

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro
separaci alkaloidů čeledi
Amaryllidaceae

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

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

Hradec Králové 2023/2024

Kristýna Burianová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením vedoucí a konzultantky). 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:

Kristýna Burianová

Mé největší poděkování patří prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za profesionální odborné vedení, nekonečnou trpělivost, za předání cenných rad a zkušeností, za pomoc a za poskytnutý čas (a že ho nebylo málo!), který mi věnovala při zpracování diplomové práce. Velké díky patří Arnaudu Costisovi za to, že mi provedl prvními kroky v kapalinové chromatografii. Děkuji PharmDr. Veronice Pilařové, Ph.D. za předání informací z jejího projektu zaměřeného na UHPSFC-MS/MS, za přípravu vzorků z rostlinného materiálu a jejich poskytnutí k analýze a za její pomoc při závěrečné kontrole diplomové práce. Ráda bych poděkovala celé Katedře analytické chemie za vstřícné jednání, za příjemnou atmosféru v laboratoři a za ochotu mi pomoci, když jsem přišla s problémy. V neposlední řadě bych zde ráda poděkovala mému příteli, který mi byl po dobu celého studia největší oporou.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Kristýna Burianová

Školitel: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Veronika Pilařová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vývoj UHPLC-MS/MS metody pro separaci alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

V této diplomové práci byla vyvíjena metoda pro separaci 30 alkaloidů čeledi Amaryllidaceae pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS). Byly optimalizovány chromatografické podmínky a parametry hmotnostního spektrometru.

V první fázi optimalizace byl proveden screening 10 analytických kolon na systému ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s detektorem fotodiodového pole (UHPLC-PDA). Jednalo se o kolony Acquity UPLC BEH C18, Acquity UPLC CSH C18, Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl, Arion Plus C18, Acquity UPLC BEH Shield RP18, Ascentis Express RP-Amide, ACE Excel C18-PFP, Kinetex PFP a Kinetex F5. K další optimalizaci byly vybrány kolony Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl a Acquity UPLC CSH C18, protože poskytly nejvyšší skóre separace analyzovaných izomerních skupin analytů.

Optimalizace MS podmínek byla provedena nastavením parametrů iontového zdroje a nastavením SRM přechodů. S využitím UHPLC-MS/MS byla provedena optimalizace separace, kdy bylo testováno pH mobilní fáze, sklon gradientu, doba analýzy a teplota na koloně. V dalším kroku byl také vyzkoušen vliv organického modifikátoru mobilní fáze, kdy byla použita místo čistého MeOH i směs MeOH:ACN (1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1).

U vyvinuté UHPLC-MS/MS metody byly změřeny vybrané validační parametry, a to přesnost, selektivita, mez stanovitelnosti a linearita. Dále byla provedena analýza

extraktu ze sušených listů *Crinum asiaticum*, čeledi Amaryllidaceae a extraktu ze sušených cibulí rodu *Narcissus*, čeledi Amaryllidaceae.

Klíčová slova: alkaloidy čeledi Amaryllidaceae, UHPLC-MS/MS, vývoj metody, optimalizace, validace, PDA detekce

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of analytical chemistry

Candidate: Kristýna Burianová

Supervisor: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Consultant: PharmDr. Veronika Pilařová, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Development of UHPLC-MS/MS method for separation of Amaryllidaceae alkaloids

In this master thesis, a method for the separation of 30 alkaloids of the Amaryllidaceae family was developed using ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass detection (UHPLC-MS/MS). Chromatographic conditions and mass spectrometer parameters were optimized.

In the first step of optimization, screening of 10 analytical columns was performed on an ultra-high performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection (UHPLC-PDA). Those tested columns were Acquity UPLC BEH C18, Acquity UPLC CSH C18, Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl, Arion Plus C18, Acquity UPLC BEH Shield RP18, Ascentis Express RP-Amide, ACE Excel C18-PFP, Kinetex PFP, and Kinetex F5. Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl, and Acquity UPLC CSH C18 as they provided the highest separation score for the analyzed isomeric groups of analytes were selected for further optimization.

The optimization of MS conditions was performed by adjusting the parameters of the ion source and setting SRM transitions. The separation was optimized by testing the pH of the mobile phase, gradient slope, analysis time and column temperature utilizing UHPLC-MS/MS. In further step the effect of an organic modifier was also tested, where a mixture of MeOH:ACN (1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1) was used instead of pure MeOH.

The developed UHPLC-MS/MS was validated in terms of precision, selectivity, quantitation limit and linearity. Furthermore, analysis of the extract from dried leaves of *Crinum asiaticum*, Amaryllidaceae family, and the extract from dried bulbs of the genus *Narcissus*, Amaryllidaceae, was conducted.

Keywords: alkaloids of the Amaryllidaceae family, UHPLC-MS/MS, method development, optimization, validation, PDA detection

Obsah

Seznam použitých zkratek	10
1. Úvod	13
2. Cíl a popis zadání práce	14
3. Teoretická část.....	15
3.1. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae	15
3.1.1. Význam alkaloidů čeledi Amaryllidaceae	15
3.1.2. Strukturní typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae.....	16
3.1.3. Základní fyzikálně-chemické vlastnosti analyzovaných látek.....	18
3.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	20
3.3. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie	21
3.4. Hmotnostní spektrometrie	23
3.5. Spojení UHPLC – MS/MS.....	24
3.6. Metody pro separaci alkaloidů čeledi Amaryllidaceae.....	25
4. Experimentální část	29
4.1. Použité přístroje a pomůcky	29
4.2. Použité chemikálie	29
4.3. Použité analytické kolony	30
4.4. Standardy alkaloidů a rostlinný materiál	30
4.5. Příprava roztoků standardů	31
4.5.1. Zásobní a pracovní roztoky standardů	31
4.5.2. Příprava mobilní fáze.....	33
4.5.3. Pomocné kapaliny pro UHPLC systém.....	34
4.5.4. Příprava vzorků z rostlinných materiálů.....	34
4.6. Nastavení UHPLC-PDA metody pro screening kolon	35
4.7. Optimalizace MS metody – iontový zdroj a SRM přechody.....	35

4.8.	Parametry vyvinuté metody UHPLC-MS/MS.....	36
4.9.	Vybrané validační parametry	39
4.9.1.	Kalibrační křivka: rozsah a linearita	39
4.9.2.	Limit kvantifikace	39
4.9.3.	Opakovatelnost metody	39
4.9.4.	Selektivita metody	39
5.	Výsledky a diskuze	40
5.1.	Optimalizace UHPLC-PDA metody.....	40
5.1.1.	Nastavení PDA detektoru.....	40
5.2.	Optimalizace MS metody	40
5.2.1.	Optimalizace nastavení SRM přechodů	40
5.2.2.	Optimalizace nastavení iontového zdroje	47
5.3.	Optimalizace chromatografické separace	53
5.3.1.	Výběr stacionární fáze	53
5.3.2.	Optimalizace UHPLC metody	57
5.4.	Výsledky separace za optimálních podmínek	70
5.5.	Vybrané validační parametry	73
5.5.1.	Kalibrační křivka: rozmezí a linearita	73
5.5.2.	Opakovatelnost metody	73
5.5.3.	Selektivita metody	75
5.6.	Využití UHPLC-MS/MS metody pro analýzu rostlinných extraktů.....	78
6.	Závěr.....	82
7.	Seznam použité literatury	84

Seznam použitých zkratk

AA – kyselina octová

ACA – acetylkaranin

ACN – acetonitril

ALY – 1-O-acetylkorin

AmAc – octan amonný

AMB – ambellin

AmF – mravenčan amonný

BEH – etylenem zesítené hybridy (ethylene bridged hybrid)

CAR – karanin

CE – kolizní energie

CHL – chlidantin

CRI – krinamidin

CRN – krinin

CSH – povrchově nabitý hybrid (charged surface hybrid)

DHM – 9-O-demetylhomolykorin

DMG – 9-O-demetylgalantin

EPM – epimaritidin

ESI⁺ – ionizace elektrosprejem v pozitivním módu

FA – kyselina mravenčí

GAL – galantin

GC – plynová chromatografie

HIP – hippeastrin

HLC – homolykorin

HMA – haemantamin

HMN – hamayn

HTD – haemantidin

HXV – 11-hydroxyvittatin

CHL – chlidantin
IPW – seko-isopowellaminon
LCA – lykoraminon
LLOQ – dolní limit kvantifikace
LCN – lykorenin
logP – dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu
LYC – lykorin
 m/z – poměr hmotnosti a náboje
MAS – masonin
MeOH – metanol
MF – mobilní fáze
MS – hmotnostní spektrometrie
MS/MS – tandemová hmotnostní detekce
Mw – molekulová hmotnost
NOR – norpluviin
NRW – narwedin
ODU – odulin
o-ELC – o-etylykorenin
PDA – detektor fotodiodového pole
pKa – záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
RSD – relativní směrodatná odchylka
SD – směrodatná odchylka
SF – stacionární fáze
SFE – superkritická fluidní extrakce
SRM – záznam vybrané reakce
THF – tetrahydrofuran
THM – tetrahydromasonin
TLC – tenkovrstvá kapalinová chromatografie

TOF – analyzátor doby letu

t_R – retenční čas

TZT – tazettin

UHPLC – ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie

UHPLC-MS/MS – ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí

UHPSFC-MS/MS – ultra-vysokoučinná superkritická fluidní chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí

ULOQ – horní limit kvantifikace

UND – undalatin

VIT – vittatin

w_{50} – šířka píku v jeho 50% výšky

1. Úvod

V této diplomové práci byl proveden vývoj a optimalizace separační metody UHPLC-MS/MS pro analýzu 30 alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Takové spektrum alkaloidů čeledi Amaryllidaceae se v rámci jedné metody v dostupné literatuře běžně neseperuje. Čas dohledaných UHPLC analýz byl v rozmezí 8-72 min, kdy k identifikaci a separaci širšího spektra 32 alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae došlo až při analýzách trvajících 50-55 minut. Vývoj rychlé separační metody, která by umožňovala analýzu širokého spektra alkaloidů zvoleného pro tuto práci, tak může prohloubit a rozšířit poznatky vědecké obce o nová data.

Rostliny z čeledi Amaryllidaceae, které se vyznačují širokým spektrem biologických účinků, jsou na Katedře farmakognozie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy intenzivně zkoumány pro potenciální využití v terapii řady onemocnění. Zkoumány jsou zejména v terapii Alzheimerovy choroby. Pokud je u extraktu z rostliny nalezen účinek, je následně snaha ho připsat konkrétní látce, v tomto případě alkaloidu. Jeho další zkoumání vyžaduje jeho izolaci. Předmětem této práce byla separace již izolovaných jednotlivých alkaloidů v analytickém měřítku. Optimalizovaná metoda může být výchozím krokem v preparativních analýzách.

Čeď Amaryllidaceae obsahuje alkaloidy rozmanitých strukturních typů, a je tedy skvělým zdrojem pro hledání molekul s biologickým účinkem daným mechanismem, který nebyl dosud popsán. Takové molekuly pak mohou být využity jako vedoucí molekuly ve farmaceutické syntéze léčiv. Dnes jsou tímto způsobem vyvíjena potenciální léčiva v protinádorové terapii, kde jsou jedny z vedoucích molekul alkaloidy lykorinového, haemantaminového a narciklasinového strukturního typu.

Na Katedře analytické chemie již byla v rámci jiného projektu vyvinuta metoda ultra-vysokoučinné superkritické fluidní chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (UHPSFC-MS/MS), ve které bylo separováno spektrum alkaloidů zvoleného pro tuto práci. Porovnáním vyvinutých metod může být vyvozen závěr, která metoda byla k separaci vhodnější, a tím usnadnit volbu separační techniky v budoucích analýzách.

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a optimalizovat separační metodu UHPLC-MS/MS pro analýzu 30 alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, z nichž některé byly izomerní povahy. Byla snaha dosáhnout vysoké selektivity separace izomerních skupin, co nejlepších hodnot symetrie píku a šířky píku v 50 % jeho výšky v co nejkratším čase a s co největší citlivostí.

V prvním kroku UHPLC optimalizace byl proveden screening 10 analytických kolon na systému UHPLC-PDA. Cílem tohoto kroku bylo vybrat stacionární fázi s co nejlepší selektivitou separace izomerních analytů, která by byla vhodná pro další optimalizaci. Testované kolony zahrnovaly Acquity UPLC BEH C18, Acquity UPLC CSH C18, Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl, Arion Plus C18, Acquity UPLC BEH Shield RP18, Ascentis Express RP-Amide, ACE Excel C18-PFP, Kinetex PFP a Kinetex F5. Největší skóre separace, tj. nejlepší hodnoty symetrie píku, šířky píku v 50 % jeho výšky (w_{50}) a rozlišení analytů v jednotlivých izomerních skupinách, poskytly kolony Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl a Acquity UPLC CSH C18.

