

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



Diplomová práce

**Kontrola kvality potravních doplňků na bázi melatoninu pomocí
separačních metod**

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

Hradec Králové 2023

Natálie Chalupníková

Prohlášení

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

V Hradci Králové, dne

Natálie Chalupníková

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce prof. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a cenné rady, čímž významnou měrou přispěl k dokončení této práce. Dále bych chtěla poděkovat přátelům a celé mé rodině za nenahraditelnou podporu v průběhu celého studia na vysoké škole.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Natálie Chalupníková

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

Název diplomové práce: Kontrola kvality potravních doplňků na bázi melatoninu pomocí separačních metod

V této diplomové práci byla vyvinuta a validována HPLC metoda pro současné stanovení melatoninu a pyridoxinu. Vypracovaná metoda byla aplikována na stanovení v potravních doplňcích, Tozax Sleep Trip (mcePharma s. r. o.), Clinical Melatonin B₆ sirup (Clinical nutricosmetics s. r. o.), Fast Sleep ústní sprej s melatoninem (EmergoPharm Sp. z o. o. Sp. K.), Melatonin Rapid komplex 5 mg ODT (Salutem Pharma s. r. o.), Allegra Melatonin 3 mg (Woykoff a. s.), Clinical Melatonin Forte (Clinical nutricosmetics s. r. o.), Melatonin 2 mg (Allnature s. r. o.), Melatonin new extra 5 mg (Nutricius s. r. o.), Clinical Melatonin B₆ Gummies (Clinical nutricosmetics s. r. o.).

Metoda byla založena na využití chromatografické kolony SUPELCO Ascentis Express C-18 (100*4,6 mm, velikost částic 2,7 μm). Separace probíhala za gradientové eluce s využitím mobilní fáze acetonitril a 0,085% kyselina fosforečná při pH 2,2, průtokové rychlosti 1 ml/min a konstantní teplotě 30°C.

Pro detekci melatoninu byla zvolena vlnová délka 278 nm a 290 nm pro pyridoxin. Samotná detekce probíhala za použití detektoru diodového pole.

Klíčová slova: melatonin, pyridoxin, HPLC, potravní doplňky

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Natálie Chalupníková

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

Title of the diploma thesis: Quality control of food supplements with melatonin using separation methods

In this diploma thesis, an HPLC method was developed and validated for the simultaneous determination of melatonin and pyridoxine. The developed method was applied to the determination in food supplements, Tozax Sleep Trip (mcePharma s. r. o.), Clinical Melatonin B₆ syrup (Clinical nutricosmetics s. r. o.), Fast Sleep oral spray with melatonin (EmergoPharm Sp. z o. o. Sp. K.), Melatonin Rapid complex 5 mg ODT (Salutem Pharma s. r. o.), Allegra Melatonin 3 mg (Woykoff a. s.), Clinical Melatonin Forte (Clinical nutricosmetics s. r. o.), Melatonin 2 mg (Allnature s. r. o.), Melatonin new extra 5 mg (Nutricius s. r. o.), Clinical Melatonin B₆ Gummies (Clinical nutricosmetics s. r. o.).

The method was based on the use of a SUPELCO Ascentis Express C-18 chromatography column (100*4.6 mm, particle size 2.7 μm). The separation was carried out under gradient elution, using a mobile phase of acetonitrile and 0.085% phosphoric acid at pH 2.2, flow rate 1 ml/min and constant temperature 30°C.

A detection wavelength of 278 nm was chosen for melatonin and 290 nm for pyridoxine. The detection was performed using a diode array detector.

Keywords: melatonin, pyridoxine, HPLC, food supplements

Obsah

1	Seznam použitých zkratk	9
2	Úvod	10
3	Cíl a zadání práce	12
4	Teoretická část	13
4.1	Melatonin	13
4.1.1	Výskyt a definice	13
4.1.2	Vlastnosti a využití	15
4.1.3	Informace pro spotřebitele při užití	17
4.2	Pyridoxin	19
4.2.1	Vlastnosti a využití	20
4.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	21
4.3.1	Charakteristika HPLC	21
4.3.2	Princip HPLC	22
4.3.3	Popis kapalinového chromatografu	22
4.3.4	Chromatografické kolony	24
4.4	Rešerše stanovení melatoninu a vitamínu skupiny B ₆	29
5	Experimentální část	33
5.1	Použité přístroje a pomůcky	33
5.1.1	Přístroje	33
5.1.2	Kolona	33
5.1.3	Pomůcky	33
5.2	Použité chemikálie	34
5.2.1	Standardy	34
5.2.2	Testované vnitřní standardy	34
5.2.3	Rozpouštědla	34
5.3	Testované vzorky	35
5.3.1	Doplňky stravy	35
5.4	Deklarovaný obsah melatoninu a vitamínu B ₆ v testovaných potravních doplncích	36
5.5	Příprava mobilní fáze	37
5.6	Příprava roztoků standardů	37
5.6.1	Příprava zásobních roztoků standardů	37
5.6.2	Příprava pracovních roztoků standardů	37
5.6.3	Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu	37
5.6.4	Příprava roztoku pro test vhodnosti chromatografického systému	38

5.6.5	Příprava roztoku pro opakovatelnost	38
5.6.6	Příprava roztoků pro kalibraci	38
5.6.7	Příprava roztoku pro stanovení parametru přesnosti.....	39
5.6.8	Příprava standardů a vzorků pro stanovení parametru správnosti	39
5.7	Příprava analyzovaných vzorků dostupných na trhu v ČR	40
5.7.1	Příprava vzorků ve formě sirupu Clinical Melatonin B ₆	40
5.7.2	Příprava vzorků ve formě spreje Fast Sleep	40
5.7.3	Příprava vzorků ve formě bonbónů Clinical Melatonin B ₆ gummies	41
5.8	Parametry měření	41
5.9	Parametry hodnocení metody	42
6	Výsledky a diskuze.....	43
6.1	Vývoj analytické metody, optimalizované parametry	43
6.1.1	Optimalizace metody	43
6.1.2	Volba vlnové délky	43
6.1.3	Volba složení mobilní fáze.....	45
6.1.4	Volba vnitřního standardu	51
6.1.5	Volba vhodného gradientu a chromatografické kolony	51
6.1.6	Shrnutí optimálního nastavení pro HPLC analýzu	58
6.2	Validace vyvinuté metody za finálních podmínek.....	60
6.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému.....	60
6.2.2	Linearita.....	60
6.2.3	Opakovatelnost	64
6.2.4	Přesnost.....	66
6.2.5	Správnost.....	67
6.3	Stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích	68
6.3.1	Stanovení obsahu potravního doplňku Tozax Sleep Trip	70
6.3.2	Stanovení obsahu potravního doplňku Clinical Melatonin B ₆ sirup.....	71
6.3.3	Stanovení obsahu potravního doplňku Fast Sleep s melatoninem.....	72
6.3.4	Stanovení obsahu potravního doplňku Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex.....	73
6.3.5	Stanovení obsahu potravního doplňku Allegra Melatonin	74
6.3.6	Stanovení obsahu potravního doplňku Clinical Melatonin Forte	75
6.3.7	Stanovení obsahu potravního doplňku Allnature Melatonin.....	76
6.3.8	Stanovení obsahu potravního doplňku Nutricius Melatonin new extra	77
6.3.9	Stanovení obsahu potravního doplňku Clinical Melatonin B ₆ Gummies.....	78
6.4	Souhrn stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích.....	79

7	Závěr	80
8	Seznam obrázků a tabulek.....	83
8.1	Seznam obrázků	83
8.2	Seznam tabulek	86
9	Seznam použité literatury	88

1 Seznam použitých zkratek

AANAT	arylalkylamin <i>N</i> -acetyltransferáza
ACN	acetonitril
ADHD	attention deficit hyperactivity disorder
As	faktor symetrie
A _{st}	plocha píku standardu
A _{vz}	plocha píku vzorku
B ₆	pyridoxin
DAD	diode array detector
DS	doplněk stravy
GPx	glutathionperoxidáza
GTR	glutathionreduktáza
HIOMT	hydroxyindol <i>o</i> -methyltransferáza
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
H ₃ PO ₄	kyselina fosforečná
k	kapacitní faktor
MEL	melatonin
MeOH	methanol
PTFE	polytetrafluorethylen
RA	revmatoidní artritida
Rs	rozlišení
RSD	relativní směrodatná odchylka
Rt	retenční čas
SD	směrodatná odchylka
SOD	superoxiddismutáza
W _h	šířka píku v poloviční výšce

2 Úvod

Melatonin je hormon produkován epifýzou. Je nazýván převážně jako hormon spánku, který produkuje lidské tělo zejména v noci. Má příznivý vliv vést k lepšímu spánku a přispívá také ke zlepšení nálady a pocitu spokojenosti (1).

Pyridoxin je vitamín rozpustný ve vodě, který spadá do skupiny vitamínu B₆ spolu s deriváty pyridoxaminem, pyridoxalem. Obecně spadá do skupiny vitamínů, které si člověk nedokáže sám syntetizovat a je potřebný v malých množstvích pro normální metabolismus (2). Vitamín B₆ je nezbytný v organismu pro funkci řady různých enzymů, které metabolizují aminokyseliny jako například dekarboxylázy nebo transaminázy, a také pro rozklad a upotřebení cukrů, bílkovin a tuků z potravy. Zásadní je i pro normální funkci kůže a centrální nervové soustavy, tvorbu červených krvinek i protilátek a přeměnu zásobních cukrů ve svalech a játrech na energii. Jeho nedostatek je celkem vzácný, ale projevuje se hlavně zvýšenou nervosvalovou dráždivostí jako například křeče nebo cukání víček a také záněty sliznice dutiny ústní.

Vitamín B₆ se přirozeně vyskytuje například v játrech, špenátu, avokádu, bramborech, banánu, vepřovém mase, vejci, droždí. Pro osoby, které potřebují větší přísun B₆ jako například ženy, jež užívají hormonální antikoncepci, sportovci, kteří potřebují vyšší přísun bílkovin, jsou na trhu dostupné doplňky stravy, které obsahují větší množství pyridoxinu. Vyšší dávky mají schopnost i přispívat k léčbě chudokrevnosti či nervovým potížím (2).

Doplňkem stravy se rozumí potravina, která má za účel doplňovat běžnou stravu, která je obohacená o vysoký obsah vitamínů, minerálních látek nebo jiných látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem a má za účel příznivě ovlivnit zdravotní stav. Uvádějí se na trh samostatně nebo v kombinaci, a to v různých lékových formách jako například ve formě sypké, jako tobolky, pastilky, tablety, v lahvičkách s kapátkem či v jiném dávkovacím zařízení, a to určených k příjmu v malých odměřených množstvích. Potravní doplňky jsou určeny pouze k doplnění běžné stravy ne k léčbě, jak je definováno podle nařízení EU z roku 2006.

Účinky deklarované výrobcem nejsou ověřovány, protože u potravních doplňků není posuzována jejich účinnost (3) (4).

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je analytická separační metoda, která je jedna z nejpreferovanějších technik pro stanovení obsahu léčiv a kontrolu kvality potravních doplňků. Předností této metody je současné kvalitativní a kvantitativní hodnocení, rychlost analýzy, možnost automatizace a minimální spotřeba vzorku.

V této diplomové práci byla vyvinuta HPLC metoda pro současné stanovení melatoninu a pyridoxinu v doplňcích stravy deklarujících jejich obsah. HPLC separační metodou bylo analyzováno množství jednotlivých látek v přípravcích Tozax Sleep Trip, Clinical Melatonin B₆ sirup, Fast Sleep ústní sprej, Melatonin Rapid komplex 5 mg ODT, Allegra Melatonin 3 mg, Clinical Melatonin Forte, Allnature Melatonin 2mg, Melatonin new extra 5 mg, Clinical Melatonin B₆ Gummies. V experimentální části je uveden postup optimalizace metody, výsledné optimální podmínky a rovněž i validační parametry a obsah jednotlivých deklarovaných látek stanovených vyvinutou metodou.

3 Cíl a zadání práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout, optimalizovat a poté validovat novou chromatografickou metodu pro analýzu potravních doplňků na bázi melatoninu. Mezi stanovované látky patřil jako hlavní složka melatonin a v některých přípravcích i deklarovaný pyridoxin. Vyvinutá separační metoda byla dále aplikována pro ověření kvality a deklarovaného obsahu stanovovaných látek v devíti potravních doplňcích dostupných v kamenných lékárnách v České republice i na internetových obchodech. Cílem bylo zjistit, jakou koncentraci stanovovaných látek vybrané přípravky obsahují, a zda se v nich nevyskytují ještě nějaké jiné látky než deklarované na obalu.

4 Teoretická část

4.1 Melatonin

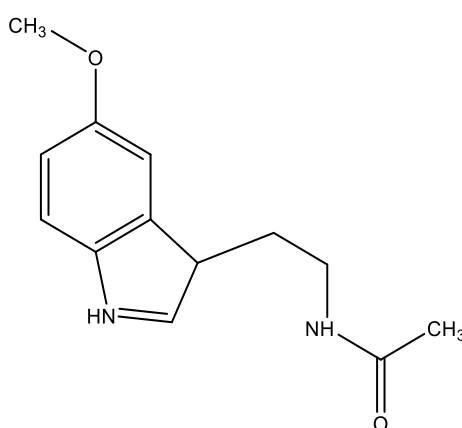
4.1.1 Výskyt a definice

Sumární vzorec $C_{13}H_{16}N_2O_2$

Registrační číslo CAS 73-31-4

Molární hmotnost 232,28 g/mol (5)

Vzhled: světlý bílý prášek



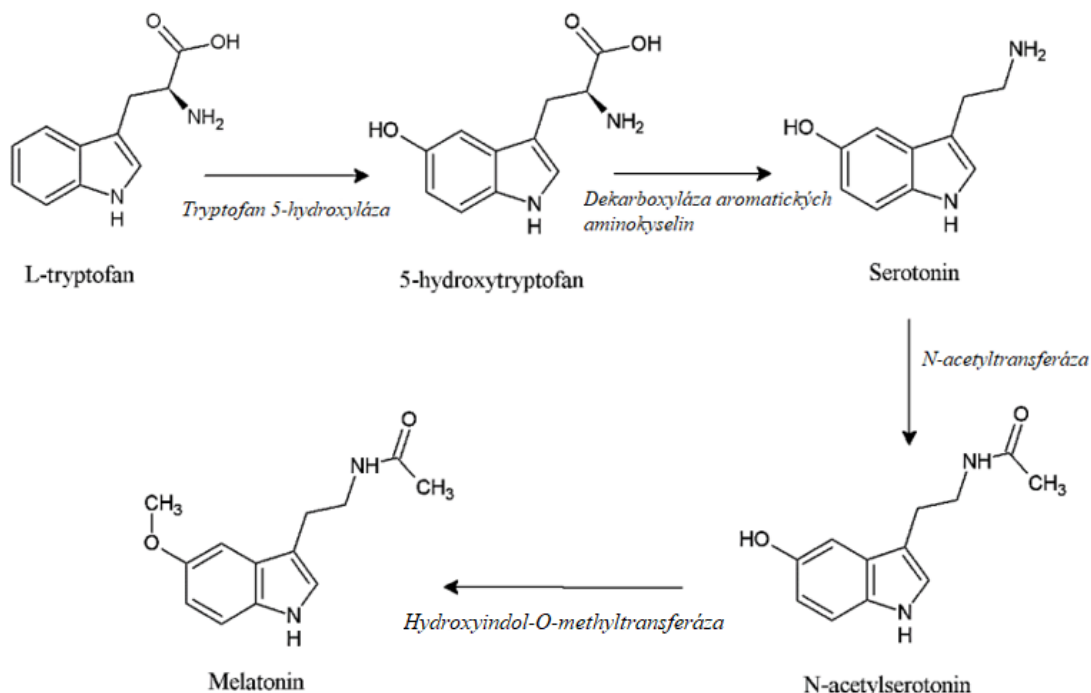
Obrázek 1: Molekulový vzorec melatoninu.

Melatonin, jehož systematický název je *N*-[2-(5-methoxy-1*H*-indol-3yl)ethyl]acetamid nebo 5-methoxyacetyltryptamin, byl poprvé izolovaný v roce 1958 dermatologem Aaronem B. Lernerem a jeho kolegy (6). Jedná se o indolamin obsahující dvě funkční skupiny, které jsou rozhodující pro vazbu k receptoru, ale také pro svou amfifilitu, která dává molekule schopnost vstoupit do jakéhokoliv buněčného kompartmentu jako je cytosol, jádro nebo mitochondrie či do tělesné tekutiny. Vykazuje též vysokou rozpustnost v tucích, což usnadňuje, že melatonin snadno přechází difúzí z periferního oběhu do jiných tekutin nebo buněk. V séru je 70 % hormonu vázáno na transportní bílkovinu albumin a 30 % difunduje do okolních tkání (7).

Jedná se o fyziologický hormon, jehož hlavním místem produkce je epifýza, podílí se na řízení cirkadiálních rytmů, tj. střídání spánku a bdělosti během 24-hodinových cyklů. Melatonin je distribuován ale i v jiných orgánech (sítnice, placenta, ledviny, respirační a gastrointestinální trakt).

Hormon je syntetizovaný z aminokyseliny L-tryptofanu, a to převážně během nočních hodin. Sérové hladiny melatoninu se v průběhu lidského života mění. Výsledky studií prokazují nízkou endogenní sekreci melatoninu v prvních 6 měsících života, při 1–3 roku života dosahují vrcholu, a poté následuje pokles v populaci od 15 do 20 let, což je přisuzováno pravděpodobně zvětšení velikosti těla během dětství a puberty. Další pokles je zaznamenán v dospělosti až do věku 70–90 let, a to bývá přisuzováno degenerativní epifýze spojené se stárnutím (8).

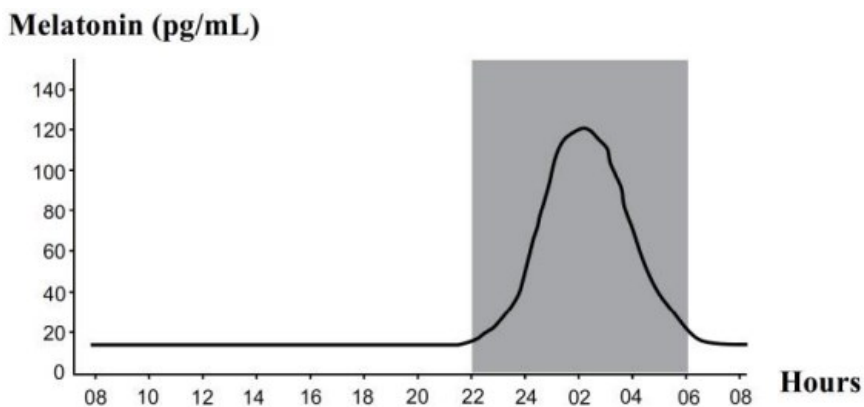
Při biosyntéze dochází nejprve k hydroxylaci aminokyseliny L-tryptofan, poté dekarboxylaci na serotonin (5-hydroxytryptamin). Dále dvoustupňovým procesem zahrnující sekvenční aktivity dvou enzymů, které se nacházejí hlavně v epifýze přeměňují serotonin na melatonin. Dochází tu k acetylaci arylalkylamin *N*-acetyltransferázou (AANAT) a poté k následné methylaci pomocí hydroxyindol *o*-methyltransferázou (HIOMT) na samotný melatonin. Po syntéze se melatonin uvolňuje do systémové cirkulace, aby dosáhl do centrální a periferní cílové tkáně (9).



Obrázek 2: Schéma syntézy melatoninu z aminokyseliny L-tryptofan (obrázek převzat z zdroje (10)).

Syntéza a sekrece hormonu je zesílena tmou, a naopak inhibována světlem. Do hypotalamu se přes suprachiasmatické jádro přenáší ze sítnice do epifýzy světelné informace. U lidí sekrece dosahuje vrcholu v noci (mezi 2. a 4. hodinou ránní)

a postupně klesá během druhé poloviny noci (viz obrázek 3). Sérové koncentrace se pohybují mezi 80 a 120 pg/ml. Během denního světla jsou sérové koncentrace nízké (10–20 pg/ml) (11).



Obrázek 3: Cirkadiánní profil plazmatických koncentrací melatoninu (obrázek převzat ze zdroje (9)).

4.1.2 Vlastnosti a využití

Melatonin je znám v použití při neschopnosti usnout, pásmové nemoci, úpravě cyklů spánku (práce na směny), nespavosti po léčích na vysoký krevní tlak ze skupiny beta-blokátorů, nebo naopak pomoc při přerušení benzodiazepinových léčiv. Nespavost je spojená s poruchou pozornosti jako je ADHD, pomoc u nevidomých lidí vytvořit denní a noční cyklus, a pro pomoc při vedlejších účincích při ukončování kouření. Občasné použití je zmíněno i u Alzheimerovy choroby, depresi nebo například na uklidnění před aplikací anestezie (12).

Spekuluje se o tom, že melatonin údajně působí proti nádorovému bujení. Tento účinek, ale zatím nebyl dostatečně prokázán, ačkoliv některé studie ho potvrdily, ale další ho zase vyvracejí. Účinek by se zřejmě mohl projevit jen při farmakologických dávkách a souviset by mohl se schopností hormonu zbavovat organismus volných radikálů s nepárovým valenčním elektronem, které mohou dlouhodobě poškozovat například nukleové kyseliny nebo bílkoviny jakožto velké molekuly (13).

Dostupný je buď jako potravní doplněk, nebo lék na předpis. Obvykle se syntetizuje v laboratoři a vyrábí se v několika lékových formách – želatinové tobolky, tablety, dispergované tablety, spreje, sirupy nebo pektinové bonbóny. Hlavním úkolem melatoninu v těle je regulovat noční a denní cykly nebo cykly spánku a bdění (12).

Melatonin byl také zjištěn v potravinách a nápojích včetně džusů, vína, piva, jogurtů a chleba (14).

Významné poruchy spánku postihují v současné době nejméně 10 % západní populace a více než jedna třetina trpí poruchou spánku nebo nadměrnou denní ospalostí (15).

Většina fyziologických funkcí melatoninu je zprostředkována pomocí membránových melatoninových receptorů (MT1, MT2), v menší míře pomocí jaderných receptorů (7). Tyto heterotrimerní receptory spřažené s proteinem Gi/Go a Gq/11, interagují s downstream messengery, jako je adenylcykláza, fosfolipáza C a fosfolipáza A2. Obecně snižují produkci cAMP a cGMP a/nebo zvyšují tvorbu IP3 a diacylglycerolu. Receptory MT1 a MT2 jsou přítomné skoro ve všech periferních tkáních a také v centrálním nervovém systému (16).

4.1.2.1 Antioxidační účinky

Melatonin disponuje silnou antioxidační aktivitou, je silný lapač volných radikálů, silnější než vitamín E, který je v této oblasti referenční, také má schopnost chránit DNA před poškozením volnými radikály. In vitro melatonin účinkuje jako přímý lapač kyslíkových radikálů $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2^-\cdot$ a reaktivních dusíkatých druhů $\text{NO}\cdot$ a inhibuje peroxidaci lipidů (9).

Hormon zvyšuje hladiny několika antioxidačních enzymů včetně glutathionperoxidázy (GPx), glutathionreduktázy (GTR) a superoxidodismutázy (SOD). Kromě toho má také schopnost inhibovat prooxidativní enzym syntézu oxidu dusnatého (17). Melatonin ovlivňuje enzymatickou aktivitu a hladiny buněčné mRNA těchto proteinů za fyziologických a oxidačních podmínek. Koncentrace hormonu pro up-regulaci exprese genu enzymu odpovídá fyziologickému nočnímu vrcholu plazmatického melatoninu, zatímco vyšší koncentrace genovou expresi neovlivňuje. Antioxidační účinek nízkých koncentrací melatoninu se zdá být nepřímý prostřednictvím regulace exprese genu GPx a antioxidační aktivity, zatímco při vysoké koncentraci je účinek připisován přímým účinkům pohlcování radikálů (7).

Byl prokázán přínos antioxidační aktivity melatoninu u pacientu s revmatoidní artritidou (RA), u starších pacientů s primární esenciální hypertenzí a u žen s neplodností. Avšak u pacientů s revmatoidní artritidou neexistuje žádná shoda o příznivých účincích, ale uvádí se, že je hormon promotorem RA díky schopnosti působit jako imuno-modulační činidlo a stimulátor uvolňování prozánětlivých cytokinů (7).

4.1.2.2 Imunitní systém

Je známo, že melatonin interaguje s imunitním systémem, avšak bylo provedeno malé množství studií určených k posouzení účinnosti melatoninu při léčbě onemocnění. Předpokládá se, že pozitivní imunologický účinek, a to jakýkoliv je zapříčiněn působením melatoninu na vysoce afinitní membránové receptory MT1 a MT2 exprimované v imunokompetentních buňkách (7).

