	1,11	1,11
30	1,10	1,30	0,79	1,10
40	0,82	1,32	0,65	0,95
60	0,93	1,44	0,63	1,4
80	0,98	1,48	0,63	1,14
90	1,14	1,43	0,67	1,13
95	1,32	1,5	0,69	1,14
vodná fáze* (10mM AcAm pH 5,3)	retenční faktor [min]	faktor symetrie při 215 nm	retenční faktor [min]	faktor symetrie při 215 nm
5	-	-	8,16	1,74
10	7,17	0,82	3,02	1,46
15	2,80	0,85	1,62	1,09
20	1,69	0,91	1,17	1,13
30	1,10	1,14	0,79	1,18
40	0,95	1,35	0,84	1,23

60	0,98	1,36	0,88	1,21
80	1,01	1,38	0,91	1,25
90	1,03	1,35	0,95	1,21
95	1,1	1,32	0,93	1,15
<b>vodná fáze* (10mM AcAm pH 8,3)</b>	<b>retenční faktor [min]</b>	<b>faktor symetrie při 215 nm</b>	<b>retenční faktor [min]</b>	<b>faktor symetrie při 215 nm</b>
5	-	-	7,37	1,55
10	6,65	0,83	2,83	1,33
15	2,81	0,88	1,54	1,10
20	1,63	0,90	1,09	1,17
30	1,02	1,32	0,79	1,19
40	1,2	1,42	0,83	1,2
60	1,52	1,5	0,84	1,15
80	2,03	1,46	0,82	1,28
90	2,83	1,41	0,88	1,03
95	3,6	1,41	0,92	0,92
<b>vodná fáze* (10mM AcAm pH 3,8)</b>	<b>retenční faktor [min]</b>	<b>faktor symetrie při 215 nm</b>	<b>retenční faktor [min]</b>	<b>faktor symetrie při 215 nm</b>
5	20,71	0,91	6,15	1,20
10	4,18	0,90	2,59	1,09
15	1,83	1,01	1,48	1,08
20	1,18	1,15	1,08	1,32
30	0,77	1,41	0,79	1,37
40	0,64	1,25	0,64	1,27
60	0,62	1,26	0,64	1,28
80	0,64	1,24	0,65	1,24
90	0,68	1,24	0,64	1,23
95	0,67	1,28	0,67	1,21
<b>vodná fáze* (50mM AcAm pH 6,8)</b>	<b>retenční faktor [min]</b>	<b>faktor symetrie při 215 nm</b>	<b>retenční faktor [min]</b>	<b>faktor symetrie při 215 nm</b>
5	15,34	1,05	6,41	1,24
10	3,26	1,17	2,38	1,20

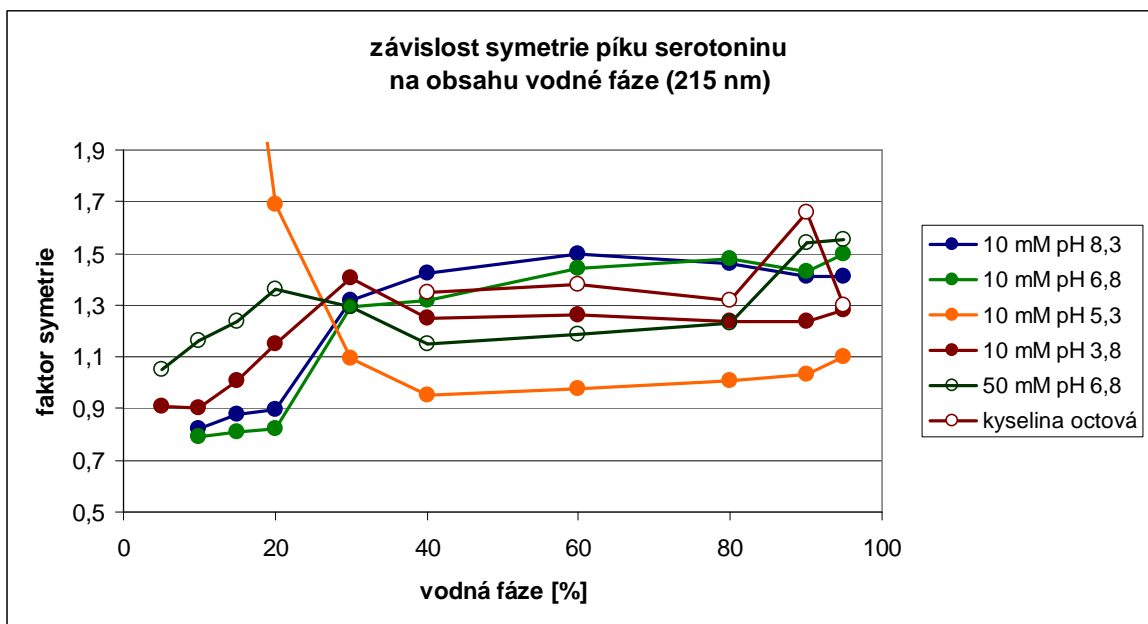
15	1,73	1,24	1,40	1,31
20	1,23	1,36	1,03	1,32
30	0,89	1,30	0,78	1,45
40	0,75	1,15	0,63	1,35
60	0,76	1,19	0,63	1,3
80	0,82	1,23	0,63	1,19
90	0,9	1,54	0,67	1,08
95	0,98	1,55	0,69	1,05
vodná fáze* kyselina octová	retenční faktor [min]	faktor symetrie při 215 nm	retenční faktor [min]	faktor symetrie při 215 nm
5	x	x	6,50	1,24
10	x	x	4,49	1,18
15	x	x	2,52	1,10
20	x	x	2,01	1,06
30	x	x	1,52	1,02
40	0,62	1,35	0,81	1,29
60	0,64	1,38	0,82	1,24
80	0,62	1,32	0,83	1,35
90	0,63	1,66	0,83	1,29
95	0,64	1,3	0,85	1,3