Následně byla provedena optimalizace MS/MS metody. Nejprve byly získány experimentální hodnoty $[M+H]^+$ analytů z MS skenů a hmoty produktových iontů z MS/MS skenů. Poté následovala optimalizace podmínek MS analyzátoru, kde pro vybrané SRM přechody byla optimalizována kolizní energie (CE). Dále byla provedena optimalizace parametrů iontového zdroje, kde optimalizované parametry byly napětí na vstupním kuželu, napětí na kapiláře, desolvatační teplota, průtok desolvatačního plynu a průtok plynu na vstupním kuželu.

V druhém kroku optimalizace chromatografické metody byly provedeny experimenty zkoumající vliv změny pH mobilní fáze (MF) na separaci, dále byl optimalizován sklon gradientu, čas gradientu a teplota na koloně. Byl sledován také vliv organického modifikátoru MF, kdy byly testovány směsi MeOH:ACN (1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1) namísto čistého MeOH.

U optimalizované UHPLC-MS/MS metody byly změřeny vybrané validační parametry, a to opakovatelnost metody, její selektivita, mez stanovitelnosti a linearita. UHPLC-MS/MS byla následně použita pro analýzu extraktu připraveného ze sušených

listů *Crinum asiaticum*, čeledi Amaryllidaceae a extraktu připraveného ze sušených cibulí rodu *Narcissus*, čeledi Amaryllidaceae.

3. Teoretická část

3.1. Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

3.1.1. Význam alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae jsou bioaktivní látky, které jsou zkoumány od 19. století. Jedná se o čeleď se širokým spektrem biologických a farmakologických účinků. Zájem o tyto látky stále roste díky jejich využití v léčbě Alzheimerovy nemoci, ale také pro jejich antivirovou, antibakteriální, antifungální, antimalarickou, protizánětlivou, cytotoxickou a protinádorovou aktivitu, či pro další účinky, které zástupci této čeledi mají [1].

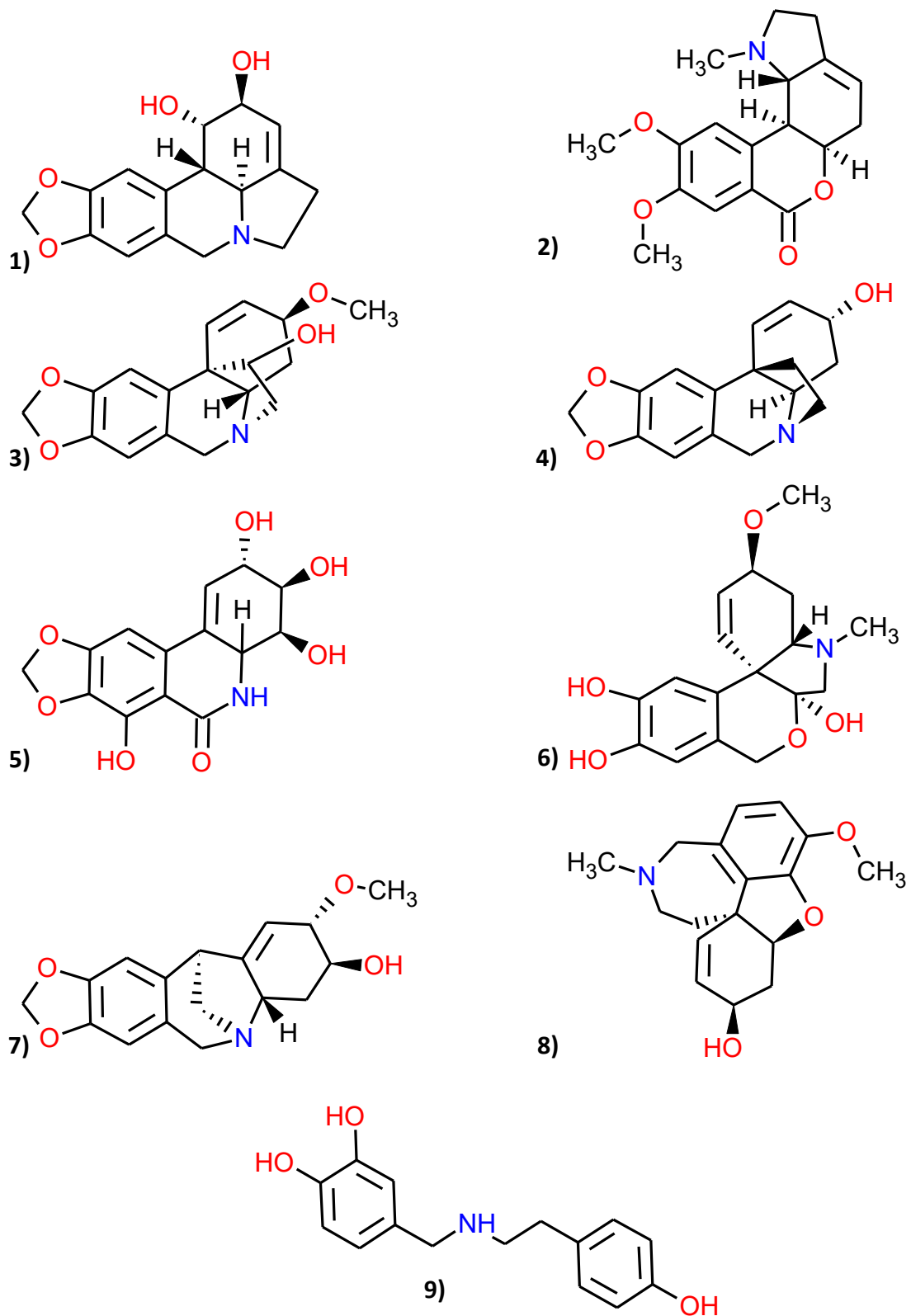
Tato čeleď je známá zejména díky galantaminu využívaném v terapii Alzheimerovy choroby [2][3][4]. Stejný účinek inhibice acetylcholinesterázy byl potvrzen také u dalších struktur, přičemž například sanguinin vykázal ještě větší účinnost než galantamin. Alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae odvozené od lykorinu, haemantaminu a narciklasinu jsou dnes používány jako vedoucí molekuly ve výzkumu týkajícího se protinádorové a cytotoxické aktivity [1]. U některých alkaloidů z této čeledi byla objevena inhibiční aktivita glykogen-syntázy-kinázy-3 β , která byla identifikována jako potenciální terapeutický cíl při léčbě Alzheimerovy nemoci, bipolární poruchy, mrtvice, rakoviny a diabetu [5]. Během pandemie COVID-19 byly testovány antivirové vlastnosti vybraných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae, z nichž molekuly odvozené od lykorinu, krininu, galantaminu a homolykorinu poskytovaly pozitivní výsledky [1][6]. U extraktů z rostliny *Crinum americanum*, Amaryllidaceae byla pozorována antifungální aktivita proti různým druhům rodu *Candida*. Dosažený antifungální účinek byl větší než u kontrolního amfotericinu B. Za hlavní účinný alkaloid byl označen lykorin, ale jeho mechanismus antifungálního působení na rod *Candida* zatím nebyl zcela objasněn [7]. Při zkoumání etanolického extraktu rostliny *Boophone disticha*, Amaryllidaceae byla zaznamenána antidepresivní aktivita daná prostřednictvím inhibiční aktivity na serotoninových, noradrenalinových a dopaminových transportérech. Účinek byl potvrzen u bufanisinu, bufanidrinu, bufanaminu a distichaminu izolovaných z extraktu.

U lykorinu a haemantidinu byl objeven protizánětlivý efekt, přičemž u haemantidinu byla pozorována výraznější účinnost než u indometacinu, který je typickým zástupcem nesteroidních protizánětlivých léků [1].

3.1.2. Strukturální typy alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Dosud bylo popsáno více než 600 alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Většinu z těchto alkaloidů je možné zařadit do devíti základních strukturálních typů, a to typu lykorinového, homolykorinového, haemantaminového, krininového, narciklasinového, tazettinového, montaninového, galantaminového a norbelladinového [8]. Každý z těchto strukturálních typů se nazývá právě po jednom reprezentativním alkaloidu, jejichž struktury jsou vyobrazeny na Obr. č. 1. Základní strukturu lykorinového typu tvoří pyrrolo[d,e]fenanthridin, homolykorinového typu pak 2-benzopyrano[3,4-g]indol. Skupiny haemantaminového a krininového strukturálního typu jsou tvořeny deriváty 5,10b-etanofenanthridinu. Tyto dva strukturální typy odlišuje přítomnost hydroxy-skupiny na pyrrolovém jádře. Narciklasinový strukturální typ obsahuje ve své struktuře fenanthridin a 1-hydroxyisochinolin, pretazettinový strukturální typ pak 2-benzopyrano[3,4-c]indol. Základem montaninového strukturálního typu je 5,11-metanomorfanthridin, galantaminového strukturálního typu to je benzofurobenzazepin a v norbelladinovém strukturálním typu pak *N*-benzylfenetylamin [9].

Analyzované alkaloidy zkoumané v této práci jsou typu lykorinového (typ A), homolykorinového (typ B), haemantaminového (typ C), krininového (typ D), tazettinového (typ E) a galantaminového (typ F). Alkaloidy stejného strukturálního typu (Tab. č. 1) vykazují často podobné spektrální vlastnosti a v hmotnostní spektrometrii (MS) mívají charakteristická fragmentační spektra. Jejich retenční chování v separačních systémech může být taktéž podobné, nicméně interakce se stacionární fází (SF) mohou být ovlivněny substituenty a vedlejšími funkčními skupinami, což následně může vést k separaci analytů stejného strukturálního typu.



Obr. č. 1: Struktury reprezentativních alkaloidů jednotlivých strukturních typů: 1 – lykorin, 2 – homolykorin, 3 – haemanthamin, 4 – krinin, 5 – narciklasin, 6 – tazettin, 7 – montanin, 8 – galantamin, 9 – norbelladin [8]

Tab. č. 1: Přehled rozdělení analyzovaných alkaloidů podle strukturního typu

typ A	typ B	typ C	typ D	typ E	typ F
CAR	MAS	HXV	VIT	TZT	NRW
NOR	ODU	HMN	CRN		CHL
DMG	DHM	HMA	IPW		LCA
LYC	THM	HTD	EPM		
ACA	HLC	AMB	CRI		
GAL	HIP		UND		
ALY	LCN				
	o-ELC				

zkratky alkaloidů jsou vysvětleny v Tab. č. 2

3.1.3. Základní fyzikálně-chemické vlastnosti analyzovaných látek

Zkoumané alkaloidy z čeledi Amaryllidaceae vykazují slabě zásaditou povahu. Centrum bazicity je v jejich struktuře tvořeno terciárním aminem, který vykazuje nižší bazicitu oproti primárním a sekundárním aminům. Substitucí vodíkových atomů alkylovými skupinami vzniká vazba C-C, která je oproti vazbě C-H méně polarizovaná. Alkylly mohou navíc stericky bránit interakci dusíku s protonem, čímž mohou dále snižovat jeho bazicitu. Ve strukturách alkaloidů čeledi Amaryllidaceae je poblíž bazického centra přítomné aromatické jádro. To snižuje elektronovou hustotu na dusíku, čímž je opět snižována jeho bazicita. Acidobazické vlastnosti jsou popsány hodnotou pKa v Tab. č. 2, z níž vyplývá již zmiňovaná bazická povaha analyzovaných látek.

Lipofilita v Tab. č. 2 je charakterizována pomocí log P. Log P je vždy > 0, ale v žádném případě není log P > 5. Alkaloidy s hodnotami log P v rozsahu hodnot 0-1 lze označit jako mírně hydrofilní a s hodnotami v rozsahu 1-2 jako mírně lipofilní.

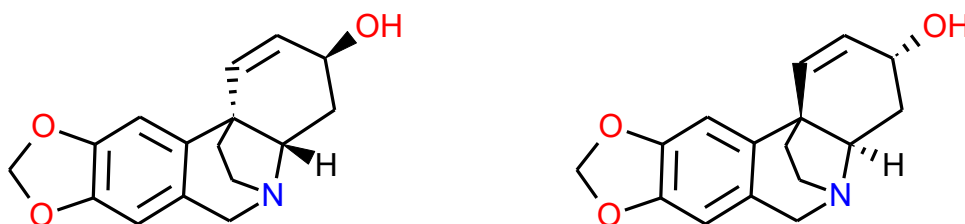
V Tab. č. 2 jsou uvedeny sumární vzorce a molekulové hmotnosti (Mw). U některých alkaloidů jsou sumární vzorce a Mw stejné, tedy se jedná o izomery. Strukturní vzorce byly dohledány v databázi PubChem a na základě těchto struktur dále zhodnoceny. Ve skupině s Mw 271 jsou VIT a CRN optickými izomery (Obr. č. 2), IPW a CAR jsou izomery strukturní. Ve skupině s Mw 287 HXV a HMN jsou diastereomery (Obr. č. 3), LYC, EPM, CHL a LCA jsou strukturní izomery. Alkaloidy s Mw 301 jsou strukturními izomery, stejně tak alkaloidy s Mw 303, 315, 317, 331. Strukturní izomery a diastereomery mívají odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti a měly by vykazovat odlišné interakce se SF. Optické izomery mají stejné fyzikálně-chemické vlastnosti, liší se pouze

optickou otáčivostí. Bez použití chirální SF, chirálního činidla nebo bez použití derivatizace je velmi obtížné optické izomery rozdělit.