4.1.3 Informace pro spotřebitele při užití

4.1.3.1 Opatření

- Nepodávat dětem do 18 let.
- U lidí s onemocněním ledvin, jater nebo autoimunním onemocněním se poradit s lékařem/lékárníkem před užitím přípravku s melatoninem.
- Kuřákům se může snížit účinnost přípravku, kvůli zrychlenému rozkladu melatoninu v játrech, které zapříčiní složky tabákového kouře.
- Alkohol snižuje účinnost melatoninu.
- V průběhu těhotenství či kojení se přípravky s melatoninem nedoporučují.
- Možné lékové interakce se mohou naskytnout například u léčiv s: estrogenem, fluvoxaminem, warfarin, benzodiazepiny či nebenzodiazepinová hypnotika, chinolony a rifampicin, imipramin, thioridazin. Při užití léčiva se zmiňovanou účinnou látkou taktéž konzultovat s lékařem (18).

4.1.3.2 Užití

- Nezávisle na jídle, avšak je doporučeno 2 hodiny před a 2 hodiny po užití nejíst.
- Načasování je důležité – doporučenou denní dávku je nutné užít před ulehnutím a zapít vodou (18).

4.1.3.3 Možné nežádoucí účinky

U pásmové nemoci byly hlášeny možné nežádoucí účinky jako denní ospalost, dezorientace, bolest hlavy, závratě či pocit na zvracení a ztráta chuti k jídlu (18) (19).

Mezi hlášené nežádoucí účinky spadá:

Tabulka 1: Nežádoucí účinky melatoninu (18) (19).

méně časté nežádoucí účinky	vzácné nežádoucí účinky
bolest na hrudi, sucho v ústech, nauzea, bolest břicha, dermatitida, noční pocení	závratě, mdloby, ztráta vědomí, vnímání srdečního tepu, silné bolesti na hrudi při angině pectoris, podrážděnost, žízeň

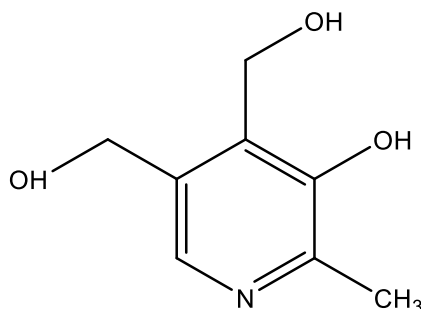
4.2 Pyridoxin

Sumární vzorec $C_8H_{11}NO_3$

Registrační číslo CAS 65-23-6

Molární hmotnost 169,18 g/mol (20)

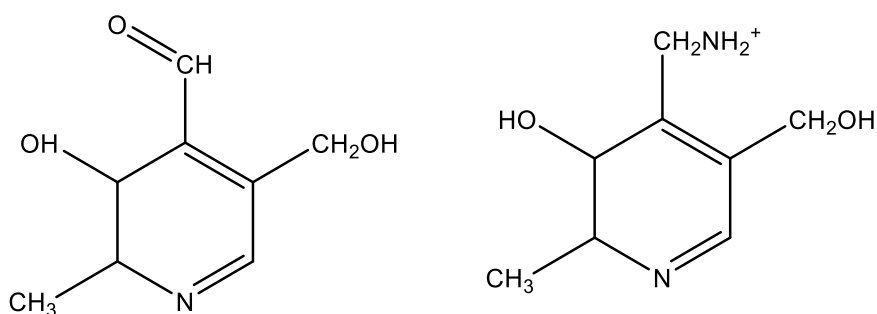
Vzhled: světlý bílý prášek



Obrázek 4: Molekulový vzorec pyridoxinu.

Pyridoxin jakožto vitamín B₆ je v této skupině spolu s dalšími deriváty a to pyridoxaminem, pyridoxalem a fosforylovanými deriváty každé z těchto sloučenin, které jsou aktivními metabolity. Základem všech derivátů je pyridinový kruh, liší se pouze různými funkčními skupinami. Pyridoxin má v poloze 4 a 5 pyridinového kruhu umístěné hydroxymethyl skupiny, v druhé poloze methyl a poloze 3 alkoholovou skupinu. Souhrnný systematický název je 4,5-bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-3-ol. Pyridoxal se vyznačuje zejména svou karbaldehydovou funkční skupinou a nese systematický název 3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-4-karbaldehyd a pyridoxamin 4-(aminomethyl)-5-(hydroxymethyl)-2-methylpyridin-3-ol. Metabolismus pyridoxinu probíhá v játrech, kde dochází k převodu na jeho aktivní formu a to pyridoxin 5-fosfát. Aktivní forma je následně katabolizována na kyselinu 4-pyridoxovou, která se vylučuje močí. Jeho role v organismu je důležitá také pro funkci řady různých enzymů, které metabolizují aminokyseliny jako například dekarboxylázy nebo transaminázy, také pro rozklad a upotřebení cukrů, bílkovin a tuků z potravy (21) (2) (22).

Zdroje pyridoxinu i pyridoxaminu se nacházejí zejména v rostlinných potravinách, zatímco pyridoxal je odvozen častěji ze živočišných potravin. Například v zelenině (brambor, mrkev, špenát, kapusta), ořechy, maso, vejce i obiloviny (2).



Obrázek 5: Molekulový vzorec pyridoxalu (vlevo) a pyridoxaminu (vpravo).

4.2.1 Vlastnosti a využití

Vitamíny skupiny B₆ jsou distribuovány převážně v lékových formách pro orální podání, ale vyskytuje se i forma injekční. Pyridoxin je indikován k léčbě či prevenci při nedostatečném příjmu ve stravě, při vrozených poruchách metabolismu jako například anémie reagující na pyridoxin či křeče závislé na pyridoxinu nebo při užívání léků (perorálních kontraceptiv či isoniazidu). Off-label (tzn. užití přípravku, způsobem, který není v souladu se souhrnem údajů o přípravku) použití má pyridoxin při nauze a zvracení při těhotenství, při otravě ethylenglykolem nebo také například při neurologické toxicitě spojenou s předávkováním isoniazidem, který se využívá na léčbu tuberkulózy (23).

Nedostatek je vzácný, ale prvotními projevy je glositida, dermatitida, nespecifická stomatitida, podrážděnost, zmatenost, periferní neuropatie či deprese. Při vrozené chybě metabolismu pyridoxinu se projevují refrakterní neonatální záchvaty při epilepsii, za kterou může právě tato chyba. Může docházet i k seboreické dermatitidě či mikrocytární anémii, které se ale projevují až při závažném nedostatku vitamínu B₆. Za nedostatek můžou i některé užívané léky, kvůli interferenci s metabolismem pyridoxinu jako je penicilamin, isoniazid, levodopa/karbidopa či hydralazin (23) (2) (24).

Doporučené denní dávky vitamínu B₆:

Tabulka 2: Doporučené denní dávky vitamínu B₆ (2).

dítě	0,5–1 mg/den
mladiství	1,3 mg/den
muž <50 let	1,7 mg/den
žena <50 let	1,5 mg/den

V případě předávkování nad 250 mg/den jsou hlášeny nežádoucí účinky jako nevolnost a zvracení, neurologické problémy či alergické kožní reakce (2). Docházet může také k poškození funkce krevních destiček a mechanismu srážení, ale tyto účinky mohou být způsobeny hyperhomocysteinemií zaznamenanou u těchto pacientů (25).

4.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

4.3.1 Charakteristika HPLC

HPLC (high performance liquid chromatography) je analytická separační metoda, která spadá mezi nejprogresivnější metody a v posledních desetiletích doznává značného rozvoje a inovací zejména v oblasti instrumentace, detekce a stacionárních fází. HPLC metody lze vhodně uplatnit při analýze široké škály složitých vzorků, ve kterých je sledováno více analytů současně – např. syntetizovaná látka a její nečistoty, léčivo a rozkladné produkty nebo metabolity, kontrola kvality potravních doplňků, multi-residuální environmentální analýzy atp. (26). Dále se HPLC využívá například v oblasti farmaceutické analýzy, kde je technika nezbytným metodickým nástrojem ve všech oblastech při výzkumu, vývoji i výrobě léčiv či léčivých přípravků, a to i po uvedení léčivého přípravku na trh.

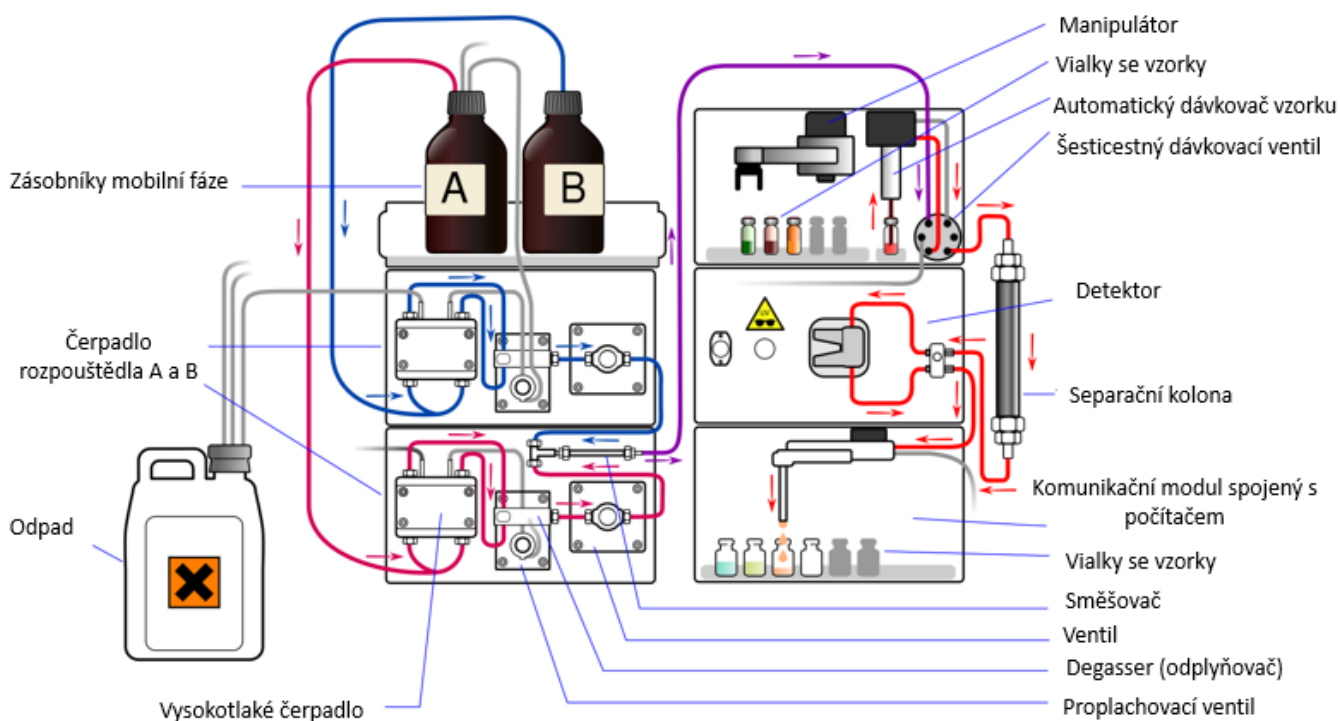
Rozsáhlé uplatnění nalézá i ve studii metabolismů léčiv v organismu, kdy umožňuje sledovat farmakokinetiku léčiv a hladin metabolitů (27).

Mezi hlavní přednosti metody náleží to, že umožňuje kvalitativní i kvantitativní hodnocení separovaných složek směsi, rychlost analýzy a citlivost stanovení (v závislosti na použitém detektoru), možnost automatizace, minimální množství vzorku, selektivita a univerzálnost (28).

4.3.2 Princip HPLC

Jedná se o fyzikálně-chemickou metodu, při které dochází k oddělení složek analyzované směsi na chromatografické koloně, naplněné sorbentem v důsledku jejich nestejně rychlého putování tzn. migrace určitým směrem. Migrace probíhá mezi mobilní (pohyblivou) fází, ve které je analyzovaná složka rozpuštěna a s ní prochází za vysokého tlaku kolonou a mezi stacionární (nepohyblivou) fází, která disponuje velkým povrchem, kterou je kolona naplněna. Molekuly analytu jsou odseparovány na základě odlišné interakce mezi těmito dvěma fázemi (27). Kapalinová chromatografie je tedy založena na mobilní kapalně fází a využívá základní principy separace látek ze směsi a to absorpční, iontovýměnné, gelové i rozdělovací chromatografie. Uspořádání fází je častěji obrácené (reverzní), ale může být i normální upřádaní (26).

4.3.3 Popis kapalinového chromatografu



Obrázek 6: Schéma a popis HPLC systému (obrázek převzat a upraven ze zdroje (71)).

Základní součásti systému jsou popsány na obrázku 6. Ze zásobníků je čerpána mobilní (pohyblivá) fáze do vysokotlakého čerpadla. Vysoký tlak je důležitý vzhledem k náplni kolon, která je tvořena malými sférickými částicemi. Zásobníky mohou obsahovat různé kapaliny, z nichž se skládá výsledná mobilní fáze. Při isokratické eluci mobilní fáze může mít po celou dobu analýzy složení stejné, přičemž je i její eluční síla při analýze stejná. V opačném případě vysokotlaká čerpadla a směšovač mohou zajistit v čase analýzy měnící se složení mobilní fáze, a tudíž se s rozdílným složením mění i její eluční síla, která se obvykle zvyšuje kvůli zvýšení podílu méně polární složky a snížení podílu polární složky. Toto umožňuje dosáhnout co nejlepšího rozlišení analyzovaných látek, a zároveň zkrátit dobu analýzy na časově přijatelnou. Tato analýza se označuje jako gradientová eluce (29). Před přívodem do kolony prochází mobilní fáze degasserem, jenž zajistí odstranění všech rozpuštěných plynů z kapaliny, které by mohly ovlivnit kontinuální průtok kolonou a tím způsobit tlakovou pulsaci. Odplynění je možné mobilní fázi probublávat héliem, a to buď před začátkem, nebo i v průběhu celé analýzy. Důležitá je dokonalá plynulost toku mobilní fáze pro detekci, aby se zamezilo šumu v odezvě detektoru. Následně směšovač dostatečně smísí používané mobilní fáze.

Na vstupu do kolony je dávkovač, který provádí nástřik analyzovaného vzorku buď manuálně využitím mikrostříkačky, nebo automatizovaně. V rámci automatizace v současné době převažuje užití autosampleru. Hlavní součástí automatického dávkovače je obvykle šesticečný otočný ventil, který je opatřen dávkovací smyčkou definovaného objemu. Při plnění je z vialky nasáván vzorek prostřednictvím injektoru, kterým je naplněna dávkovací smyčka, a přitom protéká mimo tuto smyčku mobilní fáze. Šesticestný ventil se poté otočí do pozice, kdy protéká mobilní fáze smyčkou, který s sebou unáší i vzorek, jenž je tímto způsobem dávkován na chromatografickou kolonu (27) (30). Před analytickou kolonou může a nemusí být nainstalovaná předkolona, která má ochrannou funkci a chrání kolonu před možnými nečistotami ze vzorku či mobilní fáze (29). Chromatografická kolona je v dnešní době většinou kovová, konstruována z nerezové oceli pro vysoké tlaky, uložena v termostatovém prostoru, který má za úkol udržovat konstantní teplotu během celé analýzy. Kolísání teploty může negativně ovlivnit opakovatelnost retenčních časů a tím i selektivitu analýzy. K výstupu z kolony je připojen detektor, kam putuje mobilní fáze unášející vzorek, a probíhá detekce jednotlivých látek (31). Zde probíhá kvantitativní a kvalitativní

hodnocení jednotlivých separovaných analytů ze vzorku. Ovládání je plně pod kontrolou počítače a chromatografického softwaru, který slouží ke sběru a poté ke zpracování dat (27) (30).

4.3.4 Chromatografické kolony

Analytická kolona je základní součástí HPLC systému. Náplň je stacionární fáze, která je umístěna ve formě sloupce v koloně, kterou protéká mobilní fáze, čímž je umožněno dosažení samotné separace (32). Kolona naplněná sorbentem zodpovídá za účinnost, selektivitu a dohromady s parametry kolony (délka, průměr a velikost částic) za rychlost analýzy. V současné době mají nejčastěji kolony trubicové pouzdro z nerezové oceli, popřípadě plastové. Trubice mají obvykle délku 5–25 cm, vnitřní průměr 2,1–5 mm a velikost částic 1,5–10 μm (30).

Náplň tvořená sorbentem je uvnitř kolony uzavřena za pomoci frit. Kolonu lze chránit předkolonou, která je umístěna samostatně před ní a má za funkci zachytávat zejména nečistoty ze vzorků a mobilní fáze, a v případě poškození ji lze snadno vyměnit. Využívá se například při analýze biologických materiálů a prakticky se jedná o kratší kolonku (10–20 mm) se stejným typem stacionární fáze (33).

Chromatografické separace jsou založeny na povrchových interakcích sorbentu a analytu, při nichž závisí na typech interakčních míst. Sorbent může přímo sloužit jako stacionární fáze nebo může být modifikovaný vhodnou stacionární fází, jako např. silikagel modifikovaný delšími alkylovými řetězci. Dle uspořádání sorbentu kolony rozdělujeme na kolony s malými částicemi tzn. náplňové nebo monolitické s velkou plochou povrchu. Dle polaritě stacionární fáze na normální a reverzní (34).



Obrázek 7: Chromatografická kolona SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm .

(obrázek převzat ze zdroje (35)).

4.3.4.1 Náplňové kolony

Jsou tvořeny malými (1,5–5 μm), kulatými částicemi. Částice mají na povrchu velké množství pórů, což jim uděluje poměrně velký adsorpční povrch, na kterém probíhá separace. Dále čím jsou částice menší, tím vytvářejí větší odpor vůči toku mobilní fáze. Podle povahy se částice dělí na porézní, perfúzní, pelikulární a částice s pevným jádrem (33).

Tabulka 3: Náplňové kolony – rozdělení dle charakteru částic (33).

Porézní částice	Vhodné pro nástřik malého množství analytu, kvůli velkému povrchu. Velikost v rozmezí 1,5–5 μm . Nejrozšířenější.
Perfúzní částice	Vhodné pro práci při nízkých tlacích, kvůli většímu průměru částic – 10 μm . Při separaci makromolekul v preparativním měřítku.
Pelikulární částice	Vhodné pro separaci makromolekul, obsahují pevné jádro obalené velmi tenkou vrstvou stacionární fáze. Průměr v rozmezí 1,5–2,5 μm .
Částice s pevným jádrem	Tvořeny pevným jádrem obaleným vrstvou sorbentu (0,25–0,5 μm). Analyt neproniká do jádra, čímž dochází k efektivnější interakci analytu s oběma fázemi a tím se zvýší účinnost separace.

4.3.4.2 Monolitické kolony

Vyznačují se odlišnou strukturou v porovnání s náplňovými kolonami. Obsahují speciální silikagel, popřípadě úplně jiný materiál, který není tvořen částicemi, ale jedním kusem monolitického porézního materiálu, který zcela zaplňuje vnitřek separační kolony. Monolitické kolony mají dva druhy pórů – menší a větší póry (36).

Menší póry se nazývají mezopóry a obvykle mají 12 nm, zvětšují účinný povrch sorbentu pro separaci, čímž umožňují dosažení velmi dobré separační účinnosti naplněných chromatografických kolon (36).

Větší póry tzv. makropóry (1–2 μm) zajišťují rychlý konvektivní tok mobilní fáze skrz monolit a zrychlují přenos hmoty mezi oběma fázemi (37).

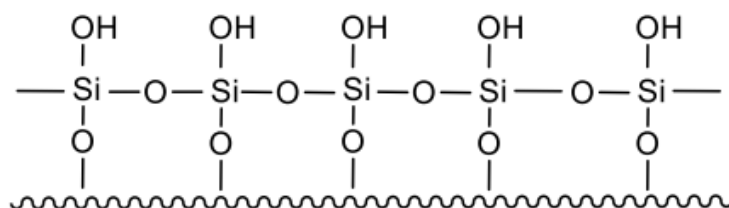
Podle chemické podstaty a způsobu přípravy se mohou monolitické stacionární fáze dělit na anorganické, makroporézní polymerní a stlačitelné (komprimované gely) monolity.

Velkou výhodou monolitických kolon jsou jejich hydrodynamické vlastnosti. Částicové kolony mají výbornou separační účinnost, ale se snižující se velikostí sorbentu stoupá zpětný tlak a maximální rychlost průtoku je omezená. U monolitických kolon je možné používat násobně vyšší průtoky než u částicových (37).

4.3.4.3 Základní materiály využívané pro výrobu sorbentů

a) Silikagelové stacionární fáze

- silikagel nejpoužívanější materiál s mechanickou odolností
- výroba umožňuje přesně definovaný průměr částic a velikost pórů
- obsahuje snadno modifikovaný povrch, který je pokryt silanolovými skupinami
- nízká stabilita při pH 2–7 (ale dnes jsou dostupné kolony s hybridním silikagelem, který je stabilní i při použití mobilní fáze s vyšší hodnotou pH), teplota do 60 °C, mechanická odolnost do 35–40 MPa (37) (33) (38)



Obrázek 8: Schéma znázornění povrchu silikagelu (obrázek převzat ze zdroje (33)).

b) Stacionární fáze na bázi organických polymerů

- makroporézní struktury polymerů vykazují velký adsorpční povrch, stabilitu pH 1–14 a teplotní stabilitu do 200 °C ale jsou omezeny maximálním tlakem na koloně do 20 MPa
- nevýhoda fází je závislost účinnosti na organické složce mobilní fáze
- nejčastěji využívaný zesíťovaný polystyren, substituované polyvinylalkoholy a methakryláty, které umožňují jednoduchou modifikaci povrchu (33) (36) (39)

c) Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého

- místo silanolových skupin jsou zde přítomny adsorpční centra Lewisových kyselin – 3 reaktivní místa na povrchu oxidu zirkoničitého, a proto je nutné při separaci mobilní fáze pufrovat
- vysoce chemicky i fyzikálně odolný (pH 1–14, do 200 °C)
- nesráží se, neobtná vlivem organické složky mobilní fáze
- kolona má dlouhou životnost, vysokou mechanickou odolnost, vysokou účinnost separace (36) (40)

d) Stacionární fáze na bázi dalších kovových oxidů

- v menší míře používané – oxid hlinitý a oxid titaničitý (33)

e) Stacionární fáze na bázi porézního grafitového uhlíku

- skládá se z grafitových proužků
- vysoce inertní materiál, stabilní v širokém rozmezí pH 1–14, teplota do 200 °C (40)

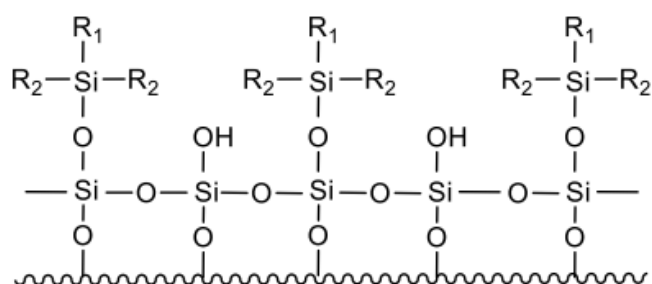
f) Hybridní stacionární fáze

- kombinace organické složky a silikagelu jako komplexní částice
- nemodifikovaný silikagel nebo silikagel modifikovaný polárními skupinami – nejčastěji kyano-, amino-, amido-, diolovými skupinami
- lze použít silikagel modifikovaný hydrofilním polymerem (polysulfoethylen či polyhydroxyethylen)

- výhody pro separační činnosti: široká pH stabilita, vyšší efektivita a mechanická účinnost než u polymerů (41) (42)

g) Modifikované stacionární fáze

V současnosti se nejčastěji využívá stacionární fáze na bázi silikagelu, která je vhodně modifikovaná. Modifikace probíhá reakcí organosilanu s povrchově silanolovými skupinami, které jsou nahrazeny nejčastěji nepolární skupinou (33).