\* -obsah vodné fáze v použité mobilní fázi - v %

Příloha č. 3 - závislost symetrie píku amygdalinu na obsahu vodné fáze

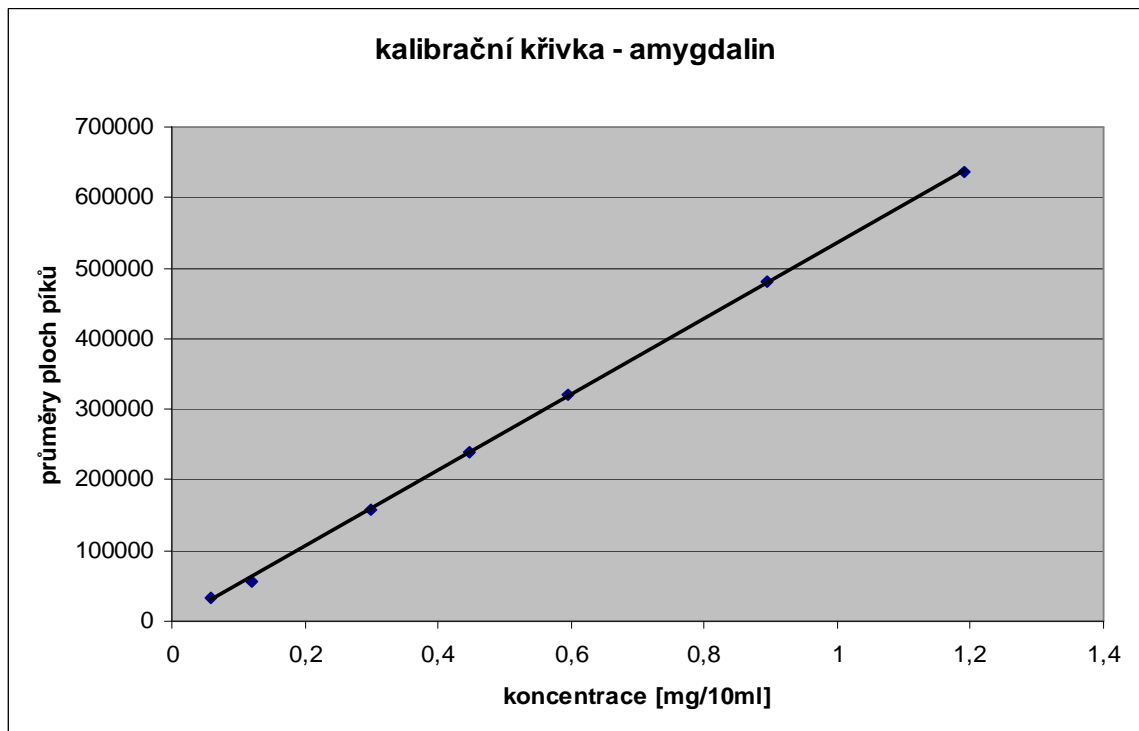