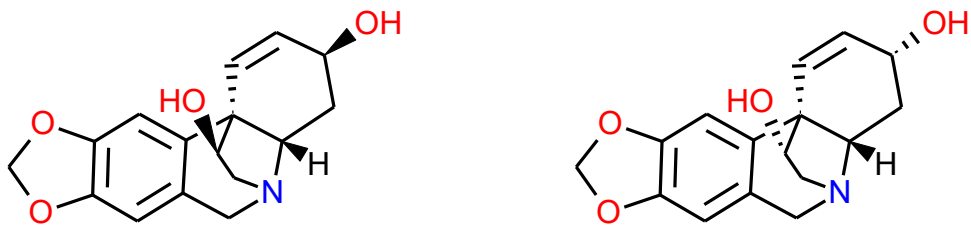
Tab. č. 2: Přehled základních fyzikálně-chemických vlastností

název alkaloidu	zkratka	sumární vzorec	Mw [g/mol]	log P	pKa
VITTATIN	VIT	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	271,1208	1,44	8,109
KRININ	CRN	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	271,1208	1,44	8,109
KARANIN	CAR	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	271,1208	1,16	7,595
SEKO-ISOPOWELLAMINON	IPW	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	271,1208	0,97	8,611
NORPLUVIN	NOR	C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	273,1365	0,87	7,670
NARWEDIN	NRW	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285,1364	1,24	8,632
LYKORIN	LYC	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287,1521	0,35	7,326
11-HYDROXYVITTATIN	HXV	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287,1158	0,62	7,208
HAMAYN	HMN	C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	287,1158	0,62	7,208
EPIMARITIDIN	EPM	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287,1521	1,41	8,219
CHLIDANTIN	CHL	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287,1521	1,51	10,341
LYKORAMINON	LCA	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	287,1521	1,92	8,699
MASONIN	MAS	C ₁₇ H ₁₇ NO ₄	299,1158	1,56	8,003
ODULIN	ODU	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301,1314	1,45	8,394
9-O-DEMETHYLHOMOLYKORIN	DHM	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301,1314	1,26	8,826
HAEMANTAMIN	HMA	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	301,1314	0,98	7,292
9-O-DEMETHYLGALANTIN	DMG	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,1470	0,41	7,442
TETRAHYDROMASONIN	THM	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,1470	0,89	8,427
ACETYLKARANIN	ACA	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	313,1314	1,39	7,347
HOMOLYKORIN	HLC	C ₁₈ H ₂₁ NO ₄	315,1470	1,53	8,063
HIPPEASTRIN	HIP	C ₁₇ H ₁₇ NO ₅	315,1107	0,74	7,739
KRINAMIDIN	CRI	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅	317,1263	0,36	7,295
HAEMANTIDIN	HTD	C ₁₇ H ₁₉ NO ₅	317,1263	0,91	5,590
LYKORENIN	LCN	C ₁₈ H ₂₃ NO ₄	317,1627	1,42	8,454
GALANTIN	GAL	C ₁₈ H ₂₃ NO ₄	317,1627	0,68	7,477
1-O-ACETYLLYKORIN	ALY	C ₁₈ H ₁₉ NO ₅	329,1263	0,58	7,082
TAZETTIN	TZT	C ₁₈ H ₂₁ NO ₅	331,1420	1,57	7,487
UNDULATIN	UND	C ₁₈ H ₂₁ NO ₅	331,1420	0,72	7,379
AMBELLIN	AMB	C ₁₈ H ₂₁ NO ₅	331,1420	0,86	7,094
O-ETYLLYKORENIN	o-ELC	C ₂₀ H ₂₇ NO ₄	345,1940	2,12	8,486

log P – dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu, Mw – molekulová hmotnost, pKa – záporný dekadický logaritmus disociační konstanty



Obr. č. 2: Strukturální vzorce VIT (vlevo) a CRN (vpravo) [10][11]



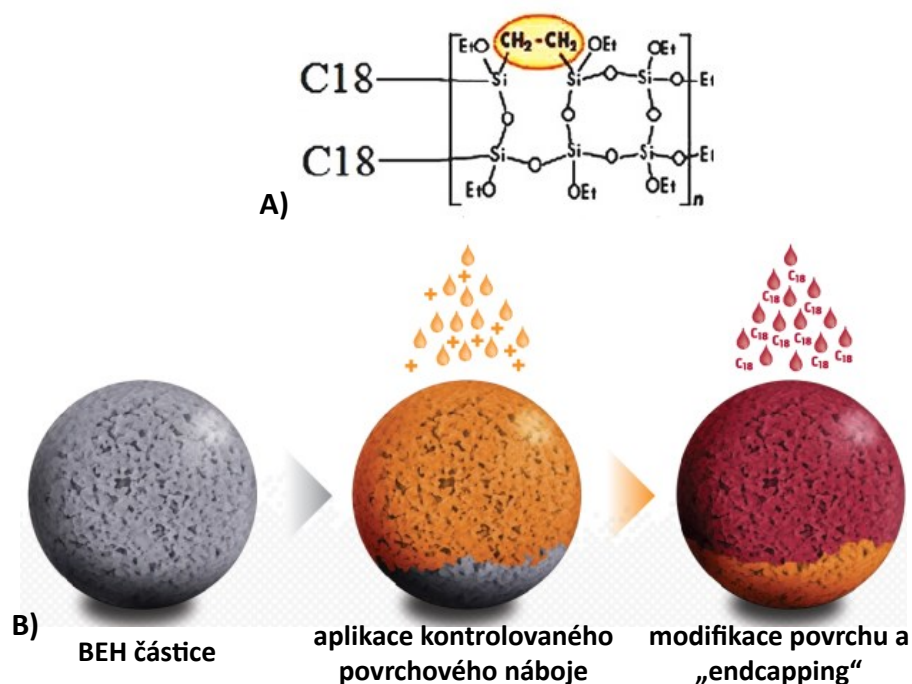
Obr. č. 3: Strukturní vzorce HXV (vlevo) a HMN (vpravo) [12][13]

3.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je jednou z chromatografických metod, která je pro své nesporné výhody součástí vybavení řady laboratoří [14][15][16].

SF využívané v HPLC jsou obvykle odvozeny od silikagelu. Silikagel je již řadu let základním materiálem vysokoúčinných chromatografických kolon díky své mechanické stabilitě, možnosti přípravy monodisperzních částic různých velikostí a distribucí pórů, a zejména pro snadnou chemickou modifikovatelnost povrchu. Částice silikagelu používané v HPLC mají obvykle průměr 5 μm a jsou odolné pro pracovní tlaky dosahující až 40 MPa [14].

Velkou slabinou silikagelu je jeho omezená stabilita v bazickém prostředí, kdy dochází k rozpuštění silikagelové matrice, a silně kyselém prostředí, kdy je siloxanová vazba hydrolyzována. Proto je nezbytné udržovat pH MF v rozmezí od 2 do 7-8 [14]. Tento problém byl řešen vývojem hybridní SF, kde je základ tvořen kombinací anorganického silikagelu a organického polymeru. Tímto spojením vznikl materiál s výhodnými vlastnostmi obou složek a zároveň byly odstraněny jejich nevýhody [14][17][18]. Jedním z těchto materiálů je hybridní materiál **X-Bridge** (Obr. č. 4) vyvinutý firmou Waters [19]. Při výrobě kolon jsou dnes uplatňovány i jiné technologie úpravy částic. Jednou z nich je technologie nazvaná **CSH** neboli „charged surface hybrid“ (Obr. č. 4), tedy hybrid s nábojem aplikovaným na povrch částic. Tato technologie, patentovaná společností Waters, poskytuje vynikající tvar píků a vysokou účinnost při separaci bazických látek, zejména pokud je použita kyselá MF o slabé iontové síle. Díky této technologii je dosaženo širšího rozsahu stability pH a lepší selektivity chromatografických separací [20].



Obr. č. 4: Schéma hybridního materiálu X-Bridge, resp. BEH (A) a technologie úpravy částic CSH (B) [21][22]

3.3. Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie

UHPLC je moderní směr současných chromatografických metod. Jeho klíčovou charakteristikou je použití částic SF o velikosti $< 2 \mu\text{m}$, což vede k dosažení vyšší účinnosti, a tím i rozlišení separace. Díky tomu je možné použít kratší kolony oproti HPLC a docílit tak rychlejších analýz bez ztráty účinnosti. Oproti HPLC jsou v UHPLC používány kolony s nižším průměrem, což vede k nižšímu průtoku MF, resp. spotřeby MF, a to je benefit jak ekologický, tak ekonomický. Ve srovnání s HPLC je UHPLC charakterizována lepší účinností separace a umožňuje analytické úkoly provádět rychleji [14][18][23]. Menší velikost použitých částic SF oproti HPLC ale způsobuje zvýšení zpětného tlaku v systému, tj. pracovní tlaky 100-150 MPa. Vysoký pracovní tlak je řešen pomocí instrumentace UHPLC, která je oproti HPLC vybavena tlaku-odolnými pevnými spojeními, ultra-vysokotlakými čerpadly a automatickými dávkovači, dále jsou v UHPLC používány mechanicky a chemicky stabilní SF [14][15][23][24][25].

Separace pomocí UHPLC může být značně ovlivněna mimokolonovými objemy, které je nutné minimalizovat. To je provedeno použitím kapilár menších průměrů (2,1 mm) a použitím speciálních nízkoobjemových detekčních cel. Dále je nutné snižovat objem nastříkovaného vzorku tak, aby nedošlo k přesycení kolony a detektoru, a tím ke snížení

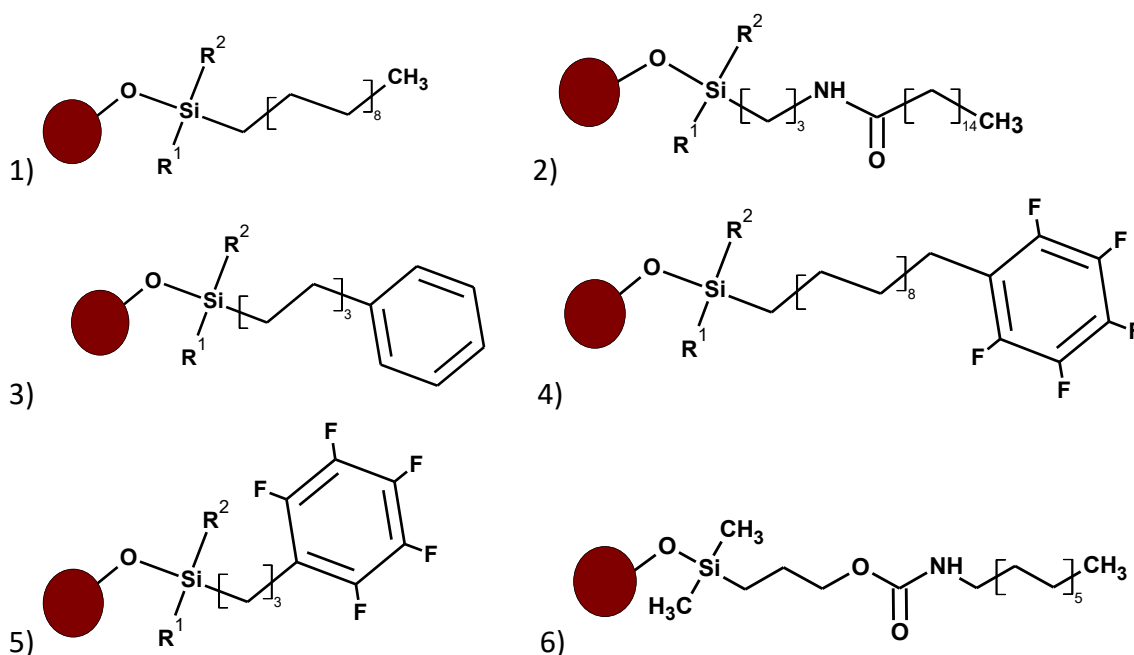
separační účinnosti. V UHPLC je zapotřebí použití detektorů s rychlostí sběru dat ≥ 20 Hz. Nevýhodou této metody oproti HPLC je vyšší pořizovací cena [14][24][25].