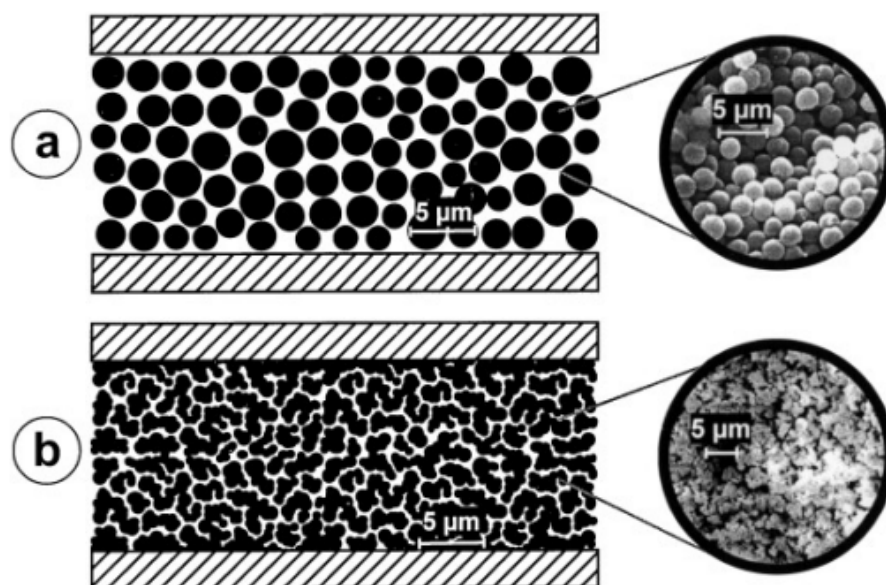
Obrázek 9: Modifikace povrchových silanolových skupin (obrázek převzat ze zdroje (33)).

Dle typu ligandů navázaných na povrch má stacionární fáze různý charakter:

Tabulka 4: Charaktery modifikovaných stacionárních fází (34).

Charakter	Příklady připojených ligandů	Použití
polární	-OH, -CN, -NH ₂ , -NO ₂	normální mod adsorpční chromatografie
nepolární	-C8, -C18, amidová fáze, fenyl, alkyl- a aryl- fluorované fáze	reverzní mod
středně polární	-NH ₂ , -CN	v obou modech – normální i reverzní chromatografie
iontový	-COO ⁻ kationtový měnič, NH ₄ ⁺ aniontový iontoměnič	iontovýměnná chromatografie
chirální	chirální selektor	

Reálně lze modifikovat maximálně polovinu silanolových skupin, a to kvůli stérickému bránění už navázané objemné skupiny, která neumožňuje modifikaci ostatních přilehlých silanolových skupin. Volné nemodifikované silanoly jsou přístupné pro interakce s analytem a mobilní fází (vodíkové vazby, iontově-výměnné, dipól-dipólové interakce), což zapříčiní negativní ovlivnění separace – stoupající retence, chvostování píků polárních, zejména bazických látek. Možné řešení je tzv. „endcapping“. Jde o přídatnou modifikaci zbylých silanolů pomocí malých silanů (např. dimethylchlorsilan, trimethylchlorsilan). Endcapping pak sníží počet volných silanolových skupin až o 30 % (33) (43).



Obrázek 10: Struktura stacionární fáze náplňové (a) a monolitické (b) kolony (obrázek převzat ze zdroje (44)).

4.4 Rešerše stanovení melatoninu a vitamínu skupiny B₆

V současné době nebyla publikována žádná metoda, která by se zabírala současným stanovením analyzovaných látek. Pro melatonin i pyridoxin existuje několik publikovaných metod pro stanovení samostatně či s jinými látkami.

Melatonin je hormon produkovaný epifýzou, který reguluje spánek a bdělost (1), proto je jeho stanovení v různých matricích významné pro výzkumný a diagnostický potenciál. V dnešní době je pro stanovení melatoninu nejvíce využívána metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Metoda umožňuje separaci

a kvantifikaci chemických sloučenin v roztocích (39). Pro stanovení melatoninu se používají různé typy chromatografických kolon, ale nejčastěji kolony s reverzní stacionární fází C18 a mobilní fáze s organickými rozpouštědly a vodnými roztoky kyselin. Detekce bývá prováděna obvykle fluorescenční spektrometrií, která umožňuje selektivní a citlivou detekci, další možností je například UV/VIS či hmotnostní spektrometrie (45) (46) (47) (48) (49). Výsledky analýzy mohou být ovlivněny řadou faktorů jako například typ kolony, mobilní fáze, pH, teplota, příprava vzorku, typ detektoru (39).

Mezi matrice využívané nejčastěji ke stanovení melatoninu dnes zřídka patří syntetické potravní doplňky, u kterých se studie zabývají zejména přítomností deklarovaného množství uvedeného na etiketě přípravku, ale patří sem zejména biologické matrice jako například krevní plazma, sliny, moč, mozkomíšní tekutina, či také potraviny a části rostlin.

Co se týče pyridoxinu, je to jedna z forem vitamínu B₆ a je velice důležitý pro řadu metabolických procesů v těle (50). Jeho stanovení se také nejvíce věnuje metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie, která je spolehlivá pro stanovení jeho hladin v různých matricích. Stanovení probíhá převážně na reverzních fázích s detekcí ultrafialovým zářením či fluorescenční spektrometrií. Používané matrice jsou téměř shodné s matricemi používanými pro stanovení melatoninu jako je krevní plazma, mateřské mléko, doplňky stravy – kojenecké výživy, multivitaminové tablety, vitamínové nápoje (51) (52) (53).

Publikované zdroje ukazují, že metody HPLC se zaměřují na užití v různých aplikacích, jako diagnostika a terapie týkající se spánku, léčba různých onemocnění, hodnocení potravinového přínosu sloučenin pro lidské zdraví, stanovení množství těchto sloučenin v léčivých přípravcích. Také ukazují, že metoda HPLC je účinná pro stanovení melatoninu a pyridoxinu v odlišných matricích. V tabulce níže jsou uvedené vybrané zdroje týkající se stanovení melatoninu a pyridoxinu pomocí metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (45) (46) (47) (48) (49) (51) (52) (53).

Tabulka 5: Přehled studií a podmínek separace a stanovení melatoninu a pyridoxinu.

Vzorek	Stanovované látky	Mobilní fáze	Typ kolony	Metoda	Zdroj
Doplňky stravy s obsahem melatoninu	melatonin	A: voda : kyselina octová 0,1 % B: MeOH	Kinetex EVO C-18 100 A (130*3 mm, částice 5 µm)	HPLC-VWD-FLD	(45)
Vinná réva	melatonin a <i>trans</i> -resveratrol	A: fosfátový pufr (40 mM) pH 3,0/ACN (80/20, obj./obj.) B: fosfátový pufr (40 mM) pH 3,0 /ACN (60/40, obj./obj.)	YMC-Pack ODS-A (250*4,6 mm, částice 5 µm)	HPLC-FLD	(46)
Lidská plazma a sliny	melatonin	A: 5 mM vodný roztok octanu amonného a kys. mravenčí (40:60:0,1; v/v/v) B: MeOH	Kinetex C-18 100 A (75*2,1 mm, částice 2,6 µm) + předkolona UHPLC 2,1	LC-MS/MS s EIS	(47)
Maso (jehněčí, kuřecí, hovězí, vepřový, losos, kuřecí játra a srdce) vaječná sušina, kukuřice, kukuřičný šrot, sušené pivovarské kvasnice, hovězí kolostrum	melatonin	100 mM acetátový pufr (pH 4,5) s 20 % ACN	Bio-Advantage 100 C-18 (250*4,6 mm, částice 5 µm)	HPLC	(48)
Nanočástice poly (kyseliny mléčné)	melatonin	B: ACN A: voda (65:35, obj./obj)	Lichrospher 100 RP-18E (125*4 mm, částice 4, 5 µm)	HPLC-PDA	(49)
Potravinové doplňky: kojenecká výživa, cereálie, nízkokalorické potraviny, multivit. tablety, vitamínový nápoj	vitamíny B (pyridoxin, thiamin, riboflavin, nikotinamid, kys. pantothenov-á, kys. listová)	A: 20 mM fosforečnan draselný pH 3,0 B: 50 % ACN (obj./obj.) v 20 mM fosforečnanu draselném pH 3,0	Develosil RP-Aqueous C-30 140 Å (250*4,6 mm, částice 5 µm)	HPLC-DAD	(51)
Lidská plazma	pyridoxin, pyridoxal 5-fosfát, pyridoxal, pyridoxamin 5-fosfát, pyridoxin, pyridoxamin a degradační produkt 4-	A: 3,5 mM kyselina 1-oktansulfonová a 1,2 mM triethylamin v 0,033 M kyselině fosforečné B: ACN	Hypersil ODS C-18 (150*4,6 mm, částice 3 µm)	HPLC-FLD	(52)

	pyridoxová kyselina				
Cereální kojenecká výživa	pyridoxalové, pyridoxinové a pyridoxaminové formy vitamínu B ₆	A: 95% roztok pufru (11 g KH ₂ PO ₄ a 0,5 g kyseliny 1-heptansulfonové) B: 5 % ACN	Eclipse X08-C-18 (150*4,6 mm, částice 5 μm)	HPLC-FLD	(53)

5 Experimentální část

5.1 Použité přístroje a pomůcky

5.1.1 Přístroje

Chromatografický systém:

Chromatograf: Shimadzu LC-10

Pumpy: LC-10AD VP

Degasser: DGU -14 A

Autosampler: SIL-HT A

Termostat kolony: CTO-10AC VP

Detektor: DAD detektor SPD-M10A VP

Vyhodnocení: Software LC Labsolutions

5.1.2 Kolona

SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, velikost částic 2,7 μm

5.1.3 Pomůcky

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

Analytické váhy – Sartorius segura 225D-1CEU

Ultrazvuková lázeň – Bandelin SONOREX RK100

Pipety – Brand

Plastové injekční stříkačky – Braun, Omnifix®

PTFE filtry o velikosti pórů 0,2 μm – Whatman™ a filtry 0,45 μm nylon – VWR

5.2 Použité chemikálie

5.2.1 Standardy

Melatonin $\geq 98,0\%$ (TLC); Sigma-Aldrich s. r. o.

Pyridoxin $\geq 99,0\%$ (TLC); Sigma-Aldrich s. r. o.

5.2.2 Testované vnitřní standardy

Kyselina sorbová $\geq 99,0\%$ (TLC); Sigma-Aldrich s. r. o.

Kyselina 4-aminobenzoová $\geq 99,0\%$ (TLC); Sigma-Aldrich s. r. o.

Kyselina benzoová $\geq 99,0\%$; Chemapol a. s.

Bisphenol S $\geq 99,0\%$ (TLC); Sigma-Aldrich s. r. o.

Bisphenol A $\geq 99,0\%$ (TLC); Sigma-Aldrich s. r. o.

Kyselina chlorogenová $\geq 95,0\%$; Sigma-Aldrich s. r. o.

Vankomycin 1000mg/1g prášek pro infuzní roztok; Mylan S. a. s.

Kyselina maleinová $\geq 99,0\%$ (HPLC); Fluka

Kyselina gallová 97,5–102,5%; Sigma-Aldrich s. r. o.

Amygdalin $\geq 97,0\%$ (HPLC); Fluka

Kofein $\geq 99,0\%$; Fagron a. s.

Resorcin $\geq 99,0\%$; Lach – Ner s. r. o.

Benzamid $\geq 99,0\%$; Sigma-Aldrich s. r. o.

p-nitrofenol $\geq 99,0\%$; Lachema n. p. Brno

o-aminofenol $\geq 99,0\%$; Lachema n. p. Brno

5.2.3 Rozpouštědla

Acetonitril (HPLC gradient grade); Honeywell s. r. o.

Methanol (HPLC gradient grade); Honeywell s. r. o.

Kyselina *o*-fosforečná 85%; Penta s. r. o.

Ultračistá voda; čisticí systémem Milli-Q (Millipore, Berford)

5.3 Testované vzorky

5.3.1 Doplnky stravy

mcePharma, s. r. o., TOZAX Sleep Trip, 30 tbl.

Clinical nutricosmetics, s. r. o., Clinical Melatonin B₆ sirup 120 ml

Emergopharm, Sp. z o.o. Sp. K., Fast Sleep ústní sprej s melatoninem 24 ml

Salutem Pharma, s. r. o., Melatonin Rapid komplex 5 mg ODT (pod jazyk), 30 tbl.

Woykoff, a. s., Allegra Melatonin 3 mg, 30 tbl.

Clinical nutricosmetics, s. r. o., Clinical Melatonin Forte, 30 tbl.

Allnature, s. r. o., Melatonin 2 mg, 60 tbl.

Nutricius, s. r. o., Melatonin new extra 5 mg, 60 tbl.

Clinical nutricosmetics, s. r. o., Clinical Melatonin B₆ Gummies, pektinové bonbóny s pomerančovou příchutí, 60 tbl.



Obrázek 11: Testované doplňky stravy (obrázky převzaty a upraveny z webových stránek prodejců (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62)).

5.4 Deklarovaný obsah melatoninu a vitamínu B₆ v testovaných potravních doplňcích

Tabulka 6: Deklarovaný obsah látek v testovaných potravních doplňcích.

Výrobce	Název přípravku	Deklarovaný obsah mg/1tbl	
		Melatonin	Vitamín B ₆
mcePharma s. r. o.	TOZAX Sleep Trip	1,0	0,545
Clinical nutricosmetics s. r. o.	Clinical Melatonin B ₆ Gummies	1,0	1,4
Nutricius s. r. o.	Melatonin new extra 5 mg	5,0	–
Salutem Pharma s. r. o.	Melatonin Rapid komplex 5 mg ODT	1,0	–
Woykoff a. s.	Allegra Melatonin 3 mg	3,0	–
Clinical nutricosmetics s. r. o.	Clinical Melatonin Forte	5,0	–
Allnature s. r. o.	Melatonin 2mg	2,0	–
Emergopharm Sp. z o.o. Sp. K.	Fast Sleep ústní sprej s melatoninem	Deklarovaný obsah mg/2 vstříky	
		1,0	–
Clinical nutricosmetics s. r. o.	Clinical Melatonin B ₆ sirup	Deklarovaný obsah v mg/2,5 ml	
		1,0	0,7

5.5 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla složena z acetonitrilu a okyselené vodné fáze. Acetonitril byl čerpán přímo ze zásobní lahve od výrobce. Na přípravu okyselené vodné fáze bylo do nádoby na mobilní fázi naplněno 800 ml ultračisté vody a přidáno 0,8 ml 85% kyseliny *o*-fosforečné. Vznikla 0,085% H₃PO₄ kyselá vodná fáze o pH 2,2.

5.6 Příprava roztoků standardů

Standardy melatoninu, pyridoxinu byly rozpuštěny v 1000 µl methanolu podle tabulky uvedené níže. Všechny roztoky standardů byly ve skleněných vialkách uchovávány v ledničce kvůli jejich možné degradaci.

5.6.1 Příprava zásobních roztoků standardů

Tabulka 7: Příprava zásobních roztoků standardů.

Standardy	Navážka (mg)	Methanol (µl)	Koncentrace (mg/l)
Melatonin	2,0	1000	2000
Pyridoxin	1,93	1000	1930

5.6.2 Příprava pracovních roztoků standardů

Pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků standardů methanolem. Zásobní roztoky byly naředěny dvacetkrát, tedy 50 µl z každého zásobního roztoku se naředilo 950 µl methanolu. Dále se připravil směsný roztok standardů smísením 100 µl každého ze zásobních standardů, který byl doplněn 800 µl ultračistou vodou.

5.6.3 Příprava zásobního roztoku vnitřního standardu

Zásobní roztok vnitřního standardu kyseliny chlorogenové byl připraven o koncentraci 1900 mg/l. Do vialky bylo naváženo 1,90 mg kyseliny chlorogenové a následně napipetováno 1000 µl methanolu.

5.6.4 Příprava roztoku pro test vhodnosti chromatografického systému

Pro test vhodnosti chromatografického systému byl připraven nový směsný roztok standardů společně s vnitřním standardem. Tento roztok byl tvořen 100 µl z každého zásobního standardu a doplněn 700 µl ultračisté vody do objemu 1000 µl.

5.6.5 Příprava roztoku pro opakovatelnost

Pro opakovatelnost byly použity roztoky z přípravy roztoků na kalibraci, a to v koncentracích 200 mg/ml, 80 mg/ml, 10 mg/ml.

5.6.6 Příprava roztoků pro kalibraci

Ze směsného roztoku standardů pro test vhodnosti chromatografického systému (200 mg/l) byla později připravena kalibrační řada roztoků o různé koncentraci pro test linearity. Tato kalibrační řada vznikla ředěním směsného roztoku standardů ultračistou vodou v různých poměrech, které je shrnuto v tabulce 8. Kvůli malému množství byly použity inserty.

Tabulka 8: Ředění kalibračních roztoků standardů.

Objem směsného roztoku standardů (µl)	Objem ultračisté vody (µl)	Výsledná koncentrace (mg/l)
100	0	200
80	20	160
60	40	120
40	60	80
20	80	40
10	90	20
5	95	10
2	98	4

5.6.7 Příprava roztoku pro stanovení parametru přesnosti

Bylo naváženo 6 tablet potravního doplňku Sleep Trip od společnosti TOZAX, které se následně extrahovaly do šesti centrifugačních zkumavek s přídavkem 10 ml vody, pomocí ultrazvukové lázně po dobu 15 minut. Dále byla tato směs přefiltrována do vialek přes 0,2 μm PTFE filtry a analyzována pomocí HPLC.

5.6.8 Příprava standardů a vzorků pro stanovení parametru správnosti

- a) příprava zásobních standardů melatoninu, pyridoxinu a kyseliny chlorogenové pro výtěžnosti

Do třech centrifugačních zkumavek bylo naváženo na analytických vahách zvlášť 19,87 mg melatoninu, do druhé 19,89 mg pyridoxinu a do poslední 19,86 mg vnitřního standardu kyseliny chlorogenové. Do každé zkumavky bylo přidáno 10 ml methanolu a následně byly zkumavky vloženy do ultrazvukové lázně na 15 minut, a poté byl každý výsledný zásobní standard přefiltrován do vialek přes PTFE filtry o velikosti 0,2 μm .

- b) Příprava vzorku tablety pro stanovení výtěžnosti doplňku stravy Sleep Trip bez přídavku melatoninu a pyridoxinu

Vypočtená polovina hmotnosti jedné tablety potravního doplňku byla navážena do centrifugační zkumavky, do které bylo přidáno 100 μl vnitřního standardu kyselina chlorogenové a doplněno do 20 ml 19,90 ml extrakčního činidla ultračisté vody. Tento vzorek byl nakonec vložen do ultrazvukové lázně a přefiltrován pomocí PTFE filtru o velikosti 0,2 μm . Vzorek byl připraven celkem třikrát.

- c) Příprava vzorku tablety pro stanovení výtěžnosti doplňku stravy Sleep Trip s přídavkem standardů melatoninu a pyridoxinu

Příprava vzorku byla téměř totožná s předchozí přípravou v bodu b. Liší se pouze tím, že do centrifugační zkumavky byl napipetován přídavek 500 μl melatoninu a 500 μl pyridoxinu, 100 μl vnitřního standardu a 18,90 ml ultračisté vody. Poté se pokračovalo stejně (příprava b.). Vzorek byl připraven celkem osmkrát.

- d) Příprava porovnávacích standardů melatoninu, pyridoxinu pro hodnocení výtěžnosti extrakce

Tento roztok byl připraven pouze dvakrát, a to v desetinásobně menším množství než předchozí vzorky. Kvůli malému množství příprava probíhala přímo do vialek, do které bylo napipetováno 50 μ l melatoninu, 50 μ l pyridoxinu, 10 μ l vnitřního standardu kyseliny chlorogenové a jako poslední bylo napipetováno 945 μ l ultračisté vody. Následná ultrazvuková lázeň nebyla potřeba kvůli snadné rozpustnosti.

5.7 Příprava analyzovaných vzorků dostupných na trhu v ČR

Pět tablet doplňků stravy bylo zváženo a zprůměrováno na hmotnost jedné tablety. Tablety byly rozdrčeny a homogenizovány v třence. Následně byla navážena průměrná hmotnost směsi, která byla extrahována do 20 ml ultračisté vody s vnitřním standardem po dobu 15 minut pomocí ultrazvukové lázně. Vyextrahovaný vzorek byl poté pomocí injekčních stříkaček přefiltrován přes PTFE filtry o velikosti pórů 0,2 μ m do skleněných vialek.

5.7.1 Příprava vzorků ve formě sirupu Clinical Melatonin B₆

Definovaná jedna dávka přípravku byla 2,5 ml sirupu. Pomocí pipety byl odebrán přesný objem do centrifugační zkumavky a doplněn na 20 ml pomocí ultračisté vody a 100 μ l vnitřního standardu. Po dostatečném promísení byl vzorek pomocí injekčních stříkaček přefiltrován přes PTFE filtry o velikosti pórů 0,2 μ m do skleněných vialek.

5.7.2 Příprava vzorků ve formě spreje Fast Sleep

Zvážení 20 vstříků do odměrné nádoby byla zjištěna hmotnost jednoho vstříku v mg, kvůli malému množství byl vzorek připravován pomocí dvou vstříků. K definované dávce byl vzorek doplněn do 20 ml ultračistou vodou a 100 μ l vnitřního standardu. Po dostatečném promísení byl vzorek pomocí injekčních stříkaček přefiltrován přes PTFE filtry o velikosti pórů 0,2 μ m do skleněných vialek.

5.7.3 Příprava vzorků ve formě bonbónů Clinical Melatonin B₆ gummies

Do centrifugační zkumavky byl vložen vzorek bonbónu, ke kterému byl přidán objem na 19,9 ml ultračisté vody a vzorek byl ponechán samovolnému rozpuštění. Úplné rozpuštění bylo dosaženo po 3 hodinách. Následně bylo přidáno 100 µl vnitřního standardu na celkový objem 20 ml a vzorek byl po dostatečném promísení pomocí injekčních stříkaček přefiltrován přes PTFE filtry o velikosti pórů 0,2 µm do skleněných vialek.

5.8 Parametry měření

Analýza byla provedena na HPLC chromatogramu Shimadzu LC -10, jehož součástí byla binární pumpa, degasser, autosampler, kolonový termostat a DAD detektor. Kontrola systému, sběr a vyhodnocování dat bylo prováděno pomocí chromatografického softwaru LC Labsolutions. Chromatografie byla provedena pomocí gradientové eluce, která je charakteristická proměnlivým složením mobilní fáze během separace. Optimální chromatografické podmínky, které byly použity i pro validaci byly: mobilní fáze A: acetonitril, mobilní fáze B: 0,085% kyselina fosforečná o pH 2,2. Průtok mobilní fáze byl zvolen 1 ml/min. Složení gradientu mobilní fáze v průběhu analýzy je uvedeno v tabulce 9. Jako nevhodnější stacionární fáze byla použita kolona SUPELCO Ascentis Express C-18 (100 x 4,6 mm) o velikosti částic 2,7 µm. Kolonový prostor byl po celou dobu měření temperován na 30 °C. Objem nástřiku vzorku na kolonu činil 5 µl. Melatonin a pyridoxin byly detekovány při vlnové délce 278 nm.

Tabulka 9: Průběh finálního gradientu použitého pro validaci metody.

Gradient		
Časový průběh analýzy (min)	Zastoupení vodné fáze (%)	Zastoupení organické fáze (%)
0,01	95	5
0,01–4,00	40	60
4,00–4,10	95	5
4,10–6,00	95	5

5.9 Parametry hodnocení metody

Mezi parametry hodnocení metody patřila linearita, opakovatelnost, přesnost, správnost, limit detekce a kvantifikace a následně samotná aplikace metody na měření vzorků. Proveden byl i test vhodnosti chromatografického systému.