příloha č. 4 - závislost symetrie píku serotoninu na obsahu vodné fáze

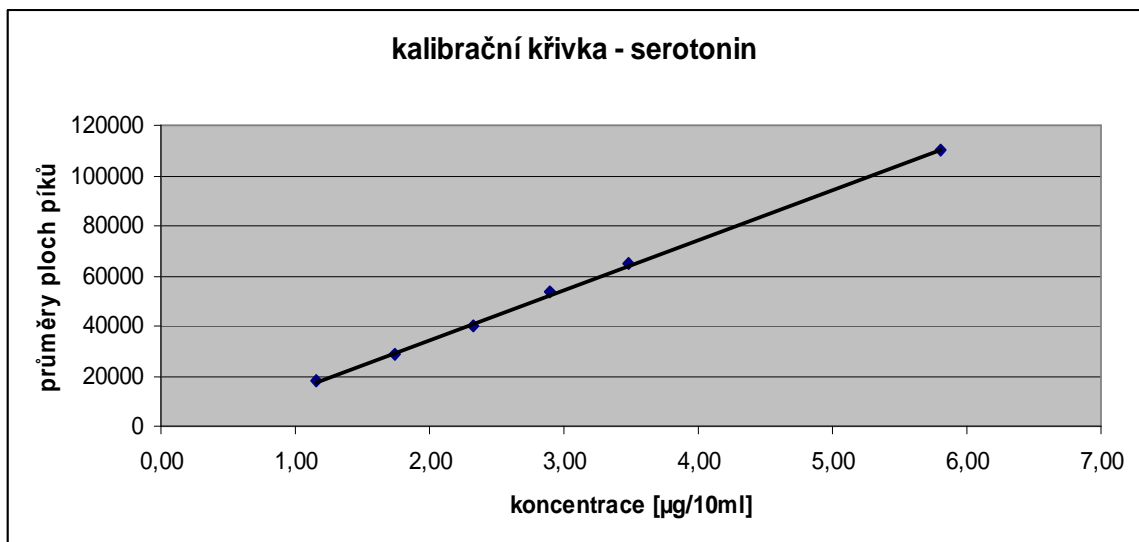




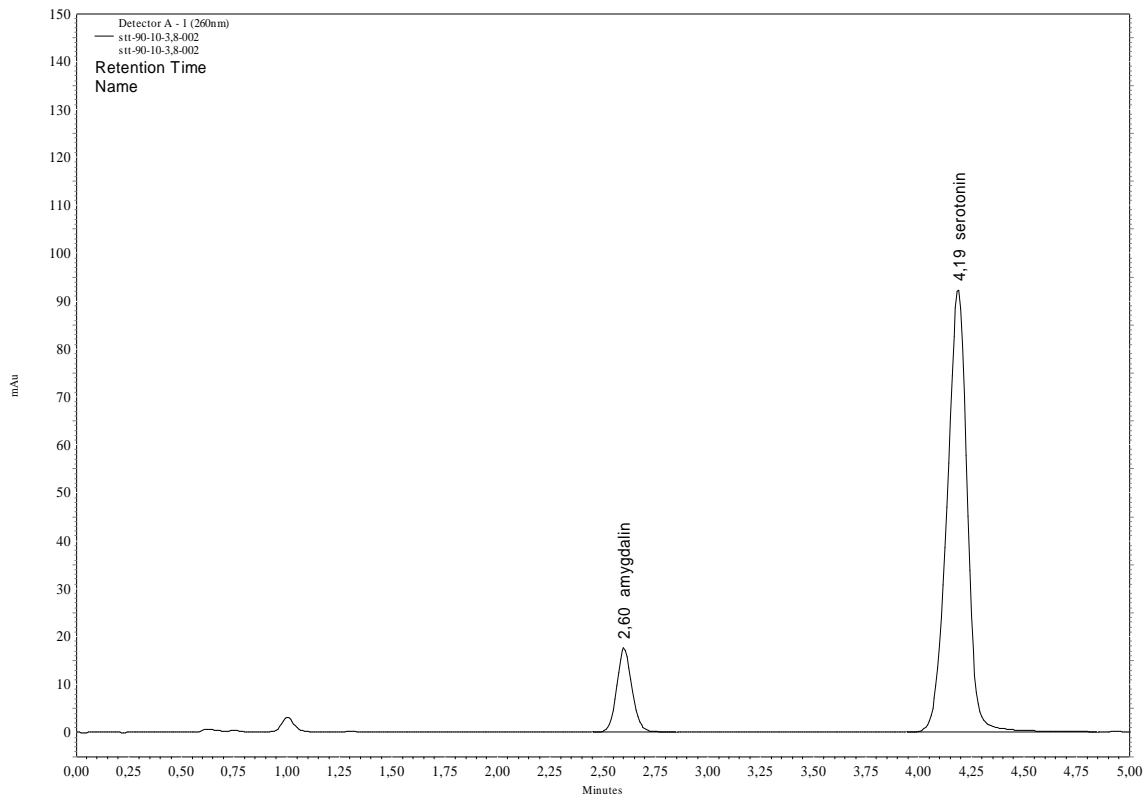
příloha č. 5 - kalibrační křivka pro amygdalin