Základní materiál pro SF v UHPLC je nejčastěji silikagel, modifikovaný silikagel anebo hybridní materiál. **BEH** neboli „bridged ethylene hybrid“ (Obr. č. 4), tedy etylenem zesítěný hybrid, je hybridní materiál pro výrobu UHPLC kolon, který byl vyvinutý firmou Waters. Tento materiál obsahuje etylenové můstky v silikagelové matici, čímž je docíleno stability v širším rozsahu pH [26][27]. Rozdíl mezi tímto a dříve zmíněným **X-Bridge** materiálem je pouze ve velikosti částic [19]. Při výrobě UHPLC kolon je také využívána **CSH** technologie úpravy částic [28].

V Tab. č. 3 je uveden přehled analytických kolon použitých v této práci. Jedná se o hybridní a silikagelové kolony, jejichž povrch byl modifikovaný (Obr. č. 5.) 18uhlíkatým řetězcem, alkylem s vloženou amidovou skupinou, fenyl-hexylem, nebo případně uhlíkatým řetězcem s fluorovaným fenylovým jádrem. Modifikace silikagelu typu „Shield“ označuje vložení karbamátové skupiny mezi silikagel a alkyl, čímž se oproti modifikaci povrchu alkylem bez karbamátové skupiny změní selektivita především pro fenolické sloučeniny a může se zlepšit tvar píků bazických analytů [29].

Tab. č. 3: Přehled použitých analytických kolon s jejich stabilitními limity

analytická kolona	stabilitní rozsah pH	teplotní stabilita kolony	zdroj
Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm), Waters, USA	1-12	kyselé pH: 80 °C, bazické pH: 60 °C	[30]
Acquity UPLC CSH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm), Waters, USA	1-11	kyselé pH: 80 °C, bazické pH: 45 °C	[31]
Acquity UPLC BEH Phenyl (100 x 2,1 mm, 1,7 μm), Waters, USA	1-12	kyselé pH: 80 °C, bazické pH: 60 °C	[32]
Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl (100 x 2,1 mm, 1,7 μm), Waters, USA	1-11	kyselé pH: 80 °C, bazické pH: 45 °C	[33]
Arion Plus C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm), Arion, ČR	1-10	<100 °C	[34]
Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μm), Waters, USA	2-11	kyselé pH: 50 °C, bazické pH: 45 °C	[35]
Ascentis Express RP-Amide (100 x 2,1 mm, 2,7 μm), Supelco, USA	2-9	<60 °C	[36]
ACE Excel C18-PFP (100 x 2,1 mm, 1,7 μm), ACE, Skotsko	2-8	<60 °C	[37]
Kinetex PFP (100 x 2,1 mm, 2,6 μm), Phenomenex, USA	1,5-8	<60 °C	[38]
Kinetex F5 (100 x 2,1 mm, 2,6 μm), Phenomenex, USA	1,5-8,5	<60 °C	[39]



Obr. č. 5: Schémata modifikací materiálu pro výrobu kolon: 1) C18 2) RP-amid 3) fenyl, fenyl-hexyl 4) C18-PFP 5) F5, PFP 6) Shield [40][41]

3.4. Hmotnostní spektrometrie

MS vyniká svou citlivostí a selektivitou. Je vhodná pro identifikaci i kvantifikaci látek a nalézá uplatnění jak v analýzách malých molekul, tak v „omických“ studiích

[14][42]. Je také součástí různých odvětví, kdy se například využívá také při vývoji léčiv, kontrole kvality ve farmaceutickém průmyslu [43]. Dále je využívána v geologických a environmentálních vědách [44], kdy se sleduje znečištění životního prostředí nebo provádí izotopová analýza. Má zastoupení i ve forenzní vědě pro MS analýzy chemických stop ve forezních vzorcích jako jsou drogy, výbušniny a toxiny [45]. Pomocí MS se také kontroluje kvalita a bezpečnost potravin v potravinářském průmyslu [46].

3.5. Spojení UHPLC – MS/MS

Hmotnostní spektrometry jsou destruktivní detektory, které jsou často spojovány s UHPLC pro analýzu komplexních směsí s cílem dosáhnout vyšší selektivity, citlivosti, přesnosti a správnosti. Identifikace molekuly je možná získáním informací nejen o Mw analytů, ale také o elementárním složení a zastoupení izotopů, dále získáním informací o jejich struktuře prostřednictvím fragmentace prekurzorového iontu. Využití MS/MS bez doprovodné separační techniky není vždy dostačující, protože například izomery vykazují stejný poměr hmotnosti a náboje (m/z), tudíž by bez předchozí separace byly detekovány jako jeden signál [14][47]. Z tohoto důvodu je proto MS často spojena se separační technikou, jako je UHPLC, UHPSFC nebo GC [48][49][50].

Ionizace molekul v UHPLC-MS/MS je prováděna pomocí měkkých ionizačních technik. Mezi ně patří ionizace elektrosprejem, chemická ionizaci za atmosférického tlaku a fotoionizace za atmosférického tlaku [14]. Typ ionizace je volen podle charakteru analytu, zejména podle jeho Mw a polarity.

Analyzátory používané ve spojení s UHPLC jsou většinou jednoduché nebo trojitě kvadrupóly, lineární iontové pasti s jednotkovým rozlišením. Dále se používají analyzátory doby letu (TOF), případně orbitální pasti poskytující vyšší rozlišení [14]. V této práci byl použit trojitý kvadrupól.

Jednoduché kvadrupóly jsou ekonomické, robustní, s malými nároky na prostor v laboratoři a v porovnání s ostatními MS analyzátory relativně levné. Tyto analyzátory nedosahují vysoké rozlišovací schopnosti, mají nízkou správnost určení hmoty a nejsou ani tak rychlé ve sběru dat jako například TOF analyzátor. Tandemovým spojením vzniká trojitý kvadrupól, který je díky své vysoké citlivosti v módu SRM ideální pro kvantifikaci sloučenin ve směsích [51].

3.6. Metody pro separaci alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

Souhrn vybraných publikovaných metod pro separaci alkaloidů čeledi Amaryllidaceae je zobrazen v Tab. č. 4. Pro separaci alkaloidů je obvykle používána vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), a plynová chromatografie (GC). Uvedené separační metody byly vyvinuty pro identifikaci, profilování a charakterizaci alkaloidů v různých druzích rostlin čeledi Amaryllidaceae, nebo pro jejich kvantifikaci. Chromatografické metody byly obvykle spojeny s MS. V případě kapalinové chromatografie byla metodou ionizace ve všech případech použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu (ESI⁺), protože alkaloidy jsou zásadité povahy a H⁺ ochotně přijímají. V ojedinělých případech byla HPLC spojena pouze s UV detekcí. Pro GC-MS analýzu byly látky ionizovány pomocí elektronové ionizace.

SF byla v HPLC, resp. v UHPLC nejčastěji C18. Vodnou částí MF byla nejčastěji voda s kyselinou mravenčí, ale někdy byla také použita aditiva jako mravenčan amonný, octan amonný, octan amonný spolu s dodecylsulfátem sodným a s fosforečnanem sodným. Organickou složkou MF byl nejčastěji ACN, v některých analýzách byl použitý i MeOH. V obou případech byly organické složky MF s přídavkem 0,1 % kyseliny mravenčí. Analýzy byly provedeny nejčastěji pomocí gradientové eluce. Čas analýz se pohyboval v rozmezí 8-72 min. Kratší analýzy trvající 8-18 minut byly použity k identifikaci maximálně 17 alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae, kdy kvantifikováno bylo maximálně 8 z těchto identifikovaných alkaloidů. Nejčastěji kvantifikované byly alkaloidy LYC a GAL. K identifikaci 28-37 alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae došlo až při analýzách trvající 50-70 minut [52][53][54][55][56][57][58][59][60][61][63]. V žádné z uvedených metod nebylo analyzováno celé spektrum alkaloidů, které bylo zvoleno pro tuto práci.

V GC metodách byla nejčastěji použita kolona Sapiens X5 (silfenylová polymerní fáze, [62]) a nosným plynem bylo vždy helium. Čas analýz se pohyboval v rozmezí 40-52 min. Tato separační metoda je převážně využívána k identifikaci analytů pomocí porovnání fragmentačních spekter analyzovaných látek s referenční knihovnou spekter. V dohledaných metodách bylo identifikováno maximálně 37 alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae v jedné analýze [8][64][65][66].

V literatuře lze nalézt i studie, kde byla použita kapilární elektroforéza ve spojení s MS [67][68]. V preparativní analýze je k separaci alkaloidů čeledi Amaryllidaceae využívána sloupcová chromatografie, tenkovrstvá kapalinová chromatografie (TLC), extrakce na tuhou fázi, preparativní HPLC nebo rekrystalizace [69][70][71][72].

Tab. č. 4: Přehled publikovaných metod metod pro separaci alkaloidů čeledi Amaryllidaceae

počet analyzovaných alkaloidů v metodě, počet analytů ze spektra vybraného pro tuto práci výčet těchto alkaloidů	separační metoda	SF	MF	doba analýzy (čas gradientu)	autor
37, 3/30 LYC, GAL, NOR	UHPLC-MS/MS	BEH C18 (2,1 × 100 mm, 1,7μm)	A: H ₂ O (0,01 % FA a 20 mM AmF) B: ACN	50 min (45,5 min)	Li et al [52]
17, 4/30 LYC, HLC, DMG, HMA	UHPLC-UV UHPLC- HRMS	BEH C18 (2,1 × 100 mm, 1,7μm)	A: H ₂ O + 0,1 % FA B: MeOH + 0,1 % FA	18 min (15,5 min)	Katoch et Sharma [53]
28, 2/30 CRI, HMA	UHPLC-UV HPLC- HRMS	TSK-GEL ODS-100V (4,6 × 150 mm, 3 μm)	B: H ₂ O + 0,2 % AA a 40 mM AmAc A: ACN	(70 min)	Zhang et al [54]
29, 8/30 LYC, ODU, AMB, VIT, CRI, NRW, HMA, HIP	UHPLC-UV HPLC- MS/MS	C18 (2,0 × 150 mm, 5 μm)	A: H ₂ O + 40 mM AmAc B: ACN	(55 min)	Tian et al [55]
17, 6/30 GAL, CRI, HMA, AMB, HMN, VIT	UHPLC-UV UHPLC- HRMS	BEH C18 (2,1 × 100 mm, 1,7μm)	A: H ₂ O + 0,05 % FA B: ACN	8 min (6,6 min)	Katoch et al [56]
6, 3/30 HMA, HLC, TZT	HPLC-UV	Kromasil 100 C18 (4,0 × 150 mm, 5 μm)	A: H ₂ O:ACN (33:67) + 7mM dodecylsulfát sodný, 25 mM fosfát sodný, 1mM AmAc B: MeOH	13 min (9 min)	López et al [57]
34, 8/30 LYC, HTD, HMA, AMB, CRI, UND, TZT, HLC	UHPLC-UV HPLC- HRMS	Luna C18 RP (4,6 × 150 mm, 3 μm)	A: H ₂ O:MeOH (5:95) + 0,1 % FA B: H ₂ O:ACN (5:95) + 0,1 % FA	50min (41 min)	Nair et al [58]
4, 2/30 UND, ACA	UHPLC-UV UHPLC- HRMS	BEH C18 (2,1 × 150 mm, 1,7 μm)	A: NH ₄ OH 0,1 % ve vodě B: ACN	14 min (12 min)	Sibanyoni et al [59]

15, 7/30 LYC, HMN, GAL, NRW, VIT, TZT, HMN	HPLC- MS/MS	Synergi C18 (3,0 × 100 mm, 2,5 μm)	A: H ₂ O + 0,1 % FA B: ACN + 0,1 % FA	18 min (13 min)	Atrahimovich et al [60]
14, 7/30 ACA, AMB, CAR, CRN, GAL, LYC, UND	HPLC-UV HPLC- MS/MS	Nucleosil 100-5 C18 AB (4,0 × 250 mm)	A: MeOH:THF (1000:5 v/v) B: 75 mM AmAc + 5% AA:THF:ACN (1000:10:50 v/v)	72 min (52 min)	Queckenberg et al [61]
2, 2/30 LYC, GAL	HPLC-UV	Hichrom 5 C18 (4,6 × 250 mm, 5 μm)	CF ₃ COOH:H ₂ O:ACN (0,01:90:10)	(10 min)	Karakoyun et al [63]
30, 10/30 LYC, GAL, NOR, CAR, HLC, HIP, HMA, HTD, TZT, NRW	GC-MS	HP-5 (0,25 mm x 30 m, tloušťka filmu 0,25 μm)	He	40 min	Guo et al [64]
11, 7/30 CAR, LYC, VIT, CRN, HMA, HXV, HMN	GC-MS	Sapiens-X5 (0,25 mm x 30 m, tloušťka filmu 0,25 mm)	He	52 min	León et al [65]
37, 11/30 VIT, CRN, HMA, HXV, UND, AMB, CRI, ACA, GAL, LYC, TZT	GC-MS	Sapiens-X5 (0,25 mm x 30 m, tloušťka filmu 0,25 mm)	He	52 min	del C. Rojas-Vera et al [8]
9, 4/30 HMA, HTD, LYC, TZT	GC-MS	DB5 (0,25 mm x 30 m, tloušťka filmu 0,25 mm)	He	41 min	Zaragoza- Puchol et al [66]