6 Výsledky a diskuze

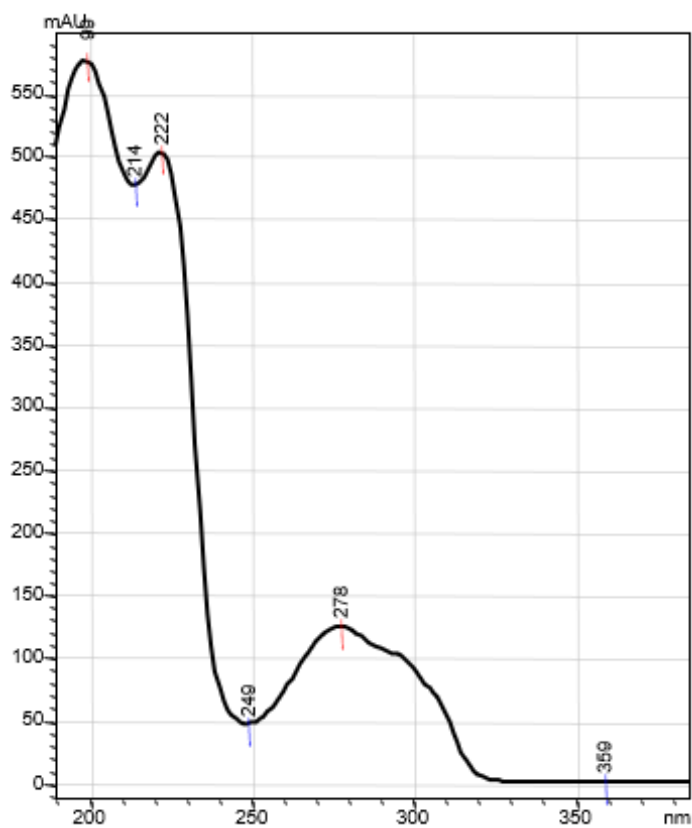
6.1 Vývoj analytické metody, optimalizované parametry

6.1.1 Optimalizace metody

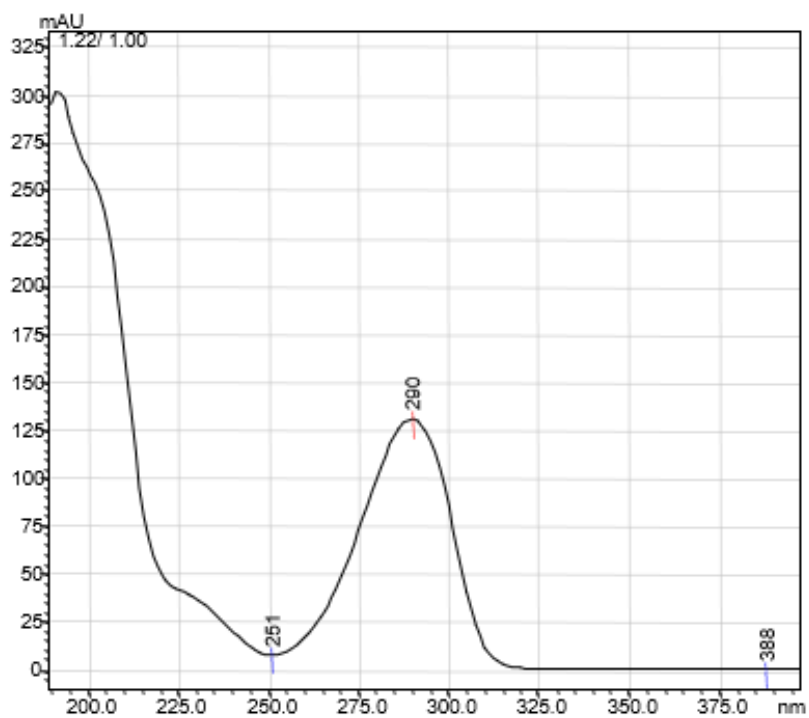
Cílem optimalizace metody bylo nalézt vhodné podmínky pro separaci jednotlivých standardů tak, aby měly současně ve výsledném chromatogramu dostatečné rozlišení, symetrii a šířku píku. V první řadě bylo nutné zvolit vhodnou chromatografickou kolonu jako stacionární fázi a pro ni vhodnou mobilní fázi a také mód chromatografické eluce, zdali bude analýza prováděna v režimu analýzy isokratické nebo gradientové. Byl testován vliv poměru zastoupení organické, vodné fáze a vliv pH na separaci stanovovaných látek. Poté bylo nutné najít optimální vlnovou délku pro detekci v závislosti na absorpčním maximu. Stanoven byl také objem průtoku mobilní fáze a to 1 ml/min, objem nástřiku vzorku na kolonu 5 μ l. Kolona byla po celou dobu analýzy temperována na vhodně zvolenou teplotu 30 °C.

6.1.2 Volba vlnové délky

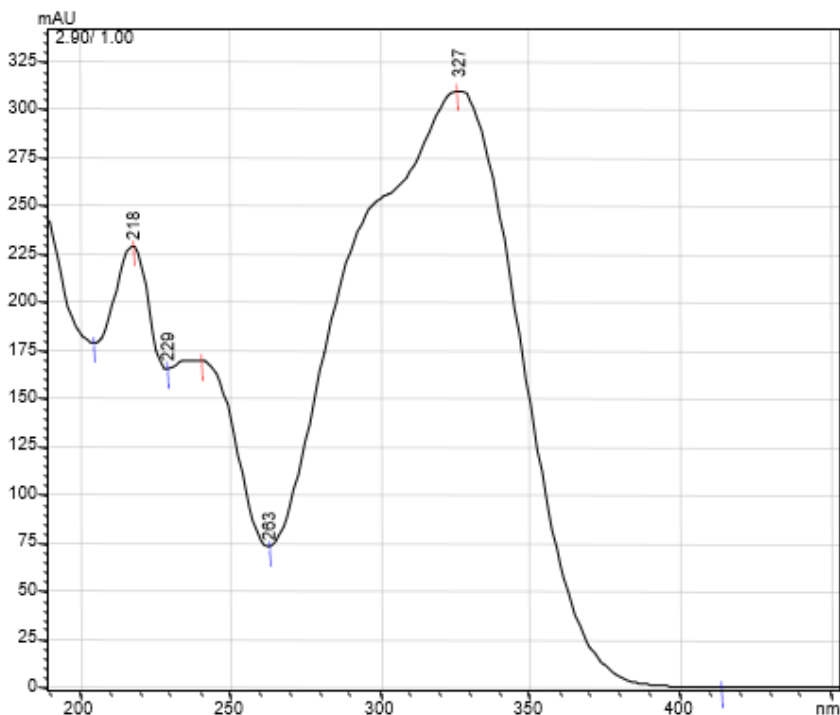
Detekce byla provedena při třech nevhodnějších vlnových délkách, jejichž výběr umožnil DAD detektor, a to 278, 290, 327 nm. Vlnové délky byly vybrány dle absorpčních maxim jednotlivých analyzovaných látek. Naměřená absorpční spektra jednotlivých látek v použité mobilní fázi jsou následující:



Obrázek 12: Absorpční spektrum melatoninu.



Obrázek 13: Absorpční spektrum pyridoxinu.



Obrázek 14: Absorpční spektrum kyseliny chlorogenové.

Tabulka 10: Vlnové délky, při kterých byly detekovány konkrétní analyzované látky.

Analyzovaná látka	λ (nm)
Melatonin	278
Pyridoxin	290
Kyselina chlorogenová – IS	327

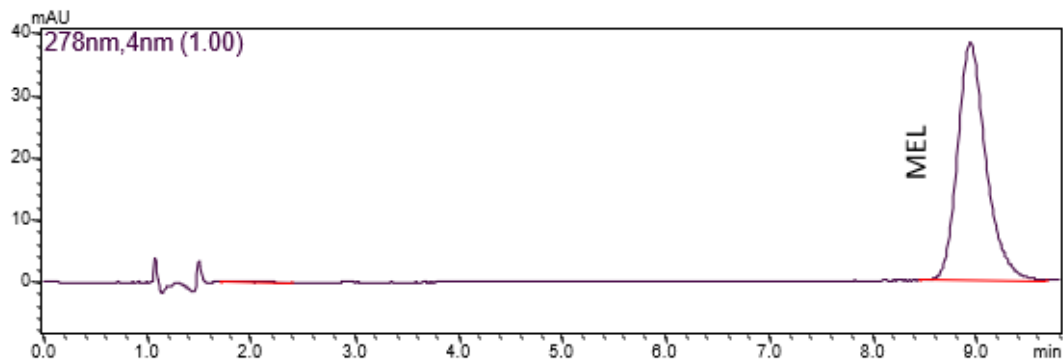
6.1.3 Volba složení mobilní fáze

Pro optimalizaci byly měřeny retenční časy melatoninu a pyridoxinu na zvolených chromatografických kolonách s v závislosti na změnách složení mobilní fáze při teplotě 30 °C.

Mobilní fáze, které byly testovány směsi: ACN – H₂O, ANC – 0,085% H₃PO₄, MeOH – H₂O a MeOH – 0,085% H₃PO₄. Hlavním cílem optimalizace mobilní fáze bylo dosažení separace všech stanovovaných látek, vhodná šířka a symetrie píku a separace stanovovaných látek v přijatelném čase. Na následujících obrázcích jsou dokumentovány příklady retence melatoninu na jednotlivých kolonách za různých testovaných podmínek

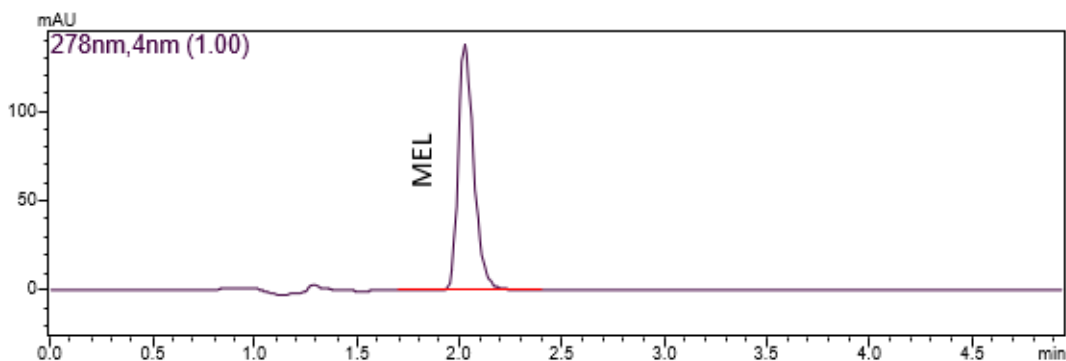
mobilních fází. Retence pyridoxinu a jeho separace společně s melatoninem byla testována až v pozdější fázi optimalizace, kdy bylo zjištěno že některé z melatoninových doplňků tento vitamín také obsahují.

Kolona YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 μ m ACN/kys. fosf. 0,085% (20/80)



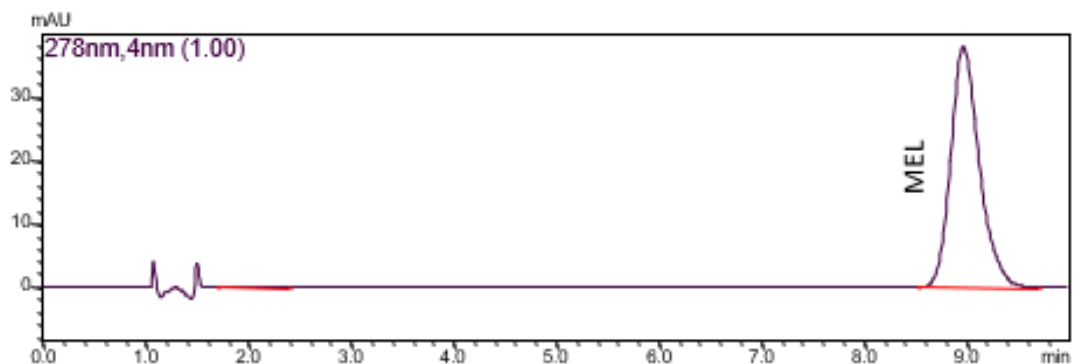
Obrázek 15: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 μ m, ACN/kyselina fosforečná 0,085% (20/80).

Kolona YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 μ m ACN/kys. fosf. 0,085% (40/60)



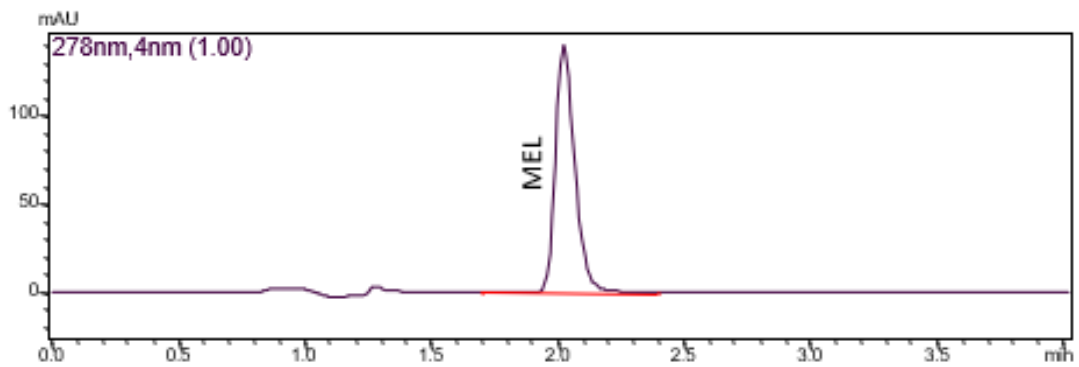
Obrázek 16: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 μ m, ACN/kyselina fosforečná 0,085% (40/60).

Kolona YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 μ m ACN/H₂O (20/80)



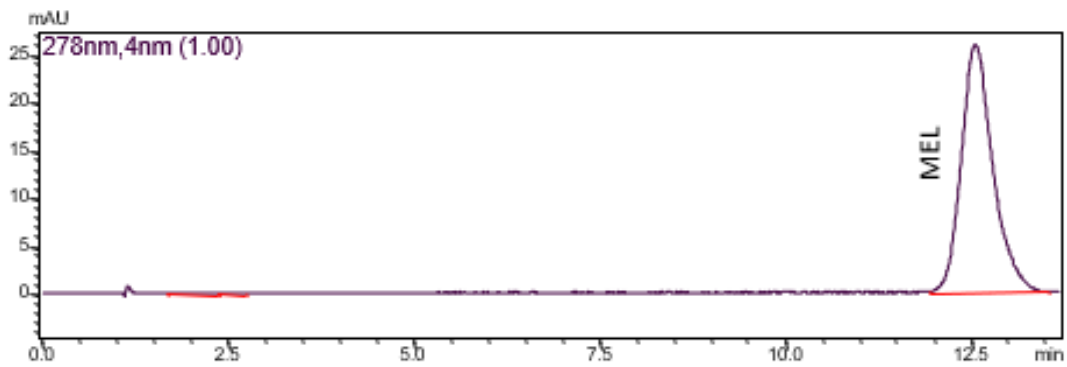
Obrázek 17: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 μ m, ACN/H₂O (20/80).

Kolona YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/H₂O (40/60)



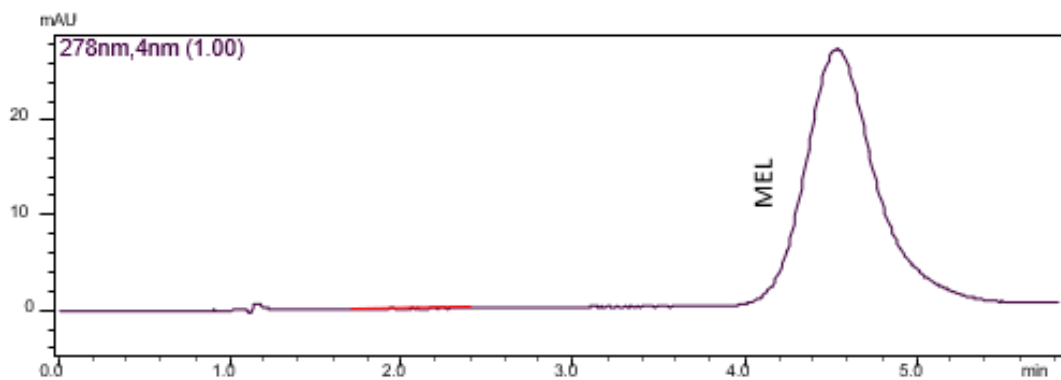
Obrázek 18: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm, ACN/H₂O (40/60).

Kolona YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm MeOH/H₂O (30/70)



Obrázek 19: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm, MeOH/H₂O (30/70).

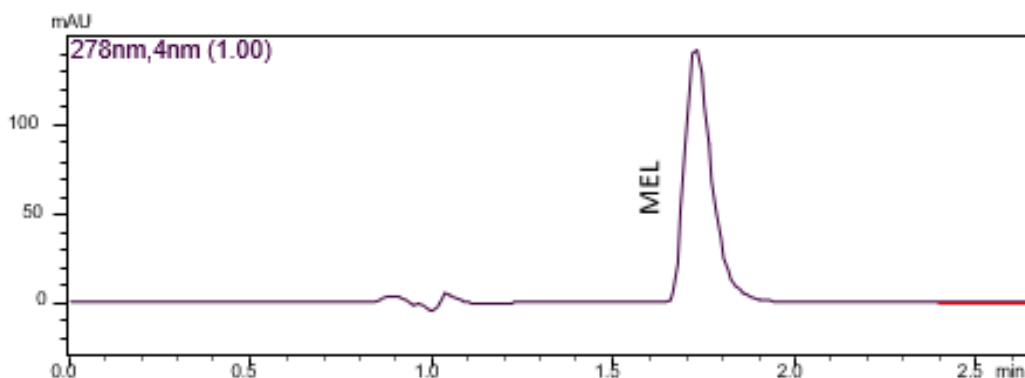
Kolona YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm MeOH/kys. fosf. 0,085% (30/70)



Obrázek 20: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm MeOH/kyselina fosforečná 0,085% (30/70).

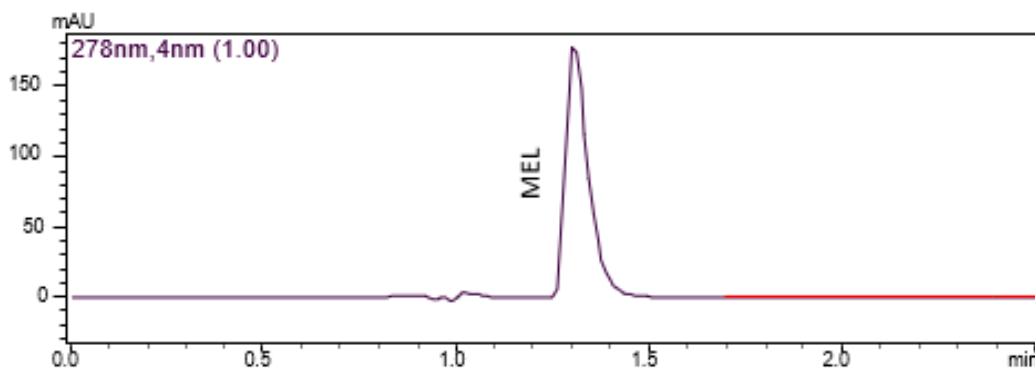
Při analýze na koloně YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm nebyla získána dobrá symetrie a šířka píku, a také nebyla analýza uskutečněna ve vhodných retenčních časech (viz obrázek 15–20).

Kolona SUPELCO Ascentis Express RP-Amide 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kys. fosf. 0,085% (30/70)



Obrázek 21: SUPELCO Ascentis Express RP-Amide 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (30/70).

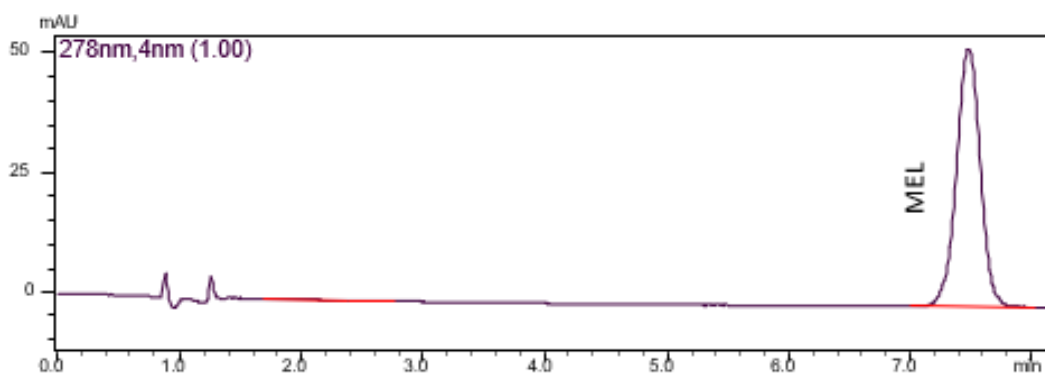
Kolona SUPELCO Ascentis Express RP-Amide 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kys. fosf. 0,085% (40/60)



Obrázek 22: SUPELCO Ascentis Express RP-Amide 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (40/60).

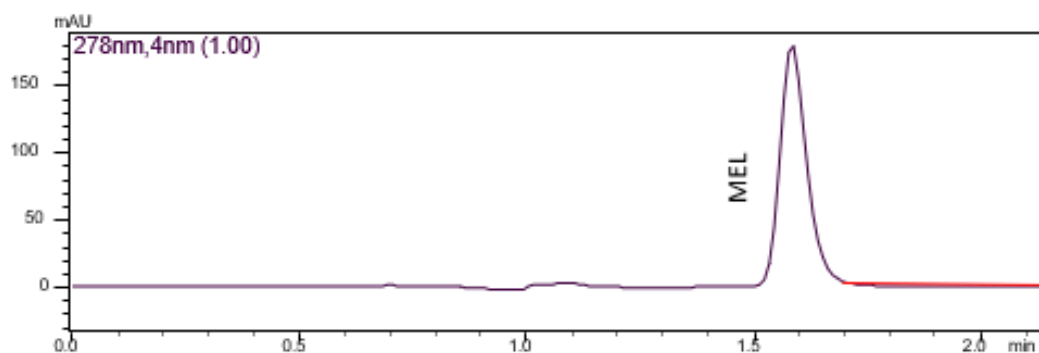
Na koloně SUPELCO Ascentis Express RP-Amide 100*4,6 mm, částice 5 µm byly pozorovány velmi krátké retenční časy (viz obrázek 21,22).

Kolona YMC Triart C-18 ExRS 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kys. fosf. 0,085% (20/80)



Obrázek 23: YMC Triart C-18 ExRS 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (20/80).

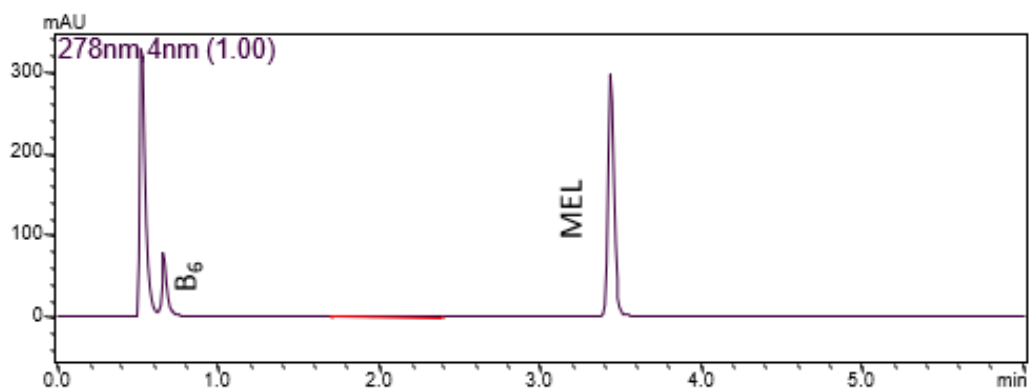
Kolona YMC Triart C-18 ExRS 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kys. fosf. 0,085% (40/60)



Obrázek 24: YMC Triart C-18 ExRS 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (40/60).

Při analýze na koloně YMC Triart C-18 ExRS 100*4,6 mm, částice 5 µm byly pozorovány velmi krátké retenční časy (viz obrázek 23,24).

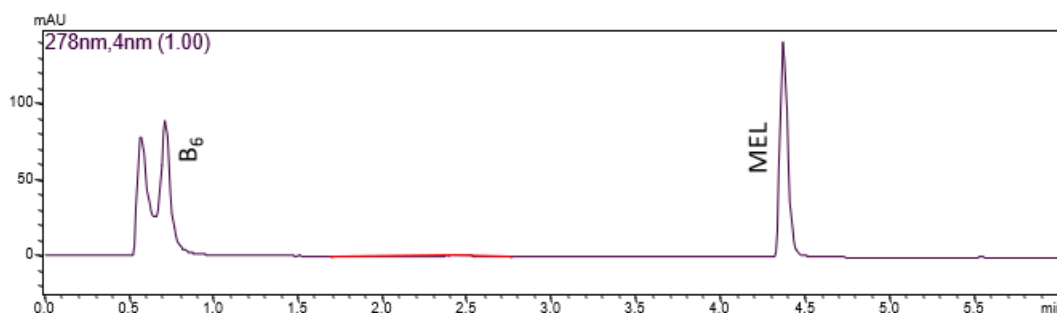
Kolona KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, částice 2,6 µm ACN/kys. fosf. 0,085% (30/70)



Obrázek 25: KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, částice 2,6 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (30/70).

Tato kolona nebyla vhodná k analýze, protože nebyla získána dostatečná separace B₆ od píku nástřiku (mrtvého objemu kolony).