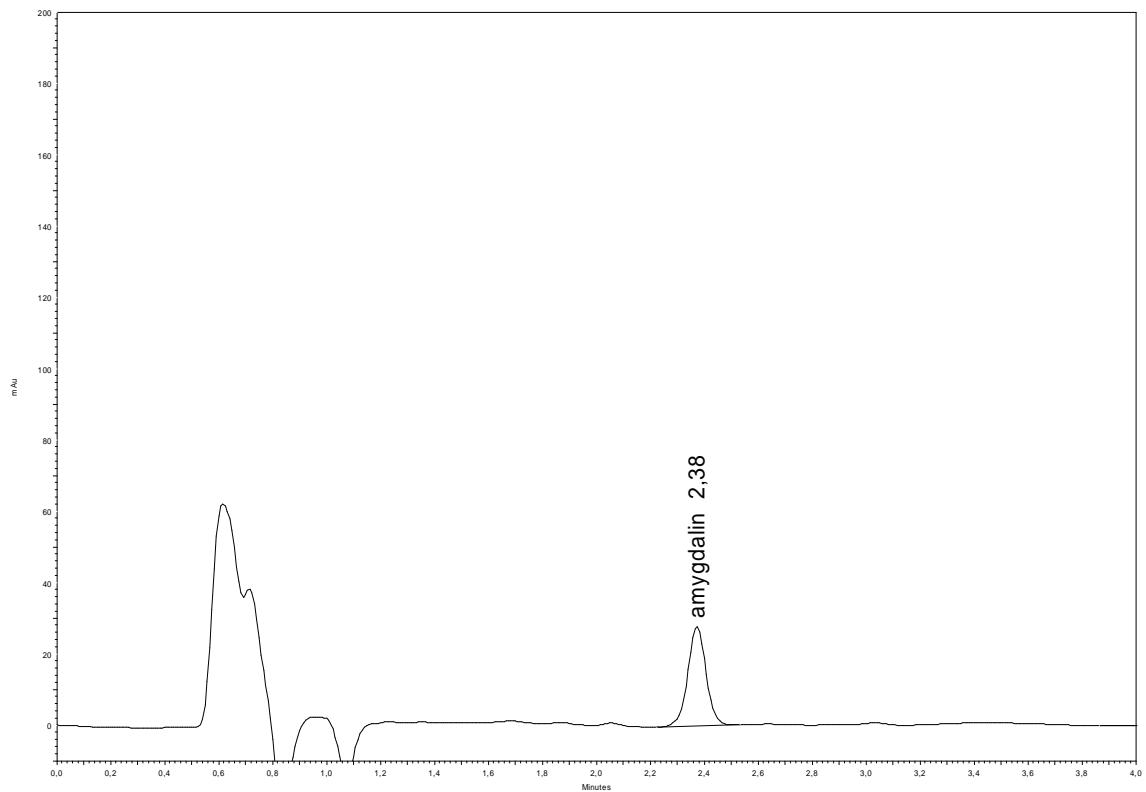
příloha č. 6 - kalibrační křivka pro serotonin



příloha č. 7 - Chromatografický záznam analýzy standardního roztoku obsahujícího amygdalin a serotonin, složení mobilní fáze 10 mM octan amonný o pH 3,8 : acetonitril (10:90 v:v), nastavení UV/VIS detektoru na 215 nm



příloha č. 8 - Chromatografický záznam analýzy vzorku, při určování přesnosti metody stanovení obsahu amygdalinu



příloha č. 9 - Chromatografický záznam analýzy vzorku, při určování přesnosti metody stanovení obsahu serotoninu