AA – kyselina octová, ACN – acetonitril, AmAc – octan amonný, AmF – mravenčan amonný, ESI⁺ – ionizace elektrosprejem v pozitivním módu, FA – kyselina mravenčí, H₂O – voda, HRMS – hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, MS/MS – tandemová hmotnostní detekce, THF – tetrahydrofuran

4. Experimentální část

4.1. Použité přístroje a pomůcky

UHPLC-PDA:

- Acquity UPLC (čerpadlo, automatický dávkovač, kolonový termostat), PDA detektor, Waters, USA
- vyhodnocovací program: Empower, Waters, USA

UHPLC-MS/MS:

- Acquity UPLC I-Class PLUS systém, (čerpadlo, automatický dávkovač, kolonový termostat), Waters, USA
- MS detektor (Xevo TQ-XS trojitý kvadrupól), Waters, Velká Británie
- vyhodnocovací program: MassLynx 4.1, TargetLynx XS, Waters, USA

Laboratorní přístroje:

- laboratorní pH metr: Microprocessor pH Meter pH 212, Hanna instruments, USA
- magnetická míchačka: RET basic, Německo
- třepačka: Ika Vortex, Sigma-Aldrich, ČR
- automatické pipety: Eppendorf Reference 2, Eppendorf, ČR
- ultrazvuková vodní lázeň: Sonorex Digitec, Bandelin Electronic, Německo
- ruční analytický mlýnek IKA A: IKA-Werke GmH & Co. KG, Německo
- superkritická fluidní extrakce: systém MV-10 ASFE, Waters, USA

4.2. Použité chemikálie

- ultračistá voda (pro účely UHPLC-PDA): Mili-Q, Millipore, Lach-Ner, ČR
- voda pro LC-MS, VWR BDH Chemicals, Francie
- acetonitril pro LC-MS, Fisher Chemical, Velká Británie
- metanol pro LC-MS, Fisher Chemical, Velká Británie
- kyselina mravenčí pro LC-MS, minimum $\geq 99\%$, VWR BDH Chemicals, Velká Británie
- 25 % roztok amoniaku pro LC-MS, minimum 25 % ve vodě, Merck, ČR

4.3. Použité analytické kolony

V této diplomové práci byly použity kolony:

- Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), Waters, USA
- Acquity UPLC CSH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), Waters, USA
- Acquity UPLC BEH Phenyl (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), Waters, USA
- Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), Waters, USA
- Arion Plus C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), Arion, ČR
- Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), Waters, USA
- Ascentis Express RP-Amide (100 x 2,1 mm, 2,7 µm), Supelco, USA
- ACE Excel C18-PFP (100 x 2,1 mm, 1,7 µm), ACE, Skotsko
- Kinetex PFP (100 x 2,1 mm, 2,6 µm), Phenomenex, USA
- Kinetex F5 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm), Phenomenex, USA

4.4. Standardy alkaloidů a rostlinný materiál

Standardy alkaloidů pocházely z Katedry farmakognozie FaF UK. Nejednalo se o referenční standardy s deklarovanou čistotou, a tak bylo nutné počítat s nečistotami. Tyto nečistoty byly přítomné již v navážkách standardů, i přestože byly kontrolovány pomocí NMR, GC-MS, LC-MS. Katedrou byly poskytnuty navážky vitatinu, krininu, karaninu, seko-isopowellaminonu, norpluvinu, narwedinu, lykorinu, 11-hydroxyvittatinu, hamaynu, epimaratinu, chlidanthinu, lykoraminonu, masoninu, odulinu, 9-O-demethylhomolykorinu, haemantaminu, 9-O-demetylgalantinu, tetrahydromasoninu, acetylkaraninu, homolykorinu, hippeastrinu, krinamidinu, haemantidinu, lykoreninu, galantinu, 1-O-acetylykorinu, tazettinu, undulatinu, ambellinu a O-ethyllykoreninu. Tyto alkaloidy byly získané z různých rostlin čeledi Amaryllidaceae (npř. *Narcissus pseudonarcissus* cv. Dutch Master [73], *Nerine bowdenii* [74], *Hippeastrum X hybridum* cv. Ferrari [75], *Zephyranthes robusta* [76], *Chlidanthus fragrans* [77], *Clivia miniata* [78], *Zephyranthes citrina* [79],...). Největší obsah alkaloidů je v podzemních částech rostlin, a právě z těchto částí jsou alkaloidy nejčastěji izolovány. V uvedených pracích byly k izolaci alkaloidů použity cibule, ojediněle byly použity celé rostliny.

Kolegy z Katedry farmakognozie FaF UK byly alkaloidy izolovány extrakcí z tuhé do kapalné fáze. Obecně lze říci, že rostlinný materiál byl extrahován v 96 % roztoku etanolu ve vodě 3x30 min pod zpětným chladičem. Získaný extrakt byl filtrován a odpařen, dále byl rozpuštěn v 2 nebo 5 % HCl a odtučněn hexanem, benzínem nebo chloroformem. Poté byl extrakt zalkalizován 10 % hydrogenuhličitanem sodným na pH cca 9-10 a alkaloidy byly extrahovány do dietyléteru a následně do chloroformu případně do ethylacetátu. Získaný extrakt terciárních bází byl dále dělen velkou Flash chromatografií, kde byly získány frakce alkaloidů. Frakce s podobným profilem obsahu alkaloidů se následně spojily (ověřováno TLC) a byly dále děleny buďto menší Flash chromatografií, na preparativních TLC deskách, preparativním HPLC systémem nebo rekrytalizací [73][74][75][76][77][78][79].

Pro identifikaci byla využita GC s MS detekcí za použití elektronové ionizace. Tato metoda umožnila určení přesných molekulových hmot alkaloidů a získání fragmentačních spekter, která byla následně srovnána s knihovnou spekter. Pro určení struktury byla použita 1D i 2D NMR. Pro ověření přesné hmoty byla použita kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením [73][74][75][76][77][78][79].

Rostlinné materiály byly taktéž poskytnuty Katedrou farmakognozie FaF UK. Jednalo se o mrazem sušené cibule rodu *Narcissus*, *čeledi* Amaryllidaceae, a o listy *Crinum asiaticum*, *čeledi* Amaryllidaceae sušené na vzduchu. Příprava vzorků z těchto rostlinných materiálů je popsána v kapitole 4.5.4., jejich analýza pak v kapitole 5.6.

4.5. Příprava roztoků standardů

4.5.1. Zásobní a pracovní roztoky standardů

Byly připraveny zásobní roztoky standardů o koncentraci 10^{-3} g/ml, s výjimkou LYC a ACA, které byly připraveny o koncentraci 10^{-4} g/ml. Ve všech případech byl použitým rozpouštědlem čistý acetonitril (ACN). U přípravy zásobních roztoků standardů NOR, LYC, CHL, ODU, ACA, AMB byla rozpustnost v ACN podpořena přidavkem 1-20 μ l kyseliny mravenčí (FA) s následným použitím ultrazvuku. Skladovány byly při 8 °C v lednici do spotřebování.

Pracovní roztoky standardů pro *analýzu pomocí UHPLC-PDA* byly ředěny na koncentraci 10^{-5} g/ml. Takto připravené standardy byly používány měsíc, protože po delší době byly na chromatogramech pozorovány píky degradačních produktů.

Pracovní roztoky standardů pro *UHPLC-MS/MS analýzu* byly ředěny na koncentraci 10^{-8} g/ml a používány po dobu jednoho měsíce. Pro měření vybraných validačních parametrů metody byly připraveny čerstvé roztoky.

Na systému UHPLC-PDA byl proveden screening kolon, na kterých byly analyzovány směsi izomerních standardů dle Tab. č. 5.

Tab. č. 5: Rozdělení analytů do směsí podle Mw

Mw 271	Mw 287	Mw 301	Mw 303	Mw 315	Mw 317	Mw 331	neizomerní analyty
VIT	LYC	DHM	DMG	HIP	GAL	AMB	NOR
CRN	HXV	ODU	THM	HLC	LCN	TZT	NRW
CAR	HMN	HMA			HTD	UND	MAS
IPW	EPM				CRI		ALY
	CHL						ACA
	LCA						o-ELC

Mw – molekulová hmotnost

Při optimalizaci UHPLC metody na systému UHPLC-MS/MS, byly připraveny dvě směsi pracovních roztoků analyzovaných alkaloidů. Tyto směsi byly připraveny pro podmínku MeOH / AmF pH 9 na třech kolonách, na kterých probíhala další optimalizace separace (Tab. č. 6.), tak, aby se retenční časy (t_R) izomerních látek lišily. Tato strategie umožnila identifikaci jednotlivých alkaloidů a jejich případných izomerů s blízkými t_R aniž by došlo k jejich záměně v případě změny retenčního chování při optimalizaci UHPLC metody.

Tab. č. 6: Přehled složení směsí pro kolony, na kterých byla optimalizována separace na systému UHPLC-MS/MS

C18-PFP MeOH / AmF pH 3		BEH Phenyl MeOH / AmF pH 9		CSH Phenyl-hexyl / CSH C18 MeOH / AmF pH 9	
směs 1	směs 2	směs 1	směs 2	směs 1	směs 2
VIT	CRN	VIT	CRN	VIT	CRN
IPW	CAR	IPW	CAR	IPW	CAR
HXV	EPM	HXV	EPM	HXV	EPM
LYC	CHL	LYC	CHL	CHL	LYC
HMN	LCA	HMN	LCA	HMN	LCA
DHM	DMG	DHM	DMG	DHM	ODU
ODU		ODU		HMA	
HMA		HMA		DMG	
THM		THM		THM	
HIP		HIP		HIP	
HLC		HLC		HLC	
GAL		GAL		GAL	
LCN		LCN		LCN	
HTD		HTD		HTD	
CRI		CRI		CRI	
AMB		AMB		AMB	
TZT		TZT		TZT	
UND		UND		UND	
NOR		NOR		NOR	
NRW		NRW		NRW	
MAS		MAS		MAS	
ALY		ALY		ALY	
ACA		ACA		ACA	
o-ELC		o-ELC		o-ELC	

4.5.2. Příprava mobilní fáze

Vodná složka

Pufř mravenčanu amonného (AmF) o pH 3 byl připraven tak, že do téměř 1 l vody bylo přidáno 370 µl HCOOH a za použití pH metru byl postupně přidáván roztok amoniaku, dokud se pH neustálilo na 3,00. Objem pufřu byl následně na 1 l doplněn. Roztok amoniaku byl připraven přidáním 75 µl 25 % roztoku amoniaku do 500 µl vody.

Pufř AmF o pH 9 byl připraven tak, že do téměř 1 l vody bylo přidáno 740 µl 25 % NH₄OH a za použití pH metru byl postupně přidáván roztok HCOOH, dokud se pH neustálilo na 9,00. Objem pufřu byl následně na 1 l doplněn. Roztok HCOOH byl připraven přidáním 100 µl HCOOH do 500 µl vody.

Obdobně byl připraven pufř AmF o pH 9,50 a 10,00.

Organická složka

Během screeningu kolon byl používán buď čistý metanol (MeOH) nebo čistý ACN. V rámci optimalizace vlivu organické složky MF byly testovány směsi MeOH:ACN v objemových poměrech 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, které byly připraveny za použití odměrného válce.

4.5.3. Pomocné kapaliny pro UHPLC systém

Jako silná oplachová kapalina byl použit čistý ACN. Slabou oplachovou kapalinou byl 10 % roztok ACN připravený za pomoci odměrného válce, kterým bylo odměřeno 100 ml ACN a 900 ml vody. Oplachovou kapalinou pro písty čerpadla byl 10 % roztok MeOH připravený obdobně jako 10% roztok ACN.

4.5.4. Příprava vzorků z rostlinných materiálů

Vzorky z rostlinného materiálu byly připraveny PharmDr. Veronikou Pilařovou, Ph.D. a byly poskytnuty k analýze pomocí UHPLC-MS/MS metody, která byla v rámci této práce vyvinuta.