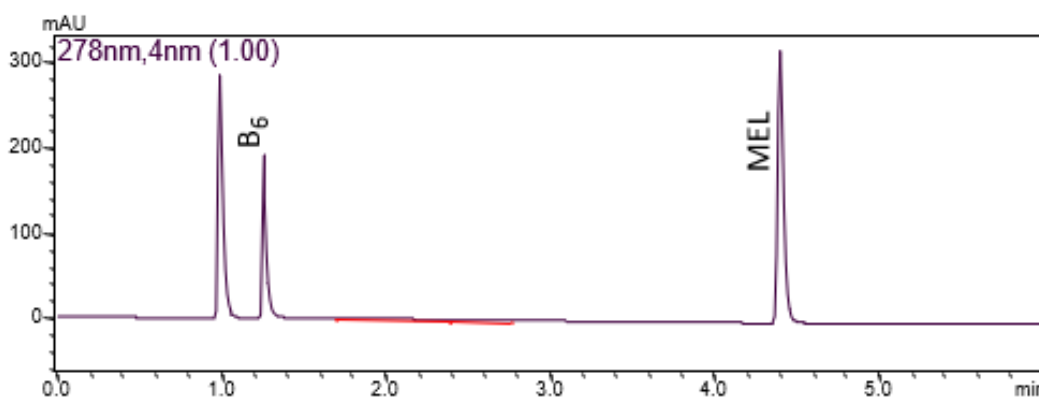
Kolona SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 μm, 12 nm ACN/kys. fosf. 0,085% (30/70)



Obrázek 26: SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 μm, 12 nm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (30/70).

Při testování analytické kolony SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 μm, 12 nm nedošlo k separaci testovaných látek zejména u vitamínu B₆, kde se vyskytl dvojpík s píkem nástřiku. Tato kolona je tudíž nevhodná k analýze stanovovaných látek.

Kolona SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm ACN/kys. fosf. 0,085% (30/70)



Obrázek 27: SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (30/70).

U chromatografické kolony SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm byla testována mobilní fáze acetonitril/kyselina fosforečná 0,085% v poměru

30/70. Tato mobilní fáze vykazovala chromatogram s optimální separací pyridoxinu od mrtvého objemu. Došlo k separaci melatoninu, píky měly vhodnou symetrii a šířku, tudíž byla zvolena jako jedna z nejvhodnějších pro další optimalizaci gradientu z důvodů urychlení analýzy.

6.1.4 Volba vnitřního standardu

Přijatelný vnitřní standard byl vybrán z následujících patnácti látek:

Tabulka 11: Seznam vnitřních standardů.

Kyselina sorbová	Kyselina gallová
Kyselina aminobenzoová	Amygdalin
Kyselina benzoová	Kofein
Bisphenol S	Resorcin
Bisphenol A	Benzamid
Kyselina chlorogenová	<i>p</i> -nitrofenol
Vankomycin	<i>o</i> -aminofenol
Kyselina malonová	

Nejpříjemnějším vnitřním standardem byla vybrána kyselina chlorogenová, která eluovala v přijatelný retenční čas uprostřed separovaných látek a s žádnou z nich neinterferovala.

6.1.5 Volba vhodného gradientu a chromatografické kolony

V rámci další širší optimalizace metody bylo testováno celkem 15 chromatografických kolon. Při volbě nejvhodnější chromatografické kolony se zejména přihlíželo k rozlišení jednotlivých látek, symetrii jejich píků a celkové rychlosti separace. Seznam zkoušených kolon je uveden v tabulce 15.

Separační podmínky pro zkoušené kolony byly následující: nástřik směsi standardu byl 5 μ l, průtok mobilní fáze 1,0 ml/min, detekce při 278 nm, teplota kolonového prostoru činila 30 °C a celá eluce i s následnou ekvilibrací kolony trvala 6, anebo případně 7 minut dle zvoleného gradientu. Využité mobilní fáze byly – A: acetonitril, B: 0,085% kyselina fosforečná.

Na testovaných kolonách byly vyzkoušeny 3 lineární gradienty s různým zastoupením organické fáze na začátku separace. Průběhy jednotlivých gradientů jsou uvedeny v tabulkách 12–14.

Tabulka 12: Průběh gradientu č. 1.

Průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01	95
0,01–5,00	40
5,00–5,10	95
5,10–6,00	95
6,00	stop

Tabulka 13: Průběh gradientu č. 2.

Průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01–1,00	95
1,00–6,00	30
6,00–6,10	95
6,10–7,00	95
7,00	stop

Tabulka 14: Průběh gradientu č. 3.

Průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01–1,00	98
1,00–5,00	20
5,00–5,10	98
5,10–6,00	98
6,00	stop

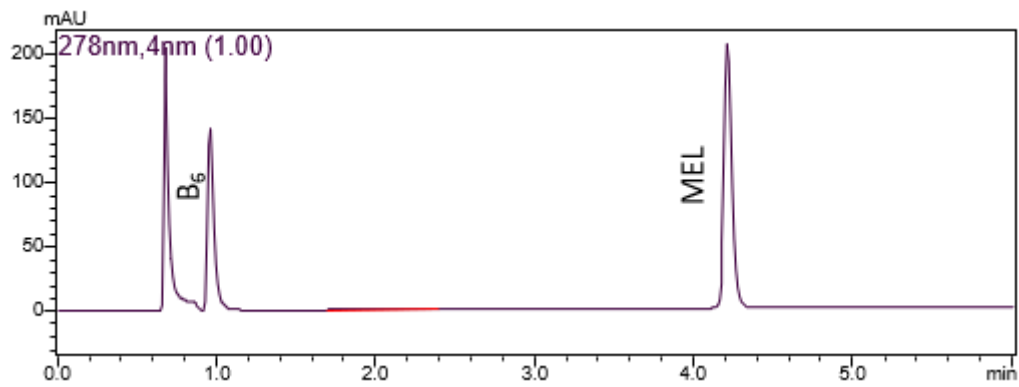
Identifikace jednotlivých píků směsi byla provedena jako první porovnáním retenčních časů nástřiku standardů. Pro testování bylo využito celkem patnáct různých stacionárních fází a na každé z těchto kolon byly zkušeny všechny tři gradienty.

Tabulka 15: Seznam testovaných kolon.

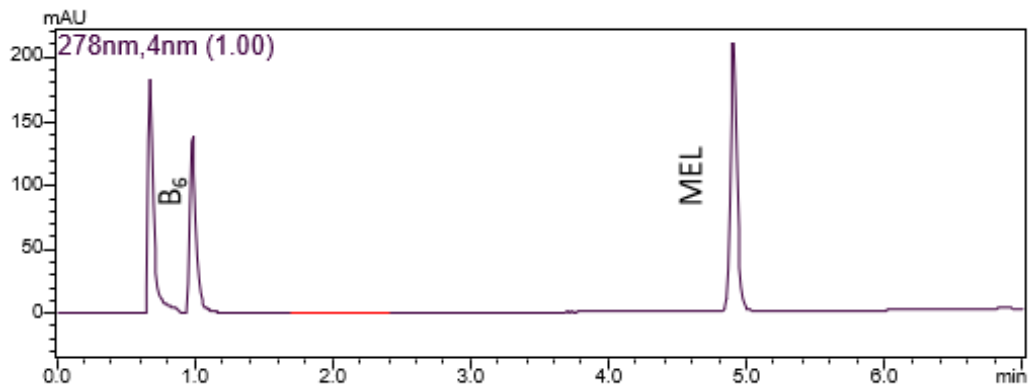
	Kolona
1	YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 μm
2	SUPELCO Ascentis Express RP-Amide 100 *4,6 mm, částice 5 μm
3	YMC Triart C-18 ExRS 100*4,6 mm, částice 5 μm
4	YMC Triart C-18 50*4,6 mm, částice 5 μm
5	KINETEX Bifenyl 100*4,6 mm, částice 5 μm
6	KINETEX Phenyl-hexyl 100*4,6 mm, částice 2,6 μm
7	SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm
8	KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, částice 2,6 μm
9	KINETEX EVO C-18 50*3,0 mm, částice 2,6 μm
10	YMC Triart C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 μm, 12 nm
11	SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 μm, 12 nm
12	SUPELCO Supel Carbon LC 100*3,0 mm, částice 2,7 μm
13	SUPELCO Ascentis Express AQ-C18 50*4,6 mm, částice 2,7 μm
14	SUPELCO Ascentis Express AQ-C18 50*4,6 mm, částice 2,7 μm + předkolona C-18
15	SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm

Na následujících chromatogramech jsou vyobrazeny pouze příklady separací na některých kolonách. Jednotlivé separované látky jsou označeny zkratkami: MEL – melatonin, B₆ – pyridoxin.

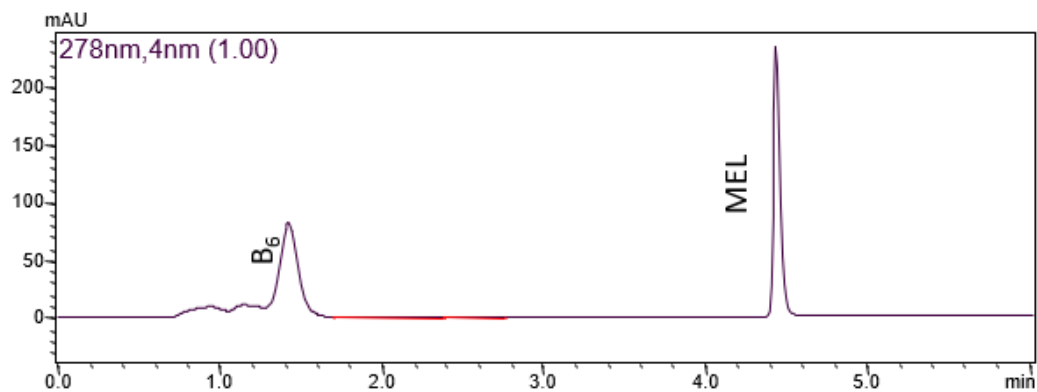
Kolona č. 4 YMC Triart C-18 50*4,6 mm, částice 5 μm



Obrázek 28: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 50*4,6 mm, částice 5 μm, za použití gradientu č. 1.

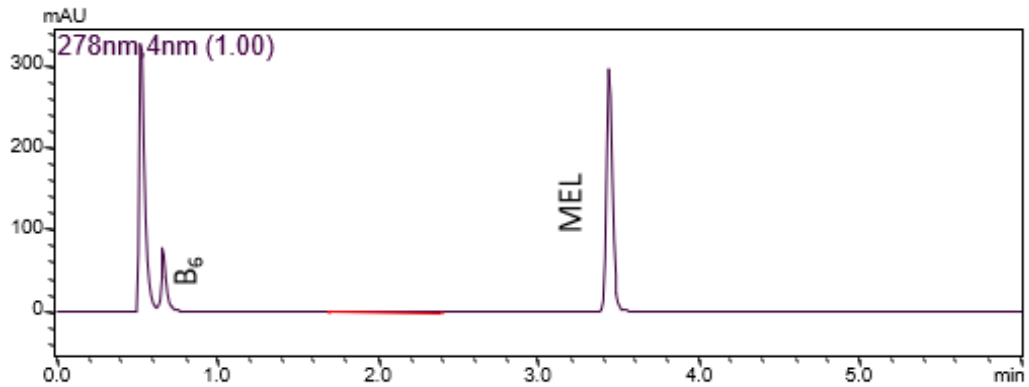


Obrázek 29: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 50*4,6 mm, částice 5 μm, za použití gradientu č. 2.



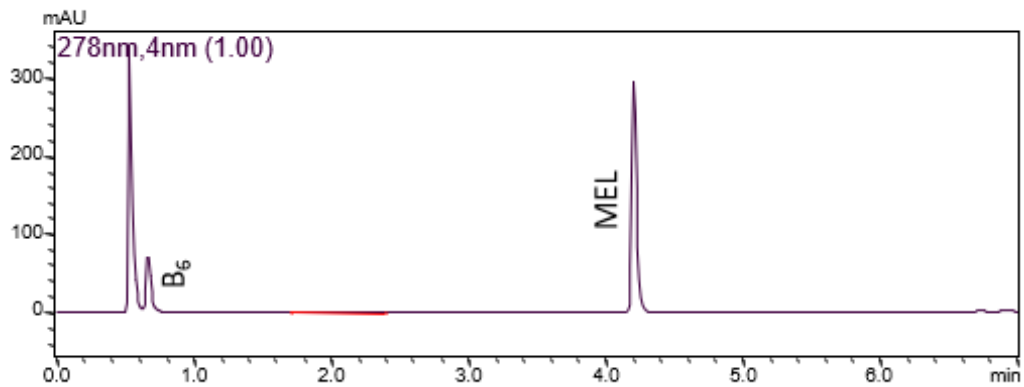
Obrázek 30: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 50*4,6 mm, částice 5 μm, za použití gradientu č. 3.

Kolona č. 9 KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, částice 2,6 μm



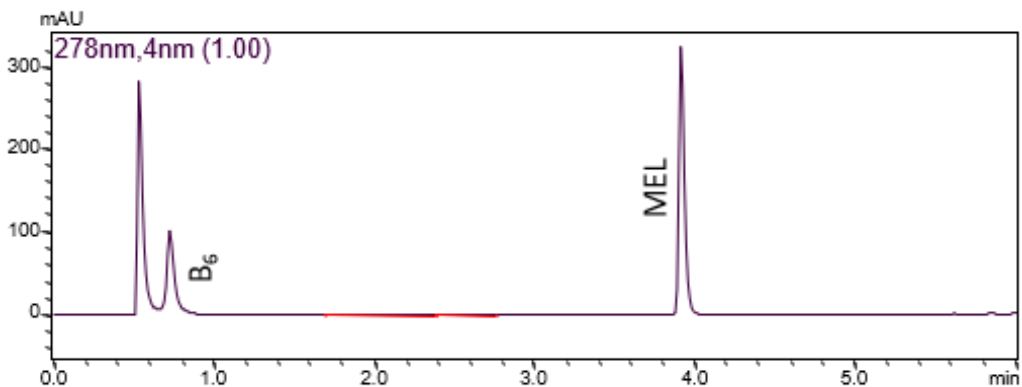
Obrázek 31: Chromatogram separace na koloně KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, částice 2,6 μm za použití gradientu č. 1.

Na této koloně při gradientu č. 1 není dostatečná separace pyridoxinu od píku mrtvého objemu.



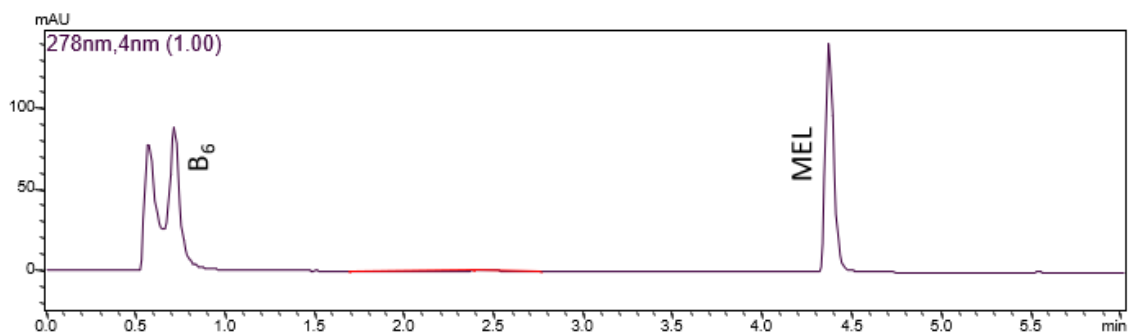
Obrázek 32: Chromatogram separace na koloně KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, 2,6 μm za použití gradientu č. 2.

Při gradientu č. 2 také nedocházelo k dostatečné separaci pyridoxinu od píku mrtvého bodu.



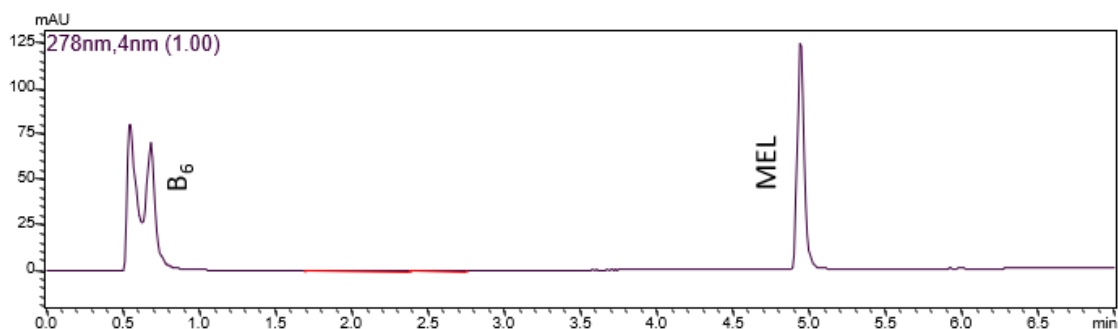
Obrázek 33: Chromatogram separace na koloně KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, částice 2,6 μm za použití gradientu č. 3.

Kolona č. 11 SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 µm, 12 nm



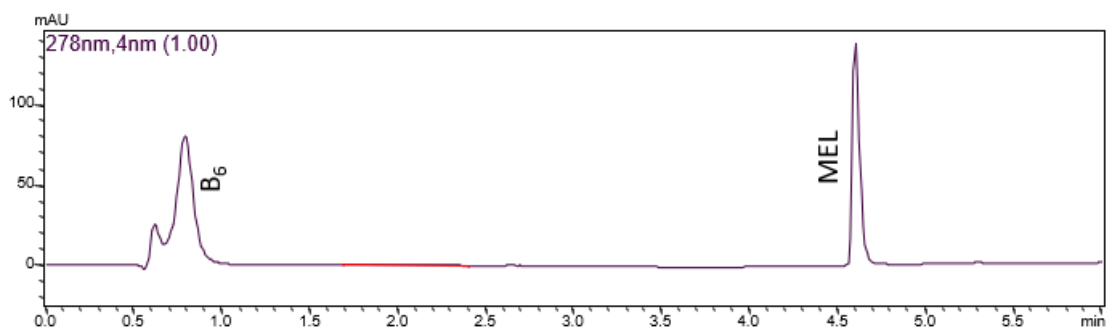
Obrázek 34: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 µm, 12 nm, za použití gradientu č. 1.

Jednotlivé látky na této koloně byly při gradientu č. 1 dostatečně odseparovány, ale pyridoxin tvořil dvojpík s mrtvým objemem díky jeho nízké retenci.



Obrázek 35: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 µm, 12 nm, za použití gradientu č. 2.

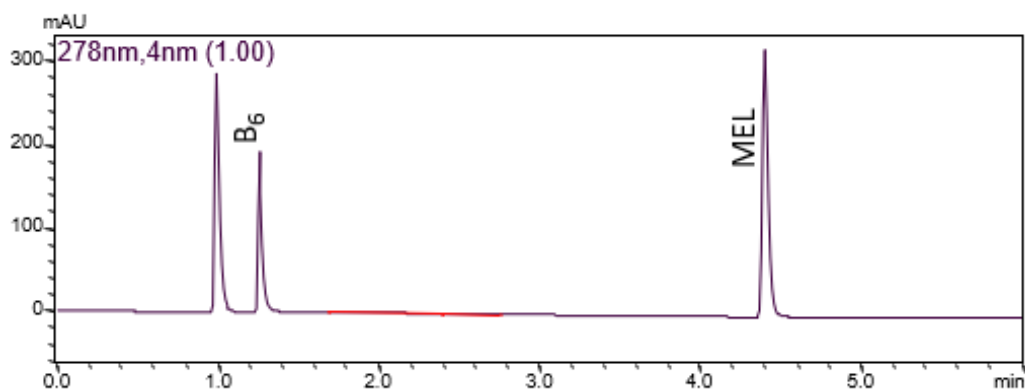
Jednotlivé látky na této koloně byly při gradientu č. 2 opět dostatečně odseparovány ale pyridoxin tvořil dvojpík.



Obrázek 36: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 µm, 12 nm, za použití gradientu č. 3.

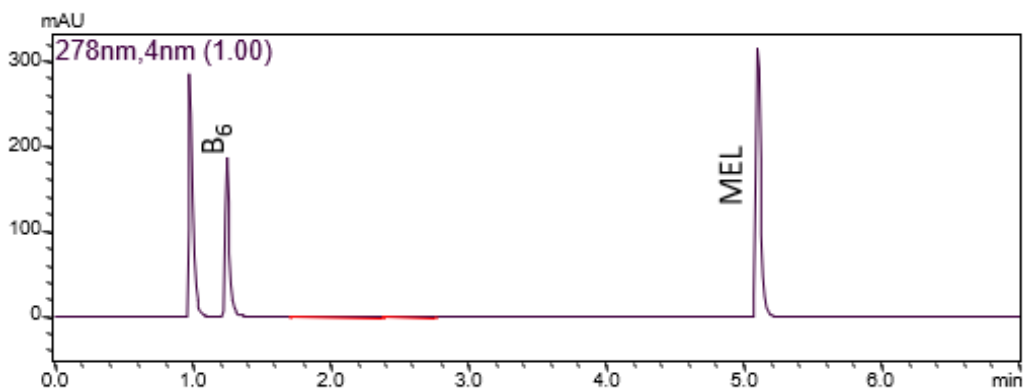
Jednotlivé látky na této koloně byly při gradientu č. 3 dostatečně odseparovány ale opět pyridoxin tvořil dvojpík.

Kolona č. 7 SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6mm, částice 2,7 μm



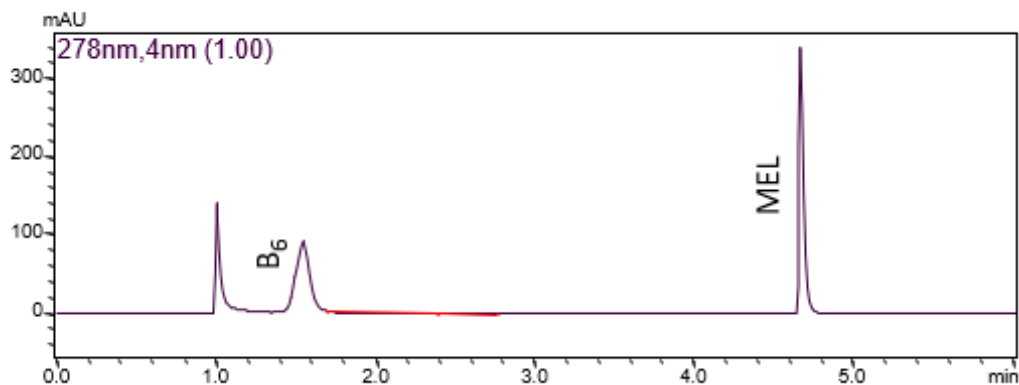
Obrázek 37: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm , za použití gradientu č. 1.

Obě látky byly při gradientu č. 1 dostatečně rozlišeny až na základní linii, zejména při dostatečné retenci B₆ od píku mrtvého objemu, proto byla kolona vyhodnocena jako optimální pro použití, s níž se pokračovalo v dalších krocích vývoje metody.



Obrázek 38: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm , za použití gradientu č. 2.

Obě látky byly při gradientu č. 2 dostatečně rozlišeny až na základní linii, proto byla kolona vyhodnocena jako optimální pro použití.



Obrázek 39: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm , za použití gradientu č. 3.

Na základě otestování všech třech gradientů v rámci 15 testovaných chromatografických kolon vyšla jako optimální kolona č. 7 SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, 2,7 μm velikost částic, s gradientem č. 1. Chromatogram vykazoval optimální retenční časy, došlo k separaci všech analytů, píky měly vhodnou symetrii a šířku. Ve srovnání s ostatními kolonami měla vybraná kolona lepší separační účinnost pro testované analyty a nedocházelo na ní k rozmývání zón.

Po nalezení optimální kolony a gradientu, byl gradient č. 1 poupraven, a to s cílem zrychlením celé analýzy. Průběh upraveného gradientu je znázorněn v tabulce 16.

Tabulka 16: Průběh finálního gradientu.