Daný typ rostlinného materiálu (4.4) byl rozemlet na prášek pomocí ručního analytického mlýnku. Rostlinný extrakt sušených cibulí rodu *Narcissus*, resp. sušených listů *Crinum asiaticum*, byl získán superkritickou fluidní extrakcí (SFE) 1 g navážky rozemleté rostlinné drogy. Ta byla umístěna do extrakční SFE cely o objemu 5 ml, a následně byl objem cely doplněn inertními skleněnými kuličkami o průměru 3 mm.

Pro extrakci *alkaloidů z listů* byl použit oxid uhličitý a 80 % roztok etanolu ve vodě v objemovém poměru 50:50 za konstantního průtoku 2 ml/min. Pro extrakci byl použit dynamický mód. Teplota pro extrakci byla nastavena na 67 °C a tlak na zpětném regulátoru tlaku byl 217 bar. Extrakt byl sbírán po dobu 30 minut. Získané extrakty byly před analýzou skladovány v mrazícím boxu o teplotě -20 °C.

Pro extrakci *alkaloidů z cibulí* byl použit oxid uhličitý a 80 % roztok etanolu ve vodě v objemovém poměru 50:50 za konstantního průtoku 2 ml/min. Pro extrakci byl použit dynamický mód. Teplota pro extrakci byla nastavena na 50 °C a tlak na zpětném regulátoru tlaku byl 107 bar. Extrakt byl sbírán po dobu 30 minut. Získané extrakty byly před analýzou skladovány v mrazícím boxu o teplotě -20 °C.

Po každé extrakci byla extrakční cela vyjmuta ze systému a systém byl promyt směsí CO₂ a etanolu po dobu 5 minut pro zamezení případných přenosů mezi jednotlivými vzorky, a následně čistým CO₂ pro odstranění zbytkového rozpouštědla.

Pro analýzu (5.6) byly použity nenařaděné extrakty obou typů rostlinného materiálu a vzorky, které byly připraveny ředěním (20x a 100x) obou těchto extraktů.

4.6. Nastavení UHPLC-PDA metody pro screening kolon

Screening kolon probíhal na systému UHPLC-PDA. Parametry metody byly následující:

mobilní fáze:	složka A: AmF pH 3 / AmF pH 9, 10 mM složka B: ACN nebo MeOH
průtok:	0,4 ml/min
dávkovaný objem:	2 µl pro nástřiky jednotlivých alkaloidů, 3 µl pro směsi alkaloidů s danou Mw (Tab. č. 5)
teplota kolony:	40 °C
teplota automatického dávkovače vzorku:	10 °C
silná oplachová kapalina:	100 % ACN
slabá oplachová kapalina:	10 % roztok ACN ve vodě
oplachová kapalina pro píсты čerpadla:	10 % roztok MeOH ve vodě
použitý gradien + 2 minuty ekvilibrace:	viz Tab. č. 7
detekce:	UV 290 nm

Tab. č. 7: Základní UHPLC gradient pro screening kolon

čas [min]	průtok [ml/min]	% A	% B	křivka
0,00	0,40	98,00	2,00	initial
5,00	0,40	2,00	98,00	6,00
5,10	0,40	98,00	2,00	6,00
7,00	0,40	98,00	2,00	6,00

4.7. Optimalizace MS metody – iontový zdroj a SRM přechody

Optimalizace parametrů MS/MS probíhala za použití následujících chromatografických podmínek: SF Acquity UPLC BEH Phenyl, MF MeOH / AmF pH 3. Další podmínky byly nastaveny shodně s podmínkami uvedenými v kapitole 4.6. Měřeny byly

pracovní roztoky jednotlivých standardů o koncentraci 10^{-8} g/ml. Nejprve byl proveden MS sken, při kterém byl proměřen celkový iontový proud v rozsahu hmot m/z 90-750. Nastavení analyzátoru pro měření MS skenu je uvedeno v Tab. č. 8. Přehled optimalizovaných parametrů iontového zdroje je uveden v Tab. č. 9 včetně testovaných rozmezí a hodnot. Fragmentační spektra konkrétních alkaloidů byla zjištěna pomocí skenu produktových iontů při kolizní energii (CE) 10, 20 a 30 eV. Nejintenzivnější fragmenty byly využity pro tvorbu SRM metody. Optimalizace CE pro jednotlivé alkaloidy byla provedena za pomoci vybraných SRM přechodů při kolizních energiích 5-45 eV s inkrementem 5 ($\Delta 5$). Kolizním plynem byl argon.

Tab. č. 8: Hodnoty nastavení MS analyzátoru pro měření MS skenů

parametr	hodnota
rozlišení na nízkých m/z 1 (LM Resolution 1):	2,67
rozlišení při vyšších m/z 1 (HM Resolution 1):	14,90
ionizační energie 1 (Ion Energy 1):	0,5
rozlišení na nízkých m/z 2 (LM Resolution 2):	2,64
rozlišení při vyšších m/z 2 (HM Resolution 2):	14,76
ionizační energie 2 (Ion Energy 2):	0,9
průtok kolizního plynu (Collision Gas Flow):	0,1
kolizní energie (Collision):	4

Tab. č. 9: Přehled optimalizovaných parametrů iontového zdroje a testovaný rozsah hodnot

optimalizovaný parametr	rozsah hodnot
napětí na vstupním kuželu [V]	10-55 ($\Delta 5$)
napětí na kapiláře [kV]	1,0-3,5 ($\Delta 0,5$)
desolvatační teplota [°C]	300-600 ($\Delta 50$)
průtok desolvatačního plynu [l/h]	500, 750, 1000, 1200
průtok na vstupním kuželu [l/h]	150-350 ($\Delta 50$)

4.8. Parametry vyvinuté metody UHPLC-MS/MS

UHPLC metoda

kolona:	Acquity UPLC BEH Phenyl (100 x 2,1 mm, 1,7 μ m)
mobilní fáze:	složka A: AmF pH 9, 10 mM složka B: MeOH:ACN 3:1 (v/v)
průtok:	0,4 ml/min
dávkový objem:	2 μ l

teplota kolony:	50 °C
teplota automatického dávkovače vzorku:	10 °C
silná oplachová kapalina:	100 % ACN
slabá oplachová kapalina:	10 % roztok ACN ve vodě
oplachová kapalina pro píсты čerpadla:	10 % roztok MeOH ve vodě
použitý gradient + 2 minuty ekvibrace:	viz Tab. č. 10

Tab. č. 10: Optimalizovaný UHPLC gradient vyvinuté metody

čas [min]	průtok [ml/min]	% A	% B	křivka
0,00	0,40	80,00	20,00	initial
9,00	0,40	50,00	50,00	6,00
10,00	0,40	30,00	70,00	6,00
10,10	0,40	80,00	20,00	6,00
12,00	0,40	80,00	20,00	6,00

MS/MS detekce – Nastavení iontového zdroje

Optimalizované parametry iontového zdroje jsou shrnuty v Tab. č. 11.

Tab. č. 11: Optimalizované parametry iontového zdroje

parametr	nastavená hodnota
napětí na vstupním kuželu [V]	35
napětí na kapiláře [kV]	1,0
desolvatační teplota [°C]	600
průtok desolvatačního plynu [l/h]	1200
průtok na vstupním kuželu [l/h]	250

MS/MS detekce – nastavení analyzátoru a SRM

Optimalizované SRM přechody jsou uvedeny v Tab. č. 12. Nastavení analyzátoru je shrnuto v Tab. č. 13.

Tab. č. 12: Přehled optimalizovaných SRM přechodů vyvinuté metody

zkratka	SRM1 identifikační	CE [eV]	CV [V]	SRM2 konfirmační	CE [eV]	CV [V]
VIT	272.03 > 135.98	25	35	272.03 > 195.99	30	35
CRN	272.03 > 135.98	25	35	272.03 > 195.99	30	35
CAR	272.05 > 146.97	30	35	272.05 > 118.98	35	35
IPW	272.05 > 211.98	25	35	272.05 > 200.99	25	35
NOR	274.07 > 146.96	30	35	274.07 > 118.95	35	35
NRW	286.07 > 229.07	20	35	286.07 > 225.07	20	35
LYC	288.03 > 147.04	30	35	288.03 > 119.01	35	35
HXV	288.04 > 196.05	30	35	288.04 > 226.08	25	35
HMN	288.01 > 226.05	25	35	288.01 > 181.01	25	35
EPM	288.07 > 118.04	25	35	288.01 > 270.12	20	35
CHL	288.08 > 199.03	25	35	288.08 > 184.03	35	35
LCA	288.06 > 231.10	20	35	288.06 > 161.05	30	35
MAS	300.03 > 282.12	20	35	300.03 > 224.10	30	35
ODU	302.04 > 284.08	20	35	302.04 > 223.00	20	35
DHM	302.03 > 284.06	20	35	302.03 > 251.04	30	35
HMA	302.05 > 226.01	25	35	302.05 > 181.00	30	35
DMG	304.06 > 146.97	30	35	304.06 > 272.09	20	35
THM	304.06 > 286.07	15	35	304.06 > 146.96	30	35
ACA	314.03 > 254.08	20	35	314.03 > 160.00	30	35
HLC	316.05 > 298.11	20	35	316.05 > 207.04	20	35
HIP	316.03 > 181.00	30	35	316.03 > 239.04	20	35
CRI	318.06 > 177.03	25	35	318.06 > 179.04	30	35
HTD	318.05 > 199.03	25	35	318.05 > 286.10	15	35
LCN	318.05 > 300.14	20	35	318.05 > 239.14	20	35
GAL	318.06 > 162.03	30	35	318.05 > 286.10	20	35
ALY	330.01 > 133.97	25	35	330.01 > 270.06	20	35
TZT	332.04 > 314.06	15	35	332.04 > 181.01	30	35
UND	332.05 > 272.06	25	35	332.05 > 178.99	30	35
AMB	332.04 > 271.04	20	35	332.04 > 243.04	25	35
o-ELC	346.08 > 300.05	20	35	346.08 > 191.02	20	35

CE – kolizní energie, CV – napětí na vstupním kuželu

Tab. č. 13: Hodnoty nastavení MS analyzátoru pro optimalizaci SRM

parametr	hodnota
rozlišení na nízkých m/z 1 (LM Resolution 1):	2,74
rozlišení při vyšších m/z 1 (HM Resolution 1):	14,76
ionizační energie 1 (Ion Energy 1):	0,1
rozlišení na nízkých m/z 2 (LM Resolution 2):	2,74
rozlišení při vyšších m/z 2 (HM Resolution 2):	15,01
ionizační energie 2 (Ion Energy 2):	0,5
průtok kolizního plynu (Collision Gas Flow):	0,2
kolizní energie (Collision):	10

4.9. Vybrané validační parametry

4.9.1. Kalibrační křivka: rozsah a linearita

Analyzovány byly čerstvé pracovní roztoky směsí 1 a 2, jak je uvedeno v Tab. č. 6. Z těchto roztoků, které byly ředěny na koncentraci 10 µg/ml ze zásobních roztoků standardů, byla připravena kalibrační řada s koncentracemi 0,01-100 ng/ml, 0,02-200 ng/ml, 0,05-500 ng/ml. Roztoky kalibračních řad byly změřeny v triplicátu. Výsledky umožnily stanovit limit kvantifikace (4.9.2). Vybrané roztoky kalibračních řad byly použity také pro analýzy opakovatelnosti metody (4.9.3). Další detaily o kalibrační křivce, rozsahu a linearitě uvedeny v kapitole 5.5.1.

4.9.2. Limit kvantifikace

Dolní limit kvantifikace (LLOQ) určen jako koncentrace, pro kterou poměr signálu k šumu byl větší než 10 a pro kterou odchylka odpovídající chybě zpětně vypočítané koncentrace z kalibrační přímky oproti nominální hodnotě nebyla větší než 20 %, pro ostatní koncentrace kalibrační křivky nebyly tyto odchylky větší než 15 %. Horní limit kvantifikace (ULOQ) zvolen jako nejvyšší analyzovaná koncentrace, při které detektor nebyl přesycen analytem a pro který odchylka nebyla větší než 15 % [80].

4.9.3. Opakovatelnost metody

Pracovní roztoky o koncentraci 0,05, 1, 10 a 100 ng/ml byly 10x změřeny. Ze získaných 10 hodnot ploch a t_R byl počítán průměr, směrodatná odchylka (SD) a relativní směrodatná odchylka (RSD). Mezi analýzou roztoků o různých koncentracích byly vloženy dva blanky, aby se zabránilo případným přenosům mezi nástřiky.

4.9.4. Selektivita metody

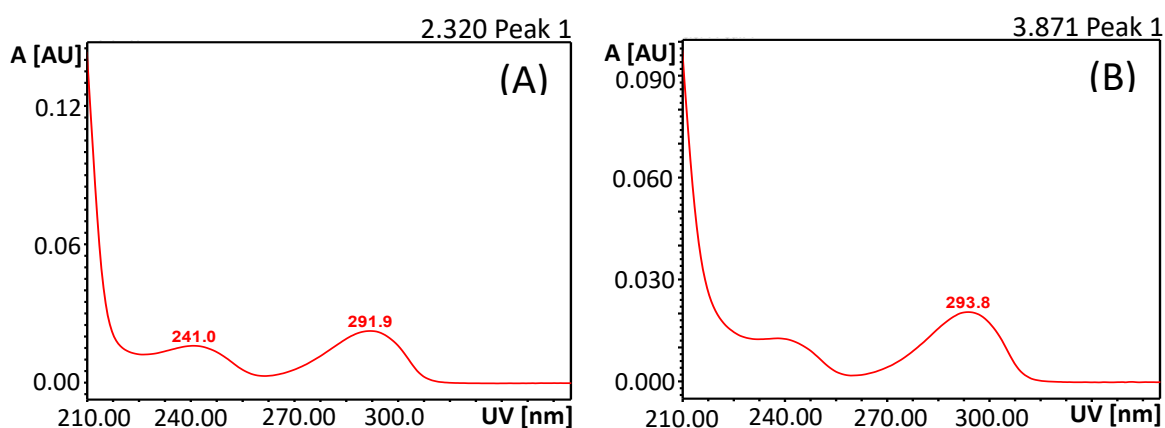
Roztoky jednotlivých standardů alkaloidů byly připraveny čerstvé a byly ředěny na koncentraci 10^{-8} g/ml. V obou optimalizovaných SRM přechodech, SRM 1 a SRM 2, byl sledován pík alkaloidu, který byl přítomný ve standardu, a jeho případné zobrazení v rámci SRM přechodů ostatních alkaloidů v celé délce analýzy.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Optimalizace UHPLC-PDA metody

5.1.1. Nastavení PDA detektoru

Nejprve byla provedena analýza jednotlivých standardů a byla získána jejich UV spektra v rozmezí vlnových délek 210-400 nm. Na Obr. č. 6 dále uvedeno UV spektrum standardu VIT. Na základě zjištěných maxim byla zvolena vlnová délka 290 nm, při které byly extrahovány chromatogramy.



Obr. č. 6: UV spektra standardu VIT při použití AmF pH 3 (A) a AmF pH 9 (B)

5.2. Optimalizace MS metody

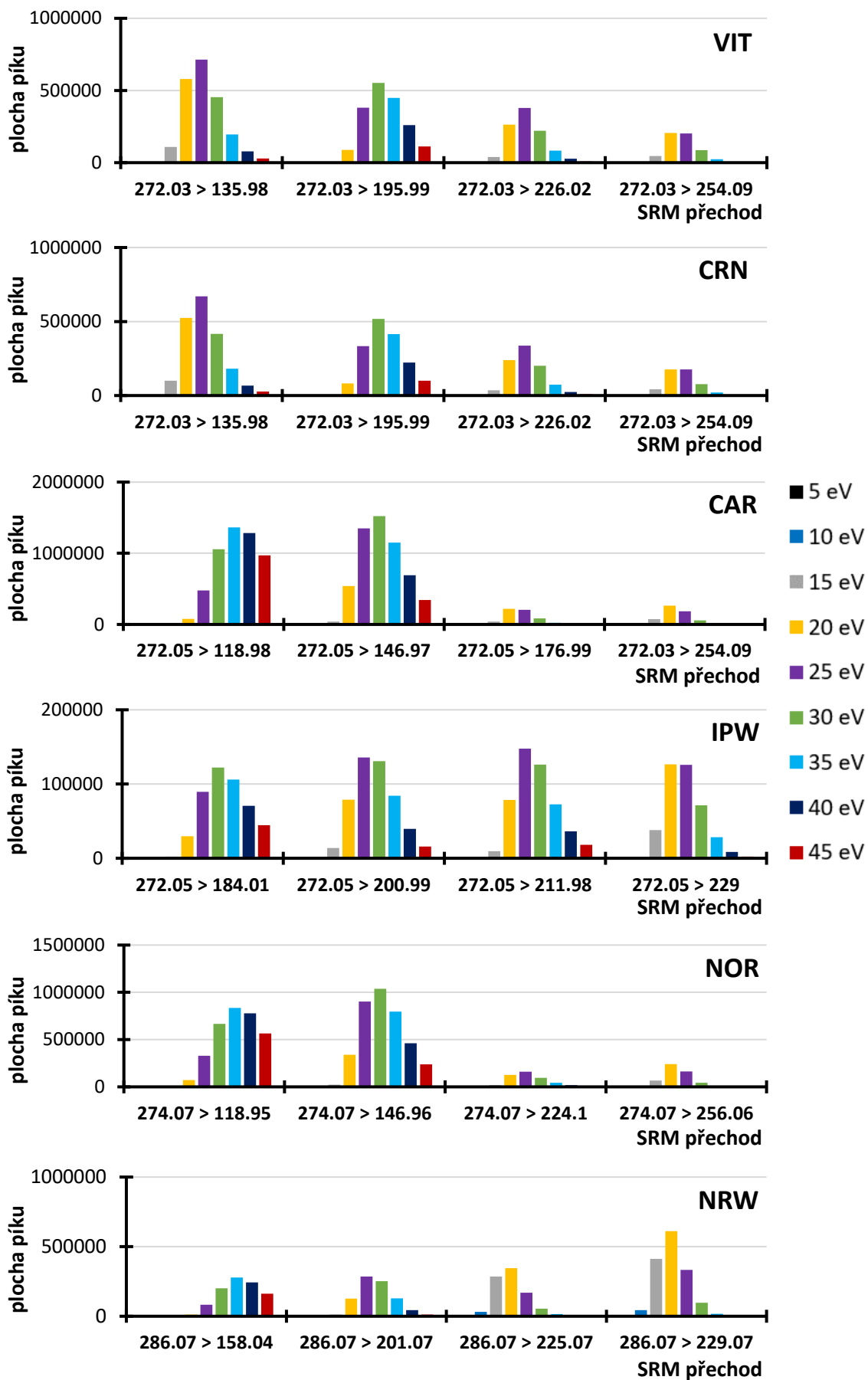
5.2.1. Optimalizace nastavení SRM přechodů

Optimalizace byla provedena s využitím ESI⁺ ionizace, protože alkaloidy jsou zásadité povahy a H⁺ ochotně přijímají. Experimentální hodnoty [M+H]⁺ každého analytu byly získány pomocí MS skenů. Následně byly získány *m/z* produktových iontů z MS/MS skenů a byly vybrány 4 nejintenzivnější fragmenty každého analytu (Tab. č. 14). Pro tyto vybrané SRM přechody byly testovány CE v rozmezí 5-45 eV s $\Delta 5$ s cílem najít podmínky, které budou poskytovat co nejvyšší odezvu detektoru. Výsledky těchto analýz jsou shrnuty v Obr. č. 7-Obr. č. 11. Nejintenzivnější SRM přechod pro jednotlivé analyty a jeho CE byl vybrán jako identifikační (SRM1, Tab. č. 12), druhý nejintenzivnější SRM byl zvolen jako konfirmační (SRM2, Tab. č. 12) pro zvýšení selektivity metody.

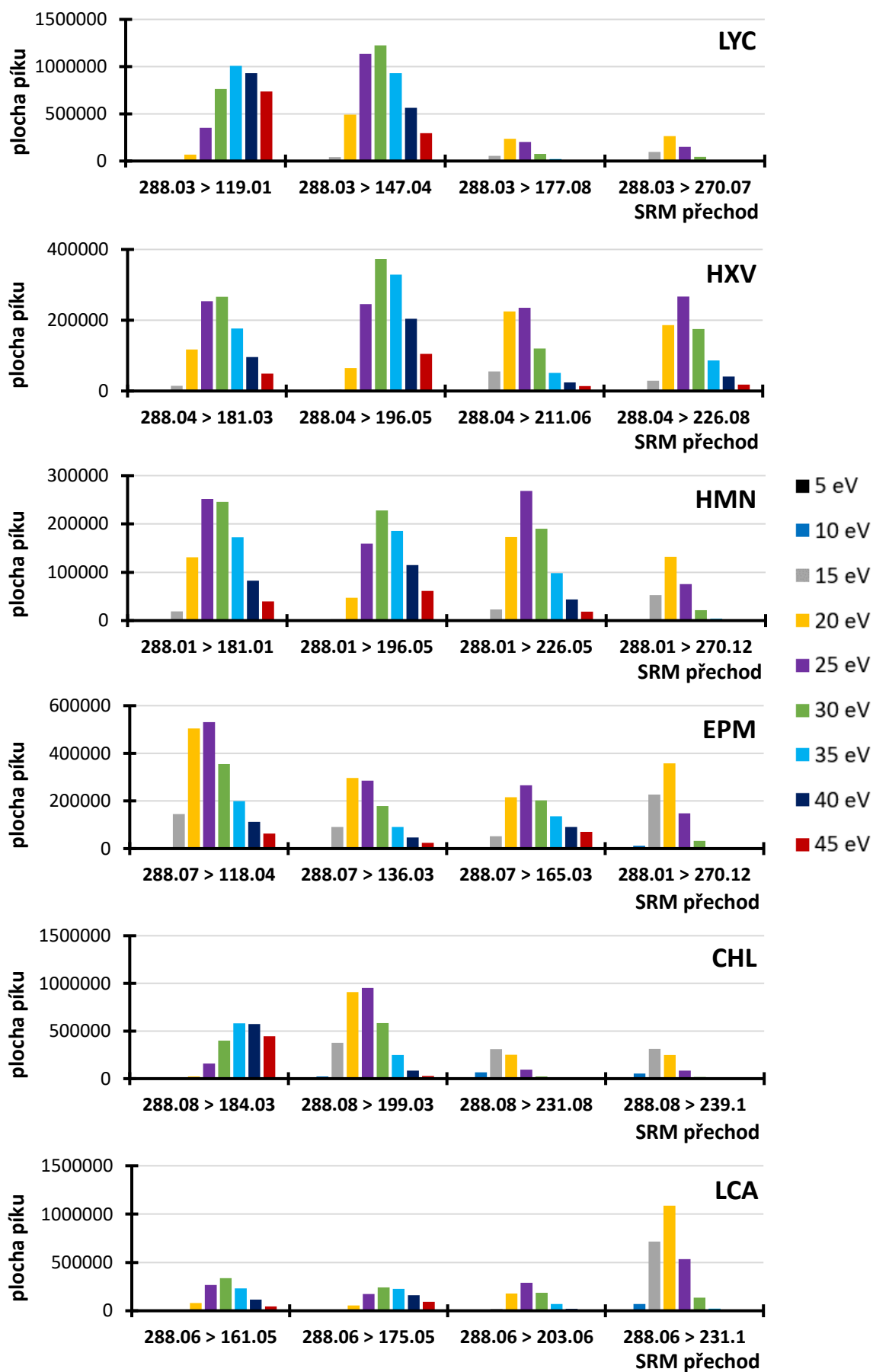
Tab. č. 14: Ionty prekurzorů a vybrané produktové ionty daného analytu z MS/MS skenu

zkratka	[M+H] ⁺ teoretická	[M+H] ⁺ experimentální	výběr 4 fragmentů (w = 2)			
VIT	272,1281	272,03	135,98	195,99	226,02	254,09
CRN	272,1281	272,05	135,99	196,02	226,03	254,05
CAR	272,1281	272,05	118,98	146,97	176,99	254,06
IPW	272,1281	272,05	184,01	200,99	211,98	229,00
NOR	274,1438	274,07	118,95	146,96	224,10	256,06
NRW	286,1438	286,07	158,04	201,07	225,07	229,07
LYC	288,1230	288,03	119,01	147,04	177,08	270,07
HXV	288,1230	288,04	181,03	196,05	211,06	226,08
HMN	288,1230	288,01	181,01	196,05	226,05	270,12
EPM	288,1594	288,07	118,04	136,03	165,03	270,13
CHL	288,1594	288,08	184,03	199,03	231,08	239,10
LCA	288,1594	288,06	161,05	175,05	203,06	231,10
MAS	300,1230	300,03	191,04	224,10	264,11	282,12
ODU	302,1387	302,04	174,99	223,00	241,04	284,08
DHM	302,1387	302,03	192,99	251,04	284,06	287,07
HMA	302,1387	302,05	181,00	211,00	226,01	270,04
DMG	304,1543	304,06	146,97	194,04	222,03	272,09
THM	304,1543	304,06	110,01	146,96	176,98	286,07
ACA	314,1387	314,03	160,00	196,08	224,07	254,08
HLC	316,1543	316,05	207,04	265,07	298,11	300,13
HIP	316,1180	316,03	181,00	190,98	239,04	298,08
CRI	318,1336	318,06	177,03	179,04	272,13	300,12
HTD	318,1336	318,05	199,03	209,03	268,07	286,10
LCN	318,1700	318,05	191,05	239,14	251,09	300,14
GAL	318,1700	318,06	162,03	193,03	237,08	286,11
ALY	330,1336	330,01	133,97	222,00	252,04	270,06
TZT	332,1493	332,04	181,01	240,03	254,06	314,06
UND	332,1493	332,05	133,95	178,99	272,06	300,05
AMB	332,1493	332,04	210,98	243,04	271,04	282,05
o-ELC	346,2013	346,08	191,02	251,03	282,16	300,05