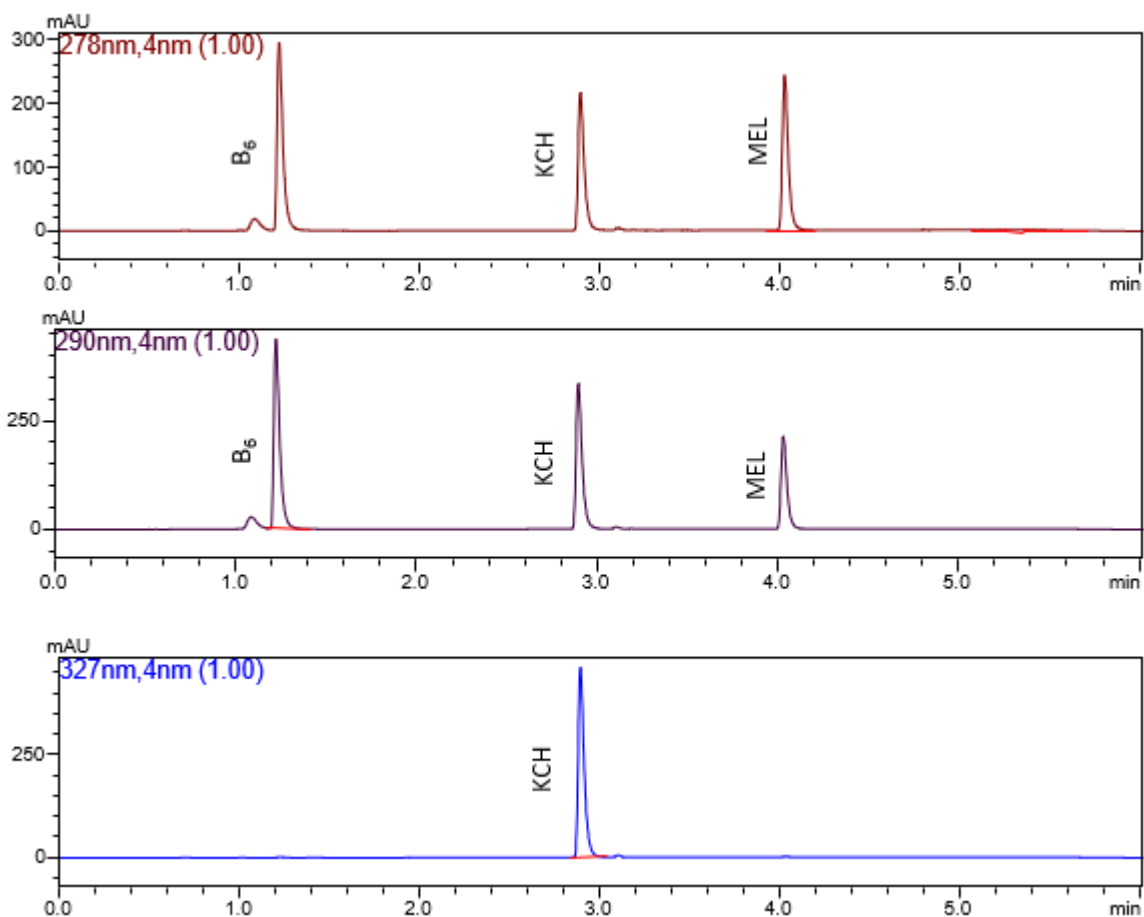
Průběh gradientu (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0,01	95
0,01–4,00	40
4,00–4,10	95
4,10–6,00	95

6.1.6 Shrnutí optimálního nastavení pro HPLC analýzu

Optimální podmínky, které byly zvoleny pro separaci jsou uvedené v následující tabulce spolu s chromatogramem demonstrující finální nastavení přístroje a optimální podmínky analýzy melatoninu, pyridoxinu a vnitřního standardu kyseliny chlorogenové. Za těchto podmínek byla metoda validována.

Tabulka 17: Podmínky pro optimální nastavení pro HPLC analýzu.

Typ stacionární fáze	SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm
Typ mobilní fáze	ACN/H ₂ O + H ₃ PO ₄ (pH 2,2)
Rychlost průtoku	1ml/min
Objem vzorku	5 μl
Teplota v kolonovém prostoru	30 °C
Režim analýzy	gradientový
Detekce	278, 290, a 327 nm



Obrázek 40: Chromatogram znázorňující separaci všech stanovovaných standardů za optimálních podmínek. Znárodně při vlnových délkách 278, 290, 327 nm kde jsou viditelné všechny analyty.

6.2 Validace vyvinuté metody za finálních podmínek

6.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

K hodnocení testu způsobilosti chromatografického systému byl využit pracovní roztok směsi standardů (viz kapitola 5.6.4), bylo provedeno 6 nástřiků. Byly hodnoceny parametry retenčního času, symetrie píků a jejich rozlišení, píkové kapacity pro gradientovou eluci.

Na obrázku 40 se nachází chromatogram za optimálních podmínek pro separaci.

Tabulka 18: Test způsobilosti chromatografického systému.

standardy	Rt	k	W _{h50}	As	Rs
B ₆	1,227	45,12	0,034	1,810	1,606
kys.chlorogenová – IS	2,888	43,86	0,034	1,717	26,836
MEL	4,017	45,12	0,035	1,598	18,065

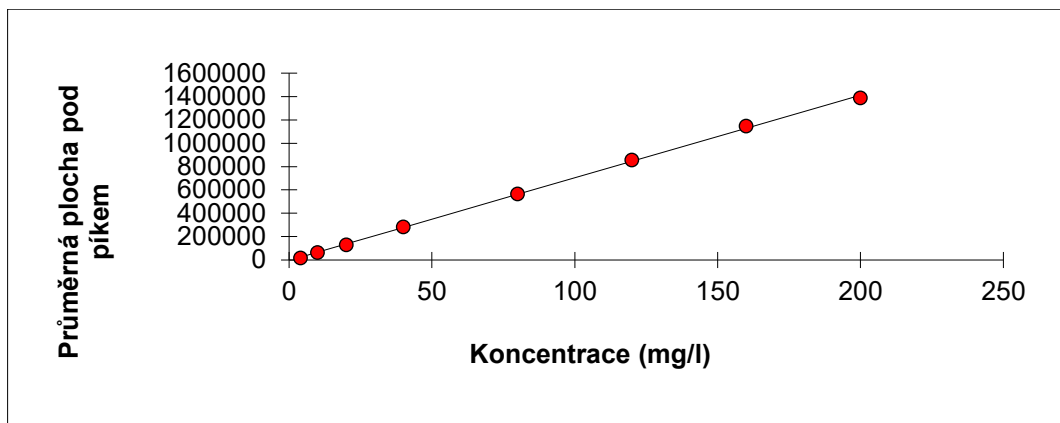
6.2.2 Linearita

Ke stanovení linearity byla připravena kalibrační řada roztoků standardů. Celkem bylo použito osm kalibračních hladin v koncentračním rozmezí od 4 do 200 mg/l (viz kapitola 5.6.6). Na každé koncentrační hladině byly provedeny tři nástřiky, z nichž se poté určily průměrné hodnoty ploch pod píky při vlnové délce absorpčních maxim analytů. Na vyhodnocení byla použita metoda lineární regrese, jako závislost průměru plochy pod píkem na koncentraci.

6.2.2.1 Kalibrační závislost melatoninu

Tabulka 19: Výsledky testu linearitu melatoninu.

mg/l	Průměrná plocha pod píkem
4	18430
10	63238
20	130137
40	284223
80	565783
120	856167
160	1146154
200	1388296



Obrázek 41: Kalibrační závislost melatoninu.

Tabulka 20: Parametry regrese melatoninu.

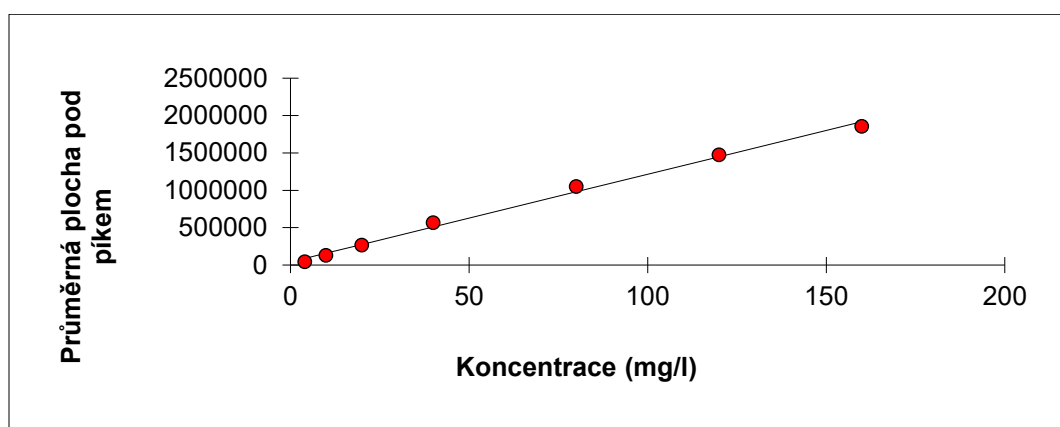
Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$				
Počet bodů	n =	8		Odhad chyby
Směrnice	k =	7077,574	±	69,58643
Absolutní člen	q =	-4344,214	±	7319,653
Korelační koeficient	r =	0,99971		
Reziduální odchylka	s =	13613,27		

V koncentračním rozmezí byl dosažen korelační koeficient 0,99971.

6.2.2.2 Kalibrační závislost pyridoxinu

Tabulka 21: Výsledky testu linearity pyridoxinu.

mg/l	Průměrná plocha pod píkem
4	41671
10	130932
20	264714
40	565021
80	1049004
120	1475011
160	1855026



Obrázek 42: Kalibrační závislost pyridoxinu.

Tabulka 22: Parametry regrese pyridoxinu.

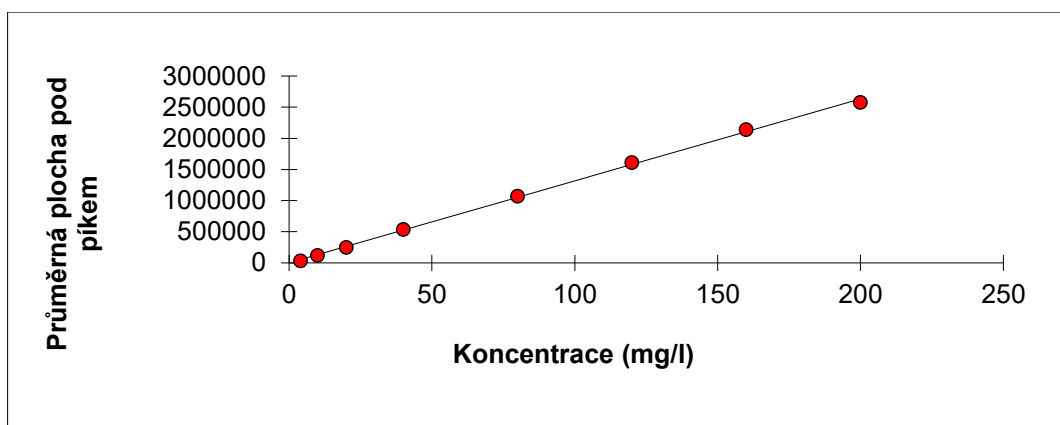
Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$				
Počet bodů	n =	7		Odhad chyby
Směrnice	k =	11729,52	±	378,6808
Absolutní člen	q =	41538,31	±	31525,85
Korelační koeficient	r =	0,997404		
Reziduální odchylka	s =	55664,79		

V koncentračním rozmezí byl dosažen korelační koeficient 0,997404.

6.2.2.3 Kalibrační závislost kyseliny chlorogenové

Tabulka 23: Výsledky testu linearit y kyseliny chlorogenové.

mg/l	Průměrná plocha pod píkem
4	36418
10	121329
20	248639
40	539052
80	1073116
120	1614062
160	2142185
200	2576362



Obrázek 43: Kalibrační závislost kyseliny chlorogenové.

Tabulka 24: Parametry regrese kyseliny chlorogenové.

Statistické parametry pro regresi: $y = k x + q$				
Počet bodů	n =	8		Odhad chyby
Směrnice	k =	13159,21	±	172,0262
Absolutní člen	q =	1027,633	±	18095,08
Korelační koeficient	r =	0,999488		
Reziduální odchylka	s =	33653,66		

V koncentračním rozmezí byl dosažen korelační koeficient 0,999488.

6.2.3 Opakovatelnost

Pro stanovení opakovatelnosti byly použity tři roztoky standardů melatoninu, pyridoxinu a kyseliny chlorogenové. Směsné roztoky byly připraveny v koncentrační hladinách 200 mg/ml, 80 mg/ml, 10 mg/ml. Pro každý standard a koncentrační hladinu bylo provedeno 7 nástřiků na kolonu, z kterých se poté stanovoval průměr, směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka.

Tabulka 25: Analýza opakovatelnosti roztoku standardů o koncentrační hladině 200 mg/ml.

	MEL	B₆	kys. chlorogenová
c (200 mg/ml)	1375808	1890135	2574426
	1376798	1894255	2580963
	1378414	1888090	2558552
	1385802	1860985	2584293
	1385837	1884319	2576017
	1385334	1879454	2577686
	1355525	1903040	2531624
Průměr	1377645	1885754	2569080
SD	10698	13235	18426
RSD (%)	0,78	0,70	0,72

Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí od 0,70 % do 0,78 %. Nejvyšší hodnoty dosáhla u melatoninu a nejnižší u pyridoxinu. RSD dosahovala hodnoty <1 %.

Tabulka 26: Analýza opakovatelnosti roztoku standardů o koncentrační hladině 80 mg/ml.

	MEL	B₆	kys. chlorogenová
c (80 mg/ml)	554350	988919	1047521
	552488	979200	1046624
	552912	977260	1046731
	552263	975651	1050992
	551894	962643	1045205
	553728	965050	1052414
	556803	980979	1059147
Průměr	553493	975673	1049805
SD	1692	9140	4855
RSD (%)	0,31	0,94	0,46

Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí od 0,31 % do 0,94 %. Nejvyšší hodnoty dosáhla u pyridoxinu a nejnižší u melatoninu. RSD dosahovala hodnoty <1 %.

Tabulka 27: Analýza opakovatelnosti roztoku standardů o koncentrační hladině 10 mg/ml.

	MEL	B₆	kys. chlorogenová
c (10 mg/ml)	75021	162662	144059
	76156	166927	145979
	74801	163599	144817
	75518	167729	146108
	75113	162435	144557
	74292	160306	143997
Průměr	75037	163943	144567
SD	653	2846	1258
RSD (%)	0,87	1,74	0,87

Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí od 0,87 % do 1,74 %. Nejvyšší hodnoty dosáhla u pyridoxinu a nejnižší pro melatonin. Vyšší hodnota u B₆ byla pravděpodobně způsobena horší symetrií píku a tím i ztížené integraci.

6.2.4 Přesnost

Určení přesnosti metody bylo stanoveno za použití přípravku Sleep Trip od společnosti TOZAX. Bylo připraveno a analyzováno 6 pracovních roztoků. Bylo připraveno šest navážek, které byly extrahovány do ultračisté vody. Každý připravený roztok byl třikrát nadávkován na kolonu a z tohoto měření byly získány průměrné plochy pod píky.

Tabulka 28: Přesnost metody pro přípravek Sleep Trip.

	MEL	B₆
Hodnoty ploch	349838	338996
	349727	371014
	350935	361787
	343557	337975
	354824	344011
	370629	369606
Průměr	353252	353898
SD	9251	15332
RSD (%)	2,62	4,33

Požadavek na RSD dosahoval hodnoty <5 % – byl splněn.

6.2.5 Správnost

Pro ověření správnosti metody byly analyzovány vzorky z přípravku Sleep Trip od společnosti TOZAX pomocí metody standardního přípravku.

Šest tablet přípravku Sleep Trip bylo zváženo, jejichž hmotnost byla celkem 1483,75 mg a následně byla stanovená průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 247,29 mg. Tablety byly rozetřeny a homogenizovány v třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita ½ tablety, tj. 123,65 mg. Připraveno a analyzováno bylo 6 roztoků vzorků s přidavkem standardu, tři roztoky samotných vzorků a směs standardů. Roztoky byly připraveny dle kapitoly – viz kapitola 5.6.8. Pro každý roztok byly provedeny tři nástřiky na kolonu. Z výsledných hodnot ploch píků vzorku byla pro každý roztok vypočítána průměrná plocha píku. Výtěžnost byla vypočítána z výsledných hodnot ploch píků, a to pomocí rozdílu a poměru ploch pracovních roztoků s přidavkem standardů a bez přidavku standardů v přípravku vůči plochám samotných měřených standardů v jejich připravené směsi.

Výtěžnost byla vypočítána podle vzorce:

$$R_v = \left(\frac{A_{vz+st} - A_{vz}}{A_{st}} \right) \times 100, \text{ kde}$$

R_v – výtěžnost v %;

A_{vz} – plocha píku vzorku;

A_{st} – plocha píku standardu.

Tabulka 29: Správnost metody pro přípravek Sleep Trip.

Správnost	MEL	B ₆
Hodnoty výtěžnosti (%)	105,44	99,10
	104,98	99,66
	106,41	101,13
	106,47	91,70
	104,09	85,01
	101,84	86,69
Průměr (%)	104,87	93,88
SD	1,74	7,05
RSD (%)	1,65	7,51

6.3 Stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích

Vyvinutá analytická metoda byla použita ke stanovení účinných látek v potravních doplňcích. V jednotlivých doplňcích byla zkoumána přítomnost melatoninu a pyridoxinu, pro které byla metoda vyvinuta. Celkem se jednalo o 9 potravních doplňků, konkrétně Tozax Sleep Trip, Clinical Melatonin B₆ sirup, Fast Sleep s melatoninem, Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex, Allegra Melatonin, Clinical Melatonin Forte, Allnature Melatonin, Nutricius Melatonin new extra a Clinical Melatonin B₆ Gummies. Dále byl porovnáván deklarovaný obsah melatoninu, popřípadě pyridoxinu, se skutečně přítomným dle informací nalezených na obalu u jednotlivých potravních doplňků. Každý doplněk obsahoval odlišné množství stanovovaných analytů. Zastoupení jednotlivých látek je demonstrováno v tabulce 30.

Tabulka 30: Souhrn zastoupení jednotlivých látek v analyzovaných přípravcích.

	MEL	B ₆
Tozax Sleep Trip	✓	✓
Clinical Melatonin B ₆ sirup	✓	✓
Fast Sleep s melatoninem	✓	✗
Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex	✓	✗
Allegra Melatonin	✓	✗
Clinical Melatonin Forte	✓	✗
Allnature melatonin	✓	✗
Nutricius Melatonin new extra	✓	✗
Clinical Melatonin B ₆ Gummies	✓	✓

Od jednotlivých testovaných doplňků stravy bylo třikrát naváženo průměrné množství určitého doplňku v miligramech. Příprava vzorků je popsána v kapitole 5.7.

Každý z těchto vzorků byl třikrát nadávkován na kolonu a změřen. Ze získaných ploch píků byl stanoven jejich průměr. Podle vzorce byl z průměrů naměřených hodnot vypočítán obsah obou stanovovaných látek v mg. Poté bylo z průměrného obsahu látek v jedné tabletě přípravku vypočítáno, kolik procent deklarovaného množství tableta opravdu obsahuje.

6.3.1 Stanovení obsahu potravního doplňku Tozax Sleep Trip

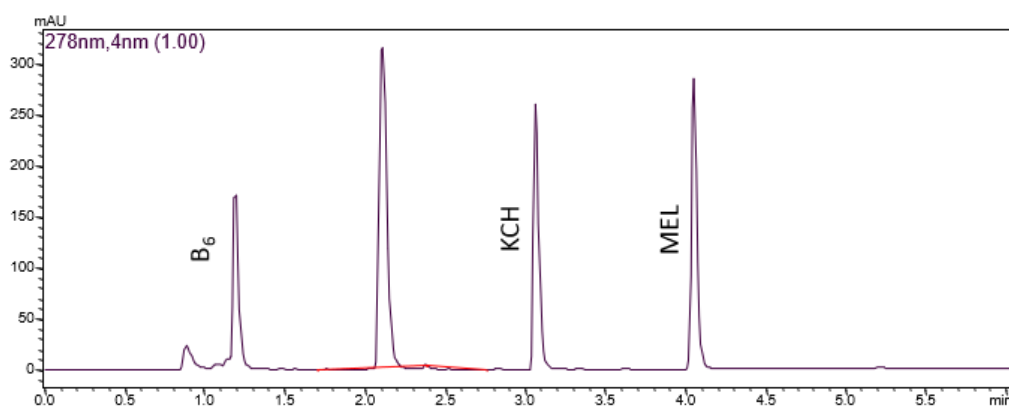
Výrobce na obalu přípravku deklaruje 1 mg melatoninu a 0,545 mg pyridoxinu v jedné tabletě. Byly připraveny celkem tři extrahované vzorky, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.7. Deklarovaný obsah látek v potravním doplňku je uvedeno v tabulce 31. Průměrná hmotnost jedné tablety byla 231,26 mg.

Průměrný obsah melatoninu získaný danou metodou byl 1,07 mg. Toto množství odpovídá 107,00 % deklarovaného množství.

Průměrný obsah pyridoxinu získaný danou metodou byl 0,85 mg. Toto množství odpovídá 156,00 % deklarovaného množství. Navíc byla v přípravku zjištěna i další forma B₆ či případné pomocné barvivo.

Tabulka 31: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Tozax Sleep Trip.

Vzorek Tozax Sleep Trip	Deklarovaný obsah (mg/tbl.)	Zjištěný obsah (mg)	Zjištěný obsah (%)
MEL	1	1,07	107,00
B ₆	0,545	0,85	156,00



Obrázek 44: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Tozax Sleep Trip.

6.3.2 Stanovení obsahu potravního doplňku Clinical Melatonin B₆ sirup

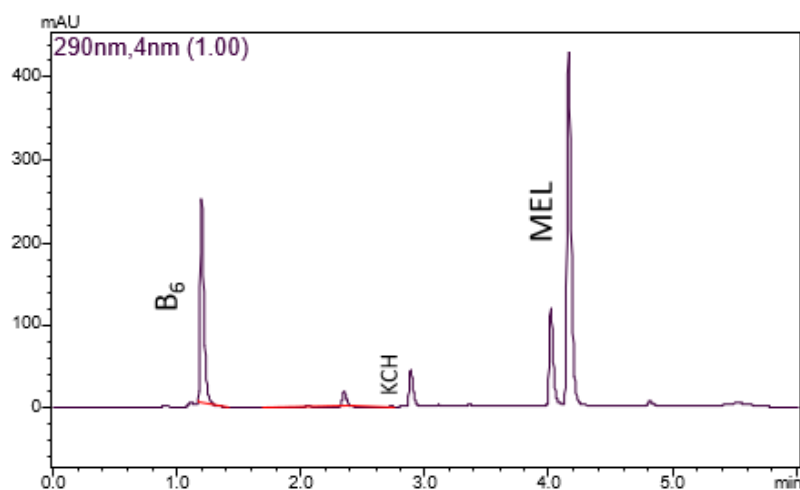
Výrobce na obalu přípravku deklaruje 1 mg melatoninu a 0,7 mg pyridoxinu v jedné dávce – 2,5 ml. Byly připraveny celkem tři extrahované vzorky jejichž příprava je popsána v kapitole 5.7.1. Deklarovaný obsah látek v potravním doplňku je uvedeno v tabulce 32.

Průměrný obsah melatoninu získaný danou metodou byl 1,36 mg. Toto množství odpovídá 136 % deklarovaného množství.

Průměrný obsah pyridoxinu získaný danou metodou byl 0,13 mg. Toto množství odpovídá 18,57 % deklarovaného množství.

Tabulka 32: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Clinical Melatonin B₆ sirup.

Vzorek	Deklarovaný obsah (mg/2,5 ml)	Zjištěný obsah (mg)	Zjištěný obsah (%)
Clinical Melatonin B ₆ sirup			
MEL	1	1,36	136,00
B ₆	0,7	0,13	18,57



Obrázek 45: Chromatogram znázorňující potravní doplněk Clinical Melatonin B₆ sirup.

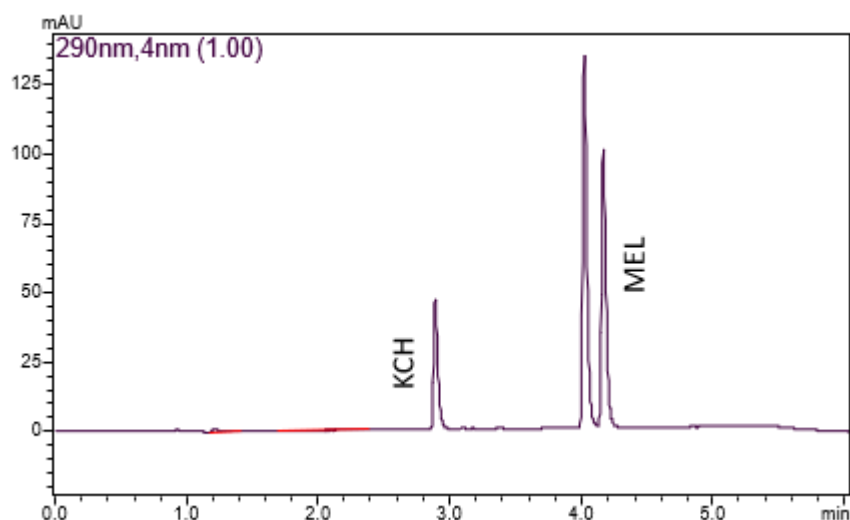
6.3.3 Stanovení obsahu potravního doplňku Fast Sleep s melatoninem

Výrobce na obalu přípravku deklaruje 1 mg melatoninu ve dvou dávkách. Byly připraveny celkem tři vzorky, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.7.2. Deklarovaný obsah látky v potravním doplňku je uvedeno v tabulce 33. Hmotnost 2 dávek neboli vstříků byla 454 mg vzorku.

Průměrný obsah melatoninu získaný danou metodou byl 2,83 mg. Toto množství odpovídá 283 % deklarovaneho obsahu na dávku dvou vstříků. Vyšší hodnoty melatoninu byly částečně zapříčiněny kvůli nepřesnosti dávkování. Avšak i přesto je zřejmé, že zjištěné hodnoty značně překračují hodnoty deklarované. Navíc přípravek obsahuje další neuvedenou látku. Může se jednat o barvivo či další formu B₆.

Tabulka 33: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Fast Sleep s melatoninem.

Vzorek Fast Sleep s melatoninem	Deklarovaný obsah (mg/2 vstříky)	Zjištěný obsah (mg)	Zjištěný obsah (%)
Mel	1	2,83	283,00
B ₆	–	–	–



Obrázek 46: Chromatogram znázorňující potravní doplněk Fast Sleep.

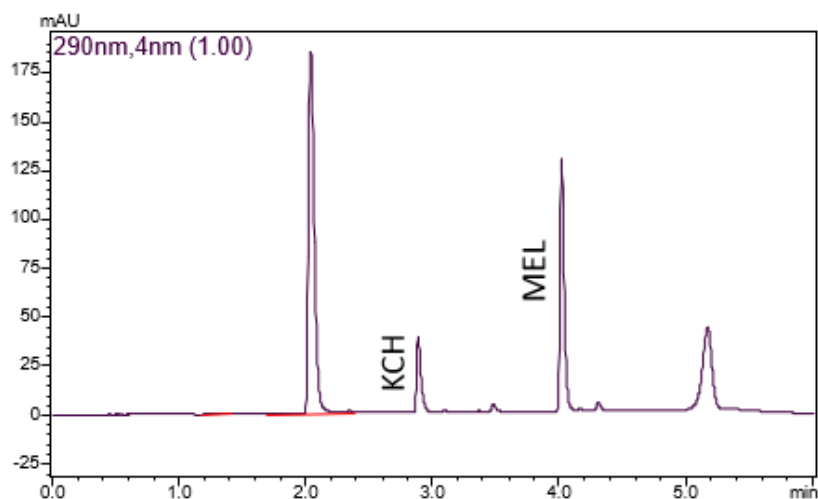
6.3.4 Stanovení obsahu potravního doplňku Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex

Výrobce na obalu přípravku deklaruje 1 mg melatoninu v jedné tabletě. Byly připraveny celkem tři extrahované vzorky jejichž příprava je popsána v kapitole 5.7. Deklarovaný obsah látky v potravním doplňku je uvedeno v tabulce 34. Průměrná hmotnost jedné tablety byla 148,47 mg.

Průměrný obsah melatoninu získaný danou metodou byl 0,93 mg. Toto množství odpovídá 93,00 % deklarovaneho množství. Navíc byla v přípravku zjištěna i další forma B₆.

Tabulka 34: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex.

Vzorek Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex	Deklarovaný obsah (mg/tbl.)	Zjištěný obsah (mg)	Zjištěný obsah (%)
MEL	1	0,93	93,00
B ₆	–	–	–



Obrázek 47: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex.

6.3.5 Stanovení obsahu potravního doplňku Allegra Melatonin

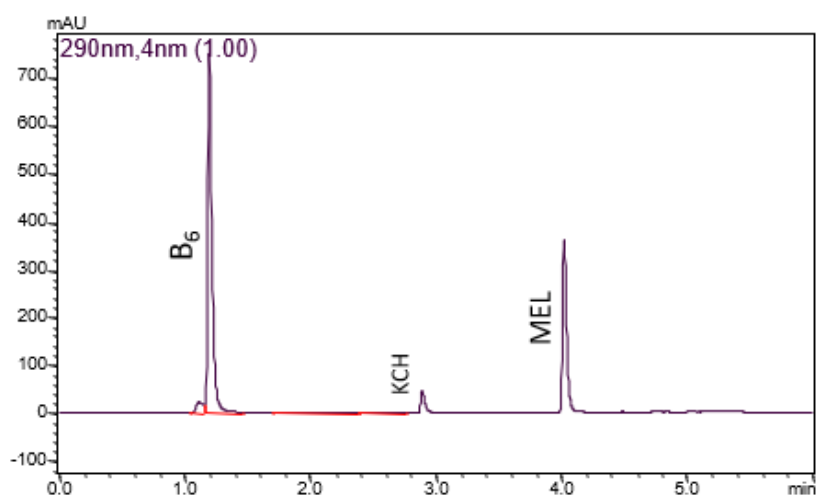
Výrobce na obalu přípravku deklaruje 3 mg v jedné tabletě. Byly připraveny celkem tři extrahované vzorky, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.7. Deklarovaný obsah látky v potravním doplňku je uvedeno v tabulce 35. Průměrná hmotnost jedné tablety byla 449,83 mg.

Průměrný obsah melatoninu získaný danou metodou byl 2,71 mg. Toto množství odpovídá 90,33 % deklarovaného množství.

Průměrný obsah pyridoxinu získaný danou metodou byl 3,10 mg. Obsah pyridoxinu v přípravku nebyl specifikován, takže nelze hodnotit shodu s deklarovaným množstvím.

Tabulka 35: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Allegra Melatonin.

Vzorek	Deklarovaný obsah (mg/tbl.)	Zjištěný obsah (mg)	Zjištěný obsah (%)
Allegra Melatonin			
MEL	3	2,71	90,33
B ₆	–	3,10	–



Obrázek 48: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Allegra Melatonin.

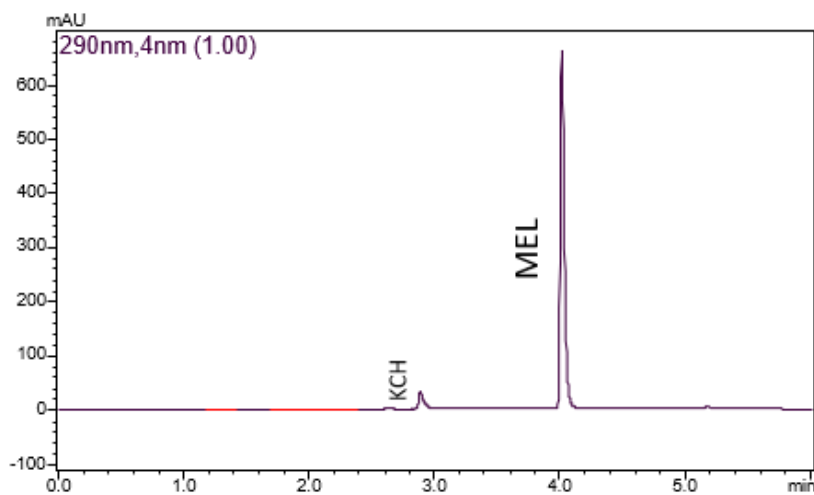
6.3.6 Stanovení obsahu potravního doplňku Clinical Melatonin Forte

Výrobce na obalu přípravku deklaruje 5 mg melatoninu v jedné tabletě. Byly připraveny celkem tři vyextrahované vzorky, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.7. Deklarovaný obsah látky v potravním doplňku je uvedeno v tabulce 36. Průměrná hmotnost jedné tablety byla 314,63 mg.

Průměrný obsah melatoninu získaný danou metodou byl 4,82 mg. Toto množství odpovídá 96,40 % deklarovaneho množství.

Tabulka 36: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Clinical Melatonin Forte.

Vzorek	Deklarovaný obsah (mg/tbl.)	Zjištěný obsah (mg)	Zjištěný obsah (%)
Clinical Melatonin Forte			
MEL	5	4,82	96,40
B ₆	–	–	–



Obrázek 49: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Clinical Melatonin Forte.

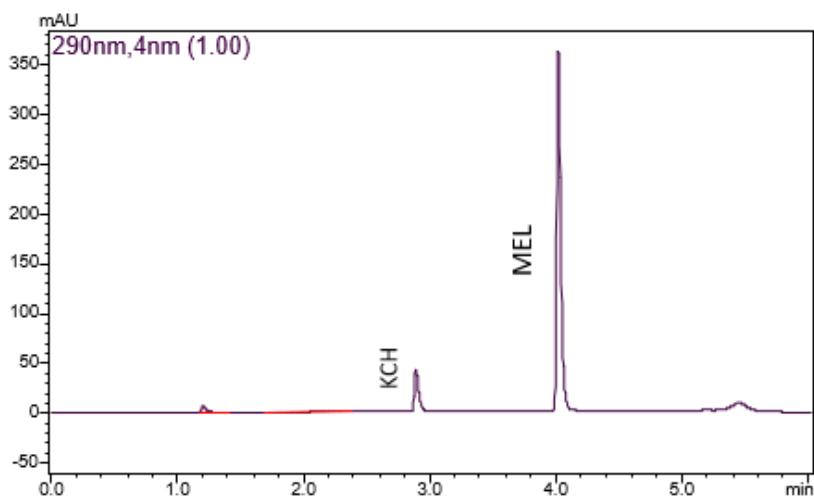
6.3.7 Stanovení obsahu potravního doplňku Allnature Melatonin

Výrobce na obalu přípravku deklaruje 2 mg melatoninu v jedné tabletě. Byly připraveny celkem tři extrahované vzorky jejichž příprava je popsána v kapitole 5.7. Deklarovaný obsah látky v potravním doplňku je uveden v tabulce 37. Průměrná hmotnost jedné tablety byla 250,23 mg.

Průměrný obsah melatoninu získaný danou metodou byl 2,66 mg. Toto množství odpovídá 133,00 % deklarováného množství.

Tabulka 37: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Allnature Melatonin.

Vzorek	Deklarovaný obsah (mg/tbl.)	Zjištěný obsah (mg)	Zjištěný obsah (%)
Allnature Melatonin	2	2,66	133,00
MEL	2	2,66	133,00
B ₆	–	–	–



Obrázek 50: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Allnature Melatonin.

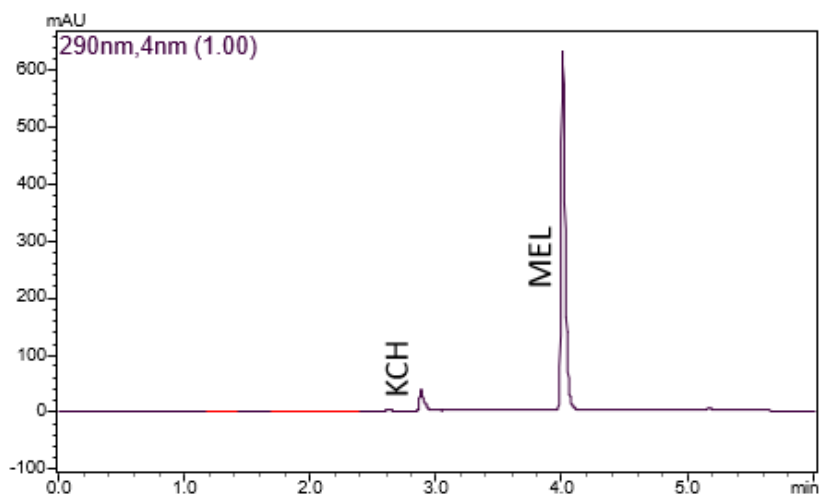
6.3.8 Stanovení obsahu potravního doplňku Nutricius Melatonin new extra

Výrobce na obalu přípravku deklaruje 5 mg melatoninu v jedné tabletě. Byly připraveny celkem tři vyextrahované vzorky, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.7. Deklarovaný obsah látky v potravním doplňku je uveden v tabulce 38. Průměrná hmotnost jedné tablety byla 250,23 mg.

Průměrný obsah melatoninu získaný danou metodou byl 4,59 mg. Toto množství odpovídá 91,80 % deklarovaneho množství.

Tabulka 38: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Nutricius Melatonin new extra.

Vzorek	Deklarovaný obsah (mg/tbl.)	Zjištěný obsah (mg)	Zjištěný obsah (%)
Nutricius Melatonin new extra			
MEL	5	4,59	91,80
B ₆	–	–	–



Obrázek 51: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Nutricius Melatonin new extra.

6.3.9 Stanovení obsahu potravního doplňku Clinical Melatonin B₆ Gummies

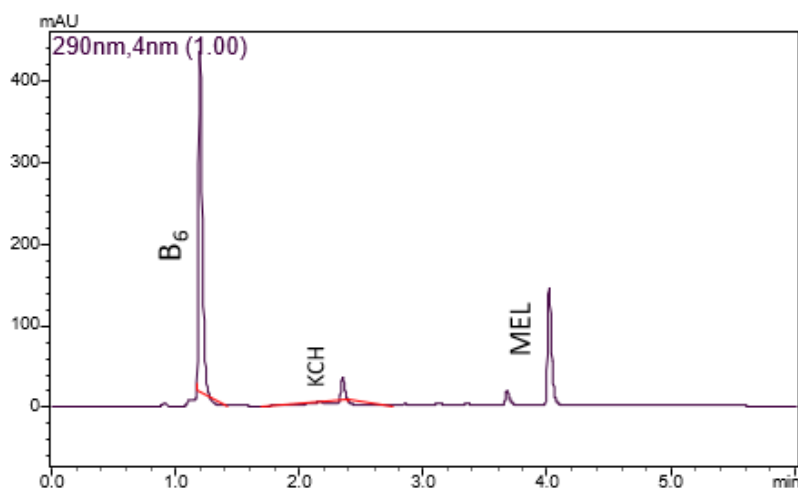
Výrobce na obalu přípravku deklaruje 1 mg melatoninu a 1,4 mg pyridoxinu v jednom bonbónu. Byly připraveny celkem tři vyextrahované vzorky, jejichž příprava je popsána v kapitole 5.7.3. Deklarovaný obsah látek v potravním doplňku je uveden v tabulce 39.

Průměrný obsah melatoninu získaný danou metodou byl 1,13 mg. Toto množství odpovídá 113,00 % deklarovaného množství.

Průměrný obsah pyridoxinu získaný danou metodou byl 2,31 mg. Toto množství odpovídá 165,00 % deklarovaného množství.

Tabulka 39: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Clinical Melatonin B₆ Gummies.

Vzorek	Deklarovaný obsah (mg/bonbón)	Zjištěný obsah (mg)	Zjištěný obsah (%)
Clinical Melatonin B ₆ Gummies			
MEL	1	1,13	113,00
B ₆	1,4	2,31	165,00



Obrázek 52: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Clinical Melatonin B₆ Gummies.

6.4 Souhrn stanovení obsahu účinných látek v potravních doplňcích

Tabulka 40: Souhrn zjištěných hodnot v doporučené denní dávce ve vybraných doplňcích stravy, obsahujících melatonin či pyridoxin.

Testované potravní doplňky	Zjištěné množství v (mg) / deklarované množství v % v doporučené denní dávce			
	MEL		B ₆	
Tozax Sleep Trip	1,07	107,00	0,85	156,00
Clinical Melatonin B ₆ sirup	1,36	136,00	0,13	18,57
Fast Sleep s melatoninem	2,83	283,00	–	–
Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex	0,93	93,00	–	–
Allegra Melatonin	2,71	90,33	3,10	NS*
Clinical Melatonin Forte	4,82	96,40	–	–
Allnature Melatonin	2,66	133,00	–	–
Nutricius Melatonin new extra	4,59	91,80	–	–
Clinical Melatonin B ₆ Gummies	1,13	113,00	2,31	165,00

*NS – výrobce neuvádí ani nespecifikuje obsah B₆

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala stanovením obsahu melatoninu a vitamínu B₆ v devíti testovaných potravních doplňcích pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Kvůli častému výskytu vitamínu B₆ na obalu doplňků stravy byla tato práce nad rámec zaměřena také na stanovení obsahu pyridoxinu, který je jedním ze třech derivátů vitamínu B₆. Tento vitamín je přidáván ke složení kvůli svému pozitivnímu účinku na normální činnost nervové soustavy. Pro analyzované látky byla vyvinuta, optimalizována a validována chromatografická metoda. Pro tuto metodu byla použita gradientová eluce, která trvala celkem 6 minut za pomoci dvou mobilních fází, mobilní organické fáze acetonitrilu a vodné fáze 0,085% kyseliny fosforečné. Eluce probíhala při teplotě 30 °C na analytické koloně SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm s velikostí částic 2,7 μm. Analýza stanovovaných látek probíhala průtokem 1ml/min, zvolený nástřik na kolonu byl 5 μl. Detekce probíhala pomocí detektoru diodového pole při vlnových délkách pro melatonin – 278 nm a pro pyridoxin 290 nm.

Výsledky stanovení obsahu testovaných potravních doplňků byly sumarizovány v tabulce 40. Z námi vybraných potravních doplňků lze považovat za přípravek, který se nejvíce přiblížil hodnotám deklarovaným výrobcem, doplněk stravy Clinical Melatonin Forte. V tomto přípravku výrobce deklaruje 5 mg melatoninu, kdy naměřený obsah byl 4,83 mg, což odpovídá 96,40 % množství v doporučené denní dávce.

Potravní doplňky, které se pohybovaly taktéž u blízkých hodnot deklarovaných výrobcem byly například Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex, jehož deklarované množství na obalu bylo 1 mg melatoninu a naměřený obsah činil 0,93 mg nebo také Nutricius Melatonin new extra, kde byl vyhodnocen obsah melatoninu 4,59 mg a deklarované množství bylo 5 mg.

Naopak nejvíce odlišné množství měl přípravek Fast Sleep s melatoninem, který obsahoval téměř trojnásobné množství melatoninu v dávce dvou vstříků. Léková forma tohoto přípravku byl ústní sprej a vyšší hodnoty mohly být zapříčiněny nepřesností v dávkování. Přesto však je obsah zcela jistě nadlimitní, jelikož zkouška opakovatelnosti dávkování 20 vstříků dle hmotnosti vycházela poměrně reprodukovatelně.

Při analýze všech testovaných vzorků byla u každého z nich zjištěna přítomnost stanovovaných látek, ale ani u jednoho nebyl deklarovaný obsah dodržen. U přípravku Allegra Melatonin bylo navíc zjištěno množství vitamínu B₆, které výrobce ve svém složení neuvádí. Doplnky stravy však dle platných právních předpisů negarantují obsah účinných látek.

V minulosti Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL) zaznamenal na trhu v České republice zvýšený výskyt nelegálních přípravků s obsahem účinné látky melatonin (tzn. přípravek, který je v rozporu s legislativou a není registrován na území ČR, výrobek může obsahovat léčivou látku, a jeho identita a/nebo původ nejsou úmyslně a podvodně označeny, ale jedná se o výrobek se svým názvem (63)). Melatonin totiž patří mezi farmakologicky účinné látky, která může zapříčinit řadu rizik při užívání bez lékařského dohledu, a to možné lékové interakce či nežádoucí účinky, které mohou negativně ovlivnit pacientovo zdraví (64).

Výroba doplňků stravy s melatoninem je nyní v České republice zakázána, a proto všechny výrobky pocházejí pouze z dovozu. Perorální výrobky Ústav klasifikuje jako léčivé přípravky a pokud zjistí, že na trhu jsou tyto výrobky uváděné jako doplňky stravy, zahájí správní řízení. Vzhledem k tomu, že doplňky stravy reguluje Ministerstvo zemědělství a ne SÚKL, dochází k situacím, kdy potravní doplňky obsahují látky v takových dávkách, kdy výrobky by již měly být klasifikovány jako léčivé přípravky (65). Výrobky jsou považovány za léčivé přípravky, pokud splňují všechny znaky alespoň jedné z definic léčivého přípravku, které jsou uvedené v ustanovení § 2 odst. 1 zákona o léčivech, a tím pádem podléhají registraci. Žádný zákon ani právní předpis neříká, jaká je hraniční hodnota obsahu melatoninu rozhodující o tom, zda je či není výrobek léčivý přípravek. Každopádně Ústavem posuzované výrobky charakterizované jako léčivé přípravky, obsahovaly 0,98 mg a více v jedné denní dávce. Správnímu řízení podléhá každý melatoninový doplněk stravy zvlášť (66).

SÚKL na svých webových stránkách zveřejňuje výrobky přeřazené do skupiny léčiv, které podlely registraci, ale ta jim nebyla udělena, protože u nich nebyla prověřena bezpečnost, kvalita a účinnost. Tyto výrobky musí být staženy z trhu (67). Výrobci tyto situace řeší například tím, že pouze pozmění jeden údaj na obalu, například zredukuje dávkování, aby se ze zakázaného výrobku stal nový, který lze uvést na trh.

V poslední době se doplňkům stravy s obsahem melatoninu více věnovala mediální pozornost, protože tyto přípravky byly vnímány jako problematické a stále více lidí v České republice je užívá. Proto dne 14. března 2023 SÚKL oznámil změnu v rozhodovací praxi v případě výrobků obsahující látku melatonin, kde považuje výrobky s doporučenou denní dávkou 0,5 mg a vyšší, podávané perorálně za léčivé přípravky. Perorální výrobky obsahující denní dávku nižší než 0,5 mg melatoninu Ústav nepovažuje za léčivé přípravky, protože hladiny látky v séru jsou po užití blízké hladinám po konzumaci některých potravin (68).

Všechny testované vzorky v této diplomové práci obsahovaly vyšší hodnoty než 0,5 mg melatoninu v denní dávce, proto jsou přeřazeny do skupiny léčiv viz výše, ale při registračním řízení nebyla prokázána bezpečnost, kvalita a účinnost, takže musely být staženy z trhu. Například výrobce vzorku Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex změnil na obalu pouze doporučenou denní dávku, kdy jedna tableta obsahuje stejné množství melatoninu jako předtím – 1 mg, ale denní dávka není celá tableta, ale ½ tablety – 0,49 mg (69). Kvůli této změně přípravek není možné brát jako léčivý přípravek a nepodléhá registraci. Celá tato problematika tedy otevírá širší prostor, který je však již nad rámec této diplomové práce.

8 Seznam obrázků a tabulek

8.1 Seznam obrázků

Obrázek 1: Molekulový vzorec melatoninu.	13
Obrázek 2: Schéma syntézy melatoninu z aminokyseliny L-tryptofan (obrázek převzat ze zdroje (10)).	14
Obrázek 3: Cirkadiánní profil plazmatických koncentrací melatoninu (obrázek převzat ze zdroje (9)).	15
Obrázek 4: Molekulový vzorec pyridoxinu.	19
Obrázek 5: Molekulový vzorec pyridoxalu (vlevo) a pyridoxaminu (vpravo).	20
Obrázek 6: Schéma a popis HPLC systému (obrázek převzat a upraven ze zdroje (71)).	22
Obrázek 7: Chromatografická kolona SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 µm. (obrázek převzat ze zdroje (35)).	24
Obrázek 8: Schéma znázornění povrchu silikagelu (obrázek převzat ze zdroje (33)). ...	26
Obrázek 9: Modifikace povrchových silanolových skupin (obrázek převzat ze zdroje (33)).	28
Obrázek 10: Struktura stacionární fáze náplňové (a) a monolitické (b) kolony (obrázek převzat ze zdroje (44)).	29
Obrázek 11: Testované doplňky stravy (obrázky převzaty a upraveny z webových stránek prodejců (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62)).	35
Obrázek 12: Absorpční spektrum melatoninu.	44
Obrázek 13: Absorpční spektrum pyridoxinu.	44
Obrázek 14: Absorpční spektrum kyseliny chlorogenové.	45
Obrázek 15: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm, ACN/kyselina fosforečná 0,085% (20/80).	46
Obrázek 16: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm, ACN/kyselina fosforečná 0,085% (40/60).	46
Obrázek 17: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm, ACN/H ₂ O (20/80).	46
Obrázek 18: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm, ACN/H ₂ O (40/60).	47
Obrázek 19: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm, MeOH/H ₂ O (30/70).	47

Obrázek 20: YMC Triart C-18 100*4,6 mm, částice 5 µm MeOH/kyselina fosforečná 0,085% (30/70).....	47
Obrázek 21: SUPELCO Ascentis Express RP-Amide 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (30/70).....	48
Obrázek 22: SUPELCO Ascentis Express RP-Amide 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (40/60).....	48
Obrázek 23: YMC Triart C-18 ExRS 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (20/80).....	49
Obrázek 24: YMC Triart C-18 ExRS 100*4,6 mm, částice 5 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (40/60).....	49
Obrázek 25: KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, částice 2,6 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (30/70).....	49
Obrázek 26: SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9µm, 12 nm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (30/70).....	50
Obrázek 27: SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 µm ACN/kyselina fosforečná 0,085% (30/70).....	50
Obrázek 28: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 50*4,6 mm, částice 5 µm, za použití gradientu č. 1.....	54
Obrázek 29: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 50*4,6 mm, částice 5 µm, za použití gradientu č. 2.....	54
Obrázek 30: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 50*4,6 mm, částice 5 µm, za použití gradientu č. 3.....	54
Obrázek 31: Chromatogram separace na koloně KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, částice 2,6 µm za použití gradientu č. 1.....	55
Obrázek 32: Chromatogram separace na koloně KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, 2,6 µm za použití gradientu č. 2.....	55
Obrázek 33: Chromatogram separace na koloně KINETEX EVO C-18 50*4,6 mm, částice 2,6 µm za použití gradientu č. 3.....	55
Obrázek 34: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 µm, 12 nm, za použití gradientu č. 1.....	56
Obrázek 35: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 µm, 12 nm, za použití gradientu č. 2.....	56

Obrázek 36: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Titan C-18 50*3,0 mm, částice 1,9 μm, 12 nm, za použití gradientu č. 3.	56
Obrázek 37: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm, za použití gradientu č. 1.	57
Obrázek 38: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm, za použití gradientu č. 2.	57
Obrázek 39: Chromatogram separace na koloně SUPELCO Ascentis Express C-18 100*4,6 mm, částice 2,7 μm, za použití gradientu č. 3.	58
Obrázek 40: Chromatogram znázorňující separaci všech stanovovaných standardů za optimálních podmínek. Znázorněno při vlnových délkách 278, 290, 327 nm kde jsou viditelné všechny analyty.....	59
Obrázek 41: Kalibrační závislost melatoninu.	61
Obrázek 42: Kalibrační závislost pyridoxinu.	62
Obrázek 43: Kalibrační závislost kyseliny chlorogenové.....	63
Obrázek 44: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Tozax Sleep Trip.	70
Obrázek 45: Chromatogram znázorňující potravní doplněk Clinical Melatonin B ₆ sirup.	71
Obrázek 46: Chromatogram znázorňující potravní doplněk Fast Sleep.	72
Obrázek 47: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex.....	73
Obrázek 48: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Allegra Melatonin.....	74
Obrázek 49: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Clinical Melatonin Forte.....	75
Obrázek 50: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Allnature Melatonin.....	76
Obrázek 51: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Nutricius Melatonin new extra.	77
Obrázek 52: Chromatogram znázorňující separaci potravního doplňku Clinical Melatonin B ₆ Gummies.....	78

8.2 Seznam tabulek

Tabulka 1: Nežádoucí účinky melatoninu (18) (19).....	18
Tabulka 2: Doporučené denní dávky vitamínu B ₆ (2).....	21
Tabulka 3: Náplňové kolony – rozdělení dle charakteru částic (33).	25
Tabulka 4: Charaktery modifikovaných stacionárních fází (34).	28
Tabulka 5: Přehled studií a podmínek separace a stanovení melatoninu a pyridoxinu.	31
Tabulka 6: Deklarovaný obsah látek v testovaných potravních doplňcích.	36
Tabulka 7: Příprava zásobních roztoků standardů.	37
Tabulka 8: Ředění kalibračních roztoků standardů.	38
Tabulka 9: Průběh finálního gradientu použitého pro validaci metody.	41
Tabulka 10: Vlnové délky, při kterých byly detekovány konkrétní analyzované látky.	45
Tabulka 11: Seznam vnitřních standardů.	51
Tabulka 12: Průběh gradientu č. 1.	52
Tabulka 13: Průběh gradientu č. 2.	52
Tabulka 14: Průběh gradientu č. 3.	52
Tabulka 15: Seznam testovaných kolon.	53
Tabulka 16: Průběh finálního gradientu.	58
Tabulka 17: Podmínky pro optimální nastavení pro HPLC analýzu.	59
Tabulka 18: Test způsobilosti chromatografického systému.	60
Tabulka 19: Výsledky testu linearity melatoninu.	61
Tabulka 20: Parametry regrese melatoninu.	61
Tabulka 21: Výsledky testu linearity pyridoxinu.	62
Tabulka 22: Parametry regrese pyridoxinu.	62
Tabulka 23: Výsledky testu linearity kyseliny chlorogenové.	63
Tabulka 24: Parametry regrese kyseliny chlorogenové.	63
Tabulka 25: Analýza opakovatelnosti roztoku standardů o koncentrační hladině 200 mg/ml.	64
Tabulka 26: Analýza opakovatelnosti roztoku standardů o koncentrační hladině 80 mg/ml.	65
Tabulka 27: Analýza opakovatelnosti roztoku standardů o koncentrační hladině 10 mg/ml.	65
Tabulka 28: Přesnost metody pro přípravek Sleep Trip.	66

Tabulka 29: Správnost metody pro přípravek Sleep Trip.	67
Tabulka 30: Souhrn zastoupení jednotlivých látek v analyzovaných přípravcích.....	68
Tabulka 31: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Tozax Sleep Trip.	70
Tabulka 32: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Clinical Melatonin B ₆ sirup.	71
Tabulka 33: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Fast Sleep s melatoninem.	72
Tabulka 34: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Satulem Pharma Melatonin Rapid komplex.....	73
Tabulka 35: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Allegra Melatonin.....	74
Tabulka 36: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Clinical Melatonin Forte.	75
Tabulka 37: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Allnature Melatonin.	76
Tabulka 38: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Nutricius Melatonin new extra.	77
Tabulka 39: Deklarovaný a zjištěný obsah v přípravku Clinical Melatonin B ₆ Gummies.	78
Tabulka 40: Souhrn zjištěných hodnot v doporučené denní dávce ve vybraných doplňcích stravy, obsahujících melatonin či pyridoxin.	79

9 Seznam použité literatury

1. prof. PharmDr. Štaud František, Ph.D. Hypnosedativa/anxiolytika. *Katedra farmakologie a toxikologie, Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové*. [Online] [Citace: 11. 04 2023.] https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KFLT/?path=farmakologie+ii+-+letni+semestr%5cfarmakologie+letni+semestr%5csp+farmacie_p%c5%99edn%c3%a1%c5%a1ky+farmakologie+ii_texty.
2. Sassan Pazarandeh, MD , David L Burns, MD. Overview of water-soluble vitamins. *Up to date*. [Online] 03. 02 2023. [Citace: 22. 02 2023.] https://www.uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/overview-of-water-soluble-vitamins?search=pyridoxine&source=search_result&selectedTitle=2~148&usage_type=default&display_rank=1.
3. Rozlišení doplňků stravy od léčivých přípravků. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] [Citace: 05. 02 2023.] <https://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplнку-stravy-od-lecivych-pripravku>.
4. Právní předpisy vztahující se k doplňkům stravy a obecné informace o doplňcích stravy. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce*. [Online] 10. 09 2019. [Citace: 05. 02 2023.] <https://www.szpi.gov.cz/clanek/pravni-predpisy-vztahujici-se-k-doplнкum-stravy-a-obecne-informace-o-doplncich-stravy.aspx?q=Y2hudW09Mg%3d%3d>.
5. Sigma-Aldrich. Product Specification. *SigmaAldrich*. [Online] [Citace: 05. 02 2023.] https://www.sigmaaldrich.com/specification-sheets/168/923/M5250-BULK____SIGMA____.pdf.
6. Doležal, Martin a kol. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha : Karolinum, 2013. stránky 33-35. Sv. 1. 978-80-246-2382-5.
7. Carpentieri A., Díaz de Barboza G., Areco V., Peralta López M., Tolosa de Talamoni N. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacological Research*. 04 2014, Sv. 65, 4, stránky 437-444.

8. Xiao Meng, Ya Li, Sha Li, Yue Zhou, Ren-You Gan, Dong-Ping Xu, Hua-Bin Li. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. *www.mdpi.com*. [Online] 07. 04 2017. [Citace: 05. 02 2023.] <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/4/367>.
9. Vladimir N. Anisimov, Irina G. Popovich, Mark A. Zabezhinski, Sergey V. Anisimov, Georgy M. Vesnushkin, Irina A. Vinogradova. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. květen- červen 2006, Sv. 1757, 5–6, stránky 573-589.
10. Šálková, Michaela. Výživa a mozkové neurodegenerativní onemocnění. *Vysoké učení technické v Brně*. [Online] 2006. [Citace: 02. 04 2023.] Bakalářská práce. <https://core.ac.uk/download/pdf/44402061.pdf>.
11. Brzezinski, A. Melatonin in Humans. *N. Engl. J. Med.* 03 1997, Sv. 336, 3, stránky 186-195.
12. Melatonin. *MedlinePlus*. [Online] 22. 10 2014. [Citace: 07. 02 2023.] <https://web.archive.org/web/20150209014046/http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/940.html#Effectiveness>.
13. Bažantová, Aneta. Metabolity melatoninu I. *Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové*. [Online] 2006. [Citace: 25. 02 2023.] Bakalářská práce. https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/5871/BPTX_0_0_11160_0_54278_0_17219.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
14. Sangsopha, J., Johns, N.P., Johns, J. et al. Dietary sources of melatonin and benefits from production of high melatonin pasteurized milk. *J Food Sci Technol*. červen 2020, Sv. 57, stránky 2026–2037.
15. Fiona Auld, Emily L. Maschauer, Ian Morrison, Debra J. Skene, Renata L. Riha. Evidence for the efficacy of melatonin in the treatment of primary adult sleep disorders. *Sleep Medicine Reviews*. srpen 2017, Sv. 34, stránky 10-22.
16. Amaral FGD, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab*. 08 2018, Sv. 62, 4, stránky 472-479.

17. Claustrat B., Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*. duben-červen 2015, Sv. 61, 2-3, stránky 77-84.
18. MELATONIN VITABALANS. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] 8. 10 2001. [Citace: 25. 02 2023.] <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0249236&tab=texts>.
19. MELATONIN NEURIM. *www.sukl.cz*. [Online] [Citace: 25. 02 2023.] https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/melatonin-neurim-epar-product-information_cs.pdf.
20. Sigma-Aldrich. Product Specification. *Sigma Aldrich*. [Online] [Citace: 31. 1 2023.] https://www.sigmaaldrich.com/specification-sheets/226/528/P5669-BULK____SIGMA____.pdf.
21. Vitamín B6. *Wikipedie*. [Online] [Citace: 22. 02 2023.] https://cs.wikipedia.org/wiki/Vitam%C3%ADn_B6.
22. Vodrážka Zdeněk, Káš Jan, Rauch Pavel. *Enzymologie*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. Sv. 3. 8070803304.
23. Vitamin B6 (pyridoxine): Drug information. [Online] [Citace: 22. 02 2023.] https://www-uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/vitamin-b6-pyridoxine-drug-information?search=piridoxine%20food%20supplements&source=search_result&selectedTitle=10~150&usage_type=default&display_rank=10#F215982.
24. MUDr. Fajfrová Jana. Vitamíny a jejich funkce v organismu. *Interní medicína po praxi*. 14. 11 2011, 13(12), stránky 466-468.
25. Institute of medicine. *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington, DC : The National academies press, 1998. Sv. 7.

26. doc. PharmDr. Sklenářová Hana, Ph.D. SEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY - VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE. *Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy*. [Online] [Citace: 14. 02 2023.] <https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2942#section-9>.
27. Kovaříková Petra, Stariat Ján. HPLC – HISTORIE A ZÁKLADNÍ PRINCIPY. *Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy*. [Online] [Citace: 14. 02 2023.] <https://dl1.cuni.cz/mod/resource/view.php?id=149771>.
28. Jiří Klimeš a kolektiv. *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Hradec Králové : Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2015, 2015. Sv. 2. 978-80-260-8175-3.
29. Základy analýzy potravin: VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE (HPLC). *WEB.VSCHT.CZ*. [Online] [Citace: 15. 02 2023.] https://web.vscht.cz/~koplkr/%c4%8c%c3%a1stA6_2.pdf.
30. prof. PharmDr. Nováková Lucie, Ph.D. Separační metody v analytické chemii II. *Instrumentální metody*. [Online] 2020/2021. [Citace: 14. 02 2023.] <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/?path=farmacie%5canalytick%c3%a1+chemie+a+instrument%c3%a1n%c3%ad+metody%5ckomentovan%c3%a9+prezentace%5cim%5cp%c5%99edn%c3%a1%c5%a1ky>.
31. Kovaříková Petra, Stariat Ján. HPLC - POPIS ZÁKLADNÍHO HARDWARU. *Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy*. [Online] [Citace: 16. 02 2023.] <https://dl1.cuni.cz/mod/resource/view.php?id=149769&forceview=1>.
32. doc. PharmDr. Sklenářová Hana, Ph.D. SEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY - ÚVOD, PRINCIP, ROZDĚLENÍ. *Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy*. [Online] [Citace: 20. 02 2023.] <https://dl1.cuni.cz/mod/resource/view.php?id=155433&forceview=1>.

33. Kovaříková Petra, Stariat Ján. HPLC – STACIONÁRNÍ FÁZE A SEPARAČNÍ MÓDY. *Inovace studijního programu Farmacie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy*. [Online] [Citace: 20. 02 2023.] <https://dl1.cuni.cz/mod/resource/view.php?id=250424&forceview=1>.

34. HPLC – High Performance Liquid Chromatography. *Studijní materiály Univerzity Karlovy Farmaceutické fakulty, katedra analytické chemie*. [Online] [Citace: 02. 05 2023.] <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/?path=farmacie%5cspeci%c3%a1ln%c3%ad+metody+instrument%c3%a1ln%c3%ad+anal%c3%bdzy%5cteorie+%c3%baloh+a+n%c3%a1vody+k+p%c5%99%c3%adstroj%c5%afm%5chplc>.

35. Aldrich, Sigma. *Ascentis® Express C18, 2,7 µm HPLC kolona*. www.sigmaaldrich.cz.

36. prof.RNDr. Solich Petr, CSc. Pokroky v kapalinové chromatografii. *Speciální metody instrumentální analýzy*. [Online] [Citace: 20. 02 2023.] <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/?path=farmacie%5cspeci%c3%a1ln%c3%ad+metody+instrument%c3%a1ln%c3%ad+anal%c3%bdzy%5cp%c5%99edn%c3%a1%c5%a1ky+a+u%c4%8debn%c3%ad+materi%c3%a1ly>.

37. Monolitické kolony. www.HPLC.cz. [Online] [Citace: 20. 02 2023.] http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic_columns.htm.

38. Adsorbenty a chemicky vázané fáze. www.HPLC.cz. [Online] [Citace: 20. 02 2023.] http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html#_3_Chem_faze.

39. Schulzová, Věra. HPLC v analýze potravin a přírodních produktů. www.vscht.cz. [Online] [Citace: 20. 02 2023.] <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/1%20HPLC%202019%20teorie.pdf>.

40. prof. Nováková Lucie. Současné směry moderní HPLC. *Speciální metody instrumentální analýzy, Univerzita Karlova Farmaceutická fakulta v Hradci Králové*. [Online] 27. 11 2020. [Citace: 20. 02 2023.] <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/?path=farmacie%5cspeci%c3%a1ln%c3%ad+metody+instrument%c3%a1ln%c3%ad+anal%c3%bdzy%5cp%c5%99edn%c3%a1%c5%a1ky+a+u%c4%8debn%c3%ad+materi%c3%a1ly>.

41. Šillerová, Tereza. Nové trendy v HPLC analýze. *Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové*. [Online] 2007. [Citace: 02. 04 2023.] Bakalářská práce. https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/9839/BPTX_0_0_11160_0_54838_0_17682.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
42. Kadlecová, Zuzana. Charakterizace nové stacionární fáze v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii. *Univerzita Karlova Přírodovědecká fakulta*. [Online] 2019. [Citace: 02. 04 2023.] Diplomová práce. <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/106382/120328248.pdf?sequence=1>.
43. Vliv aktivity zbytkových silanolových skupin. *www.HPLC.cz*. [Online] [Citace: 20. 02 2023.] http://www.hplc.cz/Tip/silanol.htm#_endcapping.
44. Herbert Oberacher, Christian G Huber. Capillary monoliths for the analysis of nucleic acids by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 03 2002, Sv. 21, 3, stránky 166-174.
45. Barreiro Astray, S., Barbosa-Pereira, L., Lage-Yusty, M.A. et al. Comparison of Analytical Methods for the Rapid Determination of Melatonin in Food Supplements. duben 2021, Sv. 14, stránky 734–741.
46. Olga Viegas, Cristina Esteves, Janete Rocha, Armindo Melo, Isabel M.P.L.V.O. Ferreira. Simultaneous determination of melatonin and trans-resveratrol in wine by dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC-FLD. 1. březen 2021, Sv. 339.
47. Michał Mateusz Dermanowski, Arkadiusz Hejduk, Julita Kuczyńska, Adam Wichniak, Agnieszka Urbańska & Paweł Mierzejewski. Assessment of dim light melatonin onset based on plasma and slins samples. 15. únor 2022, Sv. 39, 5, stránky 626-635.
48. Dun-Xian Tan, Brian M. Zanghi, Lucien C. Manchester, Russel J. Reiter. Melatonin identified in meats and other food stuffs: potentially nutritional impact. *Journal of Pineal Research*. 2014, Sv. 57, 2, stránky 213-218.

49. Leiziani Gnatkowski Martins, Najeh Maissar khalil, Rubiana Mara Mainardes. Application of a validated HPLC-PDA method for the determination of melatonin content and its release from poly(lactic acid) nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017, Sv. 7, 6, stránky 388-393.

50. Vitamin B6 - vlastnosti, výskyt účinky, příznaky nedostatku a nadbytku. *Herbalus*. [Online] 3. srpen 2022. [Citace: 11. 04 2023.] <https://www.herbalus.cz/blog/7001342-vitamin-b6-vlastnosti-vyskyt-ucinky-priznaky-nedostatku-a-nadbytku>.

51. Seo, Jun-Hyeok, Yang, Dong-Hyug, Lee, Byung-Kyu, Eom, Han Young, Kim, Un-Yong, Kim, Jeong Hyun, Han, Sang-Beom. Simultaneous Determination of B Group Vitamins in Supplemented Food Products by High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2011, Sv. 32, 8, stránky 2648–2656.

52. Marianne R. Bisp, Mustafa Vakur Bor, Else-Marie Heinsvig, Morten A. Kall, Ebba Nexø. Determination of Vitamin B6 Vitamers and Pyridoxic Acid in Plasma: Development and Evaluation of a High-Performance Liquid Chromatographic Assay. *Analytical Biochemistry*. 2002, Sv. 305, 1, stránky 82-89.

53. Mustafa Yaman, Ömer Faruk Mızrak. Determination and evaluation of in vitro bioaccessibility of the pyridoxal, pyridoxine, and pyridoxamine forms of vitamin B6 in cereal-based baby foods. *Food Chemistry*. 2019, Sv. 298.

54. Clinical MELATONIN B6 sirup 120 ml příchutí citron. *Dr. Max*. [Online] [Citace: 07. 02 2023.] <https://www.drmax.cz/clinical-melatonin-b6-sirup-120-ml-prichut-citron>.

55. FAST SLEEP ÚSTNÍ SPREJ S MELATONINEM 24ML. *azlékárna*. [Online] [Citace: 07. 02 2023.] https://www.azlekarna.cz/fast-sleep-ustni-sprej-s-melatoninem-24ml/?gclid=CjwKCAiAuOieBhAIEiwAgjCvcmhj1xuDc1ddq2UrmYnF8dln9rNE4FCDHT_3ycUU1rvkU3bhnqFYbxoC9XUQAvD_BwE.

56. Clinical Melatonin forte 5 mg 30 tablet 30 ks. *Pilulka*. [Online] [Citace: 07. 02 2023.] <https://www.pilulka.cz/melatonin-forte-5mg-tbl-30-clinical>.

57. MELATONIN B6 GUMMIES - CLINICAL PEKTINOVÉ BONBÓNY S POMERANČOVOU PŘÍCHUTÍ 1X60 KS. *Vitalmix*. [Online] [Citace: 07. 02 2023.] https://www.vitalmix.cz/pharm-activ/melatonin-b6-gummies-clinical-pektinove-bonbony-s-pomerancovou-prichuti-1x60-ks?page_id=236873&utm_campaign=zbozi&utm_medium=cpc&utm_source=zbozi.

58. Tozax Sleep Trip Tbl.30. *Chytrá lékárna*. [Online] [Citace: 07. 02 2023.] https://www.chytralekarna.cz/dopluky-stravy-a-vyziva/spanek-nervy-stres/tozax-sleep-trip-tbl-30-8588006216240?gclid=CjwKCAiAuOieBhAIeIwAgjCvchnCXD762E6yPXLz564KVnBogPcnx3qcOJqtS_3qLTPWulsjhXsMBoC8t4QAvD_BwE.

59. allegra MELATONIN 6mg NEW 30 pastilek. *Benu*. [Online] [Citace: 07. 02 2023.] https://www.benu.cz/allegra-melatonin-6mg-new-30-pastilek?utm_campaign=freelistings&utm_medium=organic&utm_source=google&utm_term=allegra+MELATONIN+6mg+NEW+30+pastilek&gclid=CjwKCAiAuOieBhAIeIwAgjCvcldpQ1zdBo9pvy54wReh3expITMjotH50tW4xfoZoPltTPVeoCCmnhocC.

60. ALLNATURE Melatonin 2 mg 60 tablet. *Lékárna.cz*. [Online] [Citace: 07. 02 2023.] https://www.lekarna.cz/allnature-melatonin-2-mg-60-tablet/?gclid=CjwKCAiAuOieBhAIeIwAgjCvcrPygavSLavfn4y_JONaoQv5q9i48dHDm_3LDks2zUxX2x5zgw_NaRoCK9UQAvD_BwE.

61. NUTRICIUS Melatonin new extra 5 mg 60 tablet. *Lékárna.cz*. [Online] [Citace: 07. 02 2023.] https://www.lekarna.cz/melatonin-5mg/?gclid=CjwKCAiAuOieBhAIeIwAgjCvcrVMaYr9yXWDPFvRtkD-LpOYTIKFqJCSigIEAXMiVFWvuGXj9p-g6xoCaulQAvD_BwE.

62. Melatonin Rapid komplex 30 rozpustných tablet. *Benu*. [Online] [Citace: 07. 02 2023.] https://www.benu.cz/melatonin-rapid-komplex-odt-tbl-30-pod-jazyk?utm_campaign=freelistings&utm_medium=organic&utm_source=google&utm_term=Melatonin+Rapid+komplex+30+rozpustn%C3%BDch+tablet&gclid=CjwKCAiAuOieBhAIeIwAgjCvckld9aGtPJqsZ-ALZRuv5bNH_CQckMONYkgKp.

63. Padělky léků a nelegální přípravky. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] [Citace: 04. 05 2023.] <https://www.sukl.cz/padelky-leku-a-nelegalni-pripravky>.
64. Nelegální přípravky s melatoninem. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] 14. prosinec 2016. [Citace: 04. 05 2023.] <https://www.sukl.cz/nelegalni-pripravky-s-melatoninem?highlightWords=melatonin>.
65. Válková, Hana. Lékový ústav zakázal plošně většinu doplňků stravy s melatoninem pro lepší spaní. *Vitalie*. [Online] 30. 03 2023. [Citace: 04. 05 2023.] <https://www.vitalia.cz/clanky/melatonin-doplanky-stravy-kontroly-sukl/>.
66. Žádost o poskytnutí informací ze dne 5. 11. 2021. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] [Citace: 04. 05 2023.] <https://www.sukl.cz/sukl/zadost-o-poskytnuti-informaci-ze-dne-5-11-2021>.
67. Výrobky přeřazené do skupiny léčiv. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] [Citace: 04. 05 2023.] <https://www.sukl.cz/farmaceuticky-prumysl/vyrobky-prerazene-do-skupiny-leciv>.
68. Změna rozhodovací praxe v případě výrobků obsahující látku melatonin. *Státní ústav pro kontrolu léčiv*. [Online] 14. březen 2023. [Citace: 04. 05 2023.] <https://www.sukl.cz/zmena-rozhodovaci-praxe-v-pripade-vyrobku-obsahujici-latku?highlightWords=melatonin>.
69. Melatonin Rapid komplex 30 rozpustných tablet. *Benu*. [Online] [Citace: 04. 05 2023.] <https://www.benu.cz/melatonin-rapid-komplex-odt-tbl-30-pod-jazyk>.
70. Vladimir N. Anisimov, Irina G. Popovich, Mark A. Zabezhinski, Sergey V. Anisimov, Georgy M. Vesnushkin, Irina A. Vinogradova. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. květen-červen 2006, Sv. 1757, 5-6, stránky 573-589.
71. 3.0, CC BY. HPLC. *Wikipedia*. [Online] 24. 07 2010. [Citace: 14. 02 2023.] https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/Soubor:Preparative_HPLC.svg.