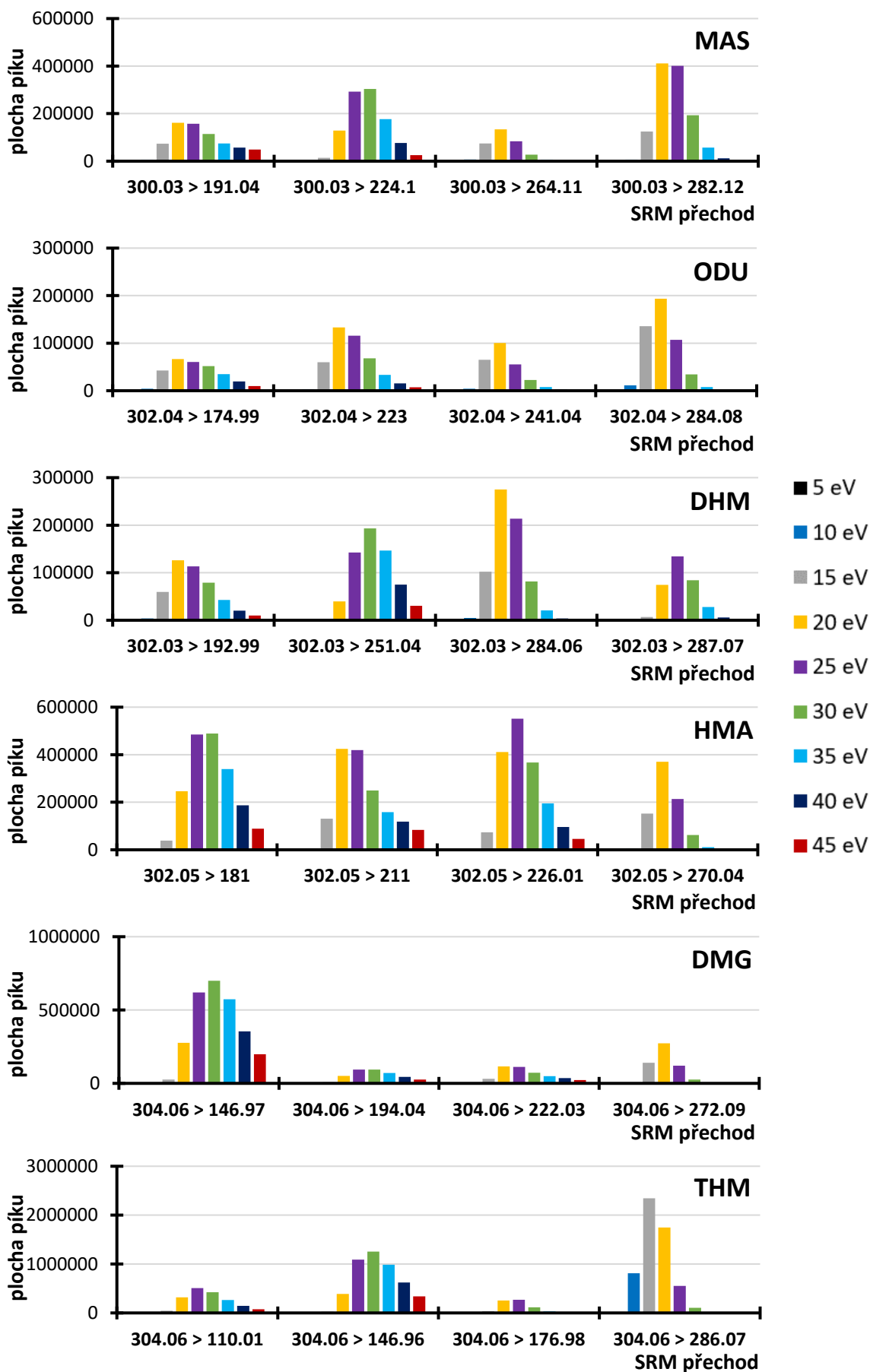
[M+H]⁺ – protonovaná molekula analytu



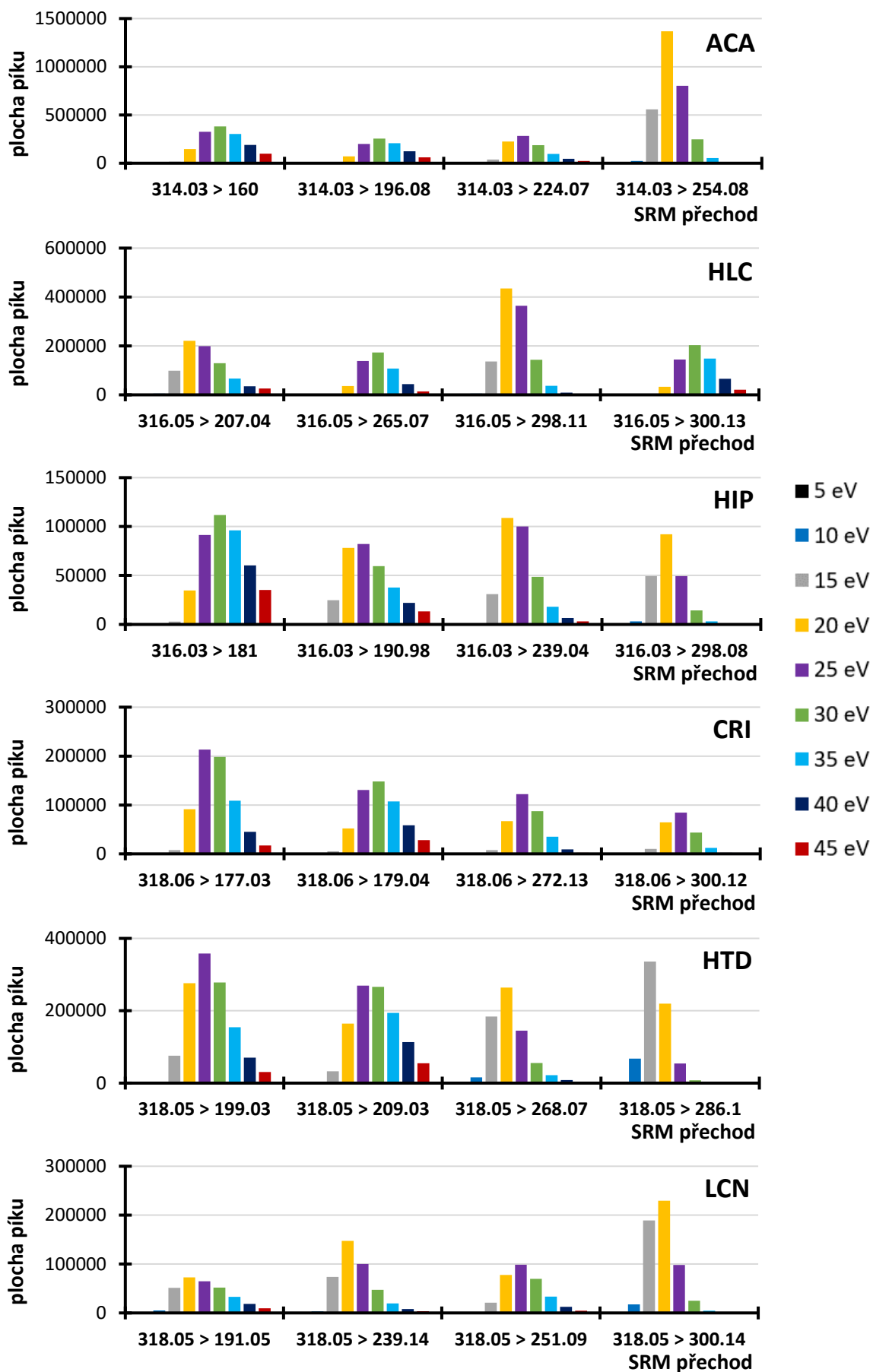
Obr. č. 7: Optimalizace kolizní energie pro standardy VIT, CRN, CAR, IPW, NOR, NRW



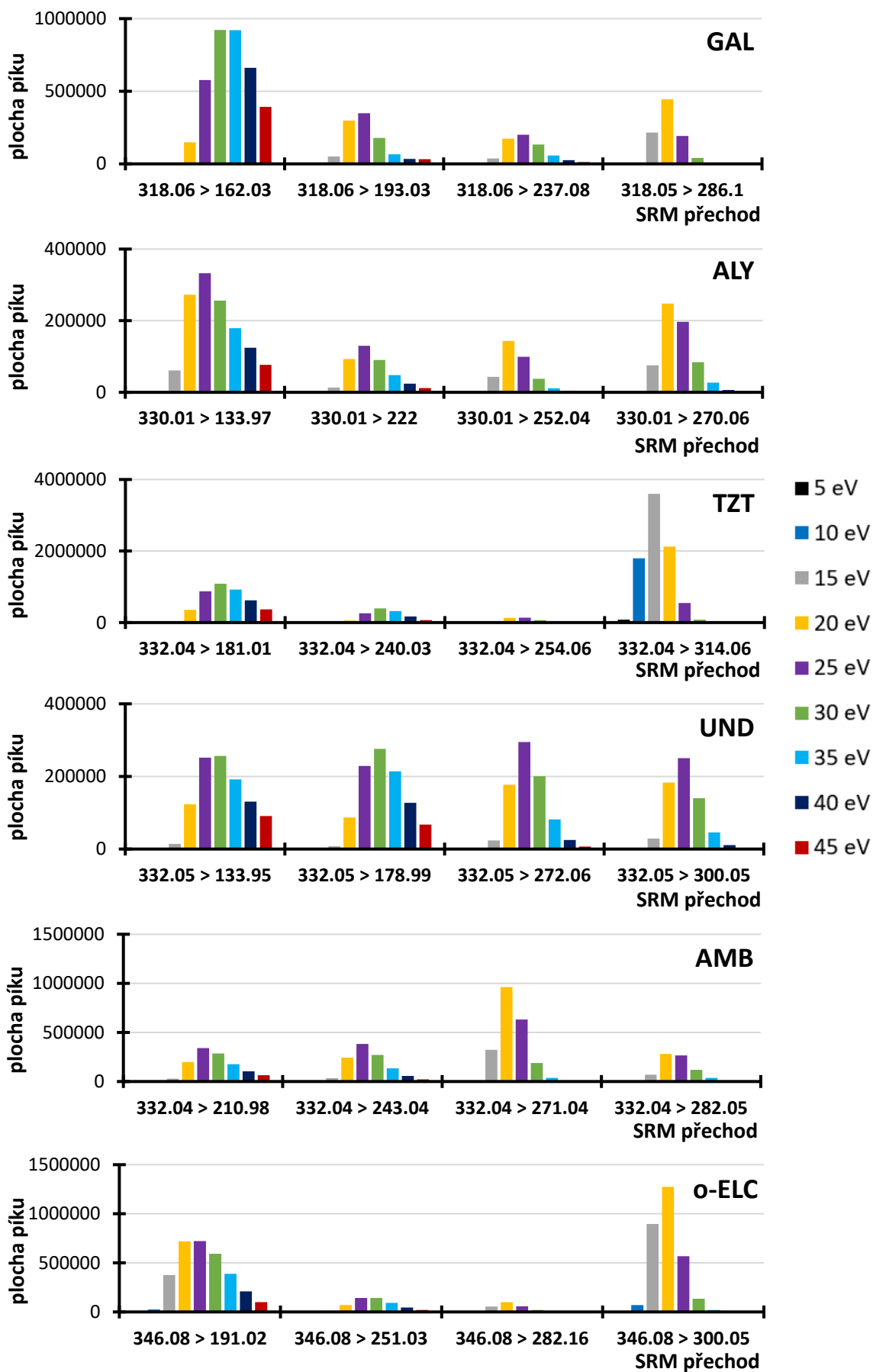
Obr. č. 8: Optimalizace kolizní energie pro standardy LYC, HXV, HMN, EPM, CHL, LCA



Obr. č. 9: Optimalizace kolizní energie pro standardy MAS, ODU, DHM, HMA, DMG, THM



Obr. č. 10: Optimalizace kolizní energie pro standardy ACA, HLC, HIP, CRI, HTD, LCN



Obr. č. 11: Optimalizace kolizní energie pro standardy GAL, ALY, TZT, UND, AMB, o-ELC

5.2.2. Optimalizace nastavení iontového zdroje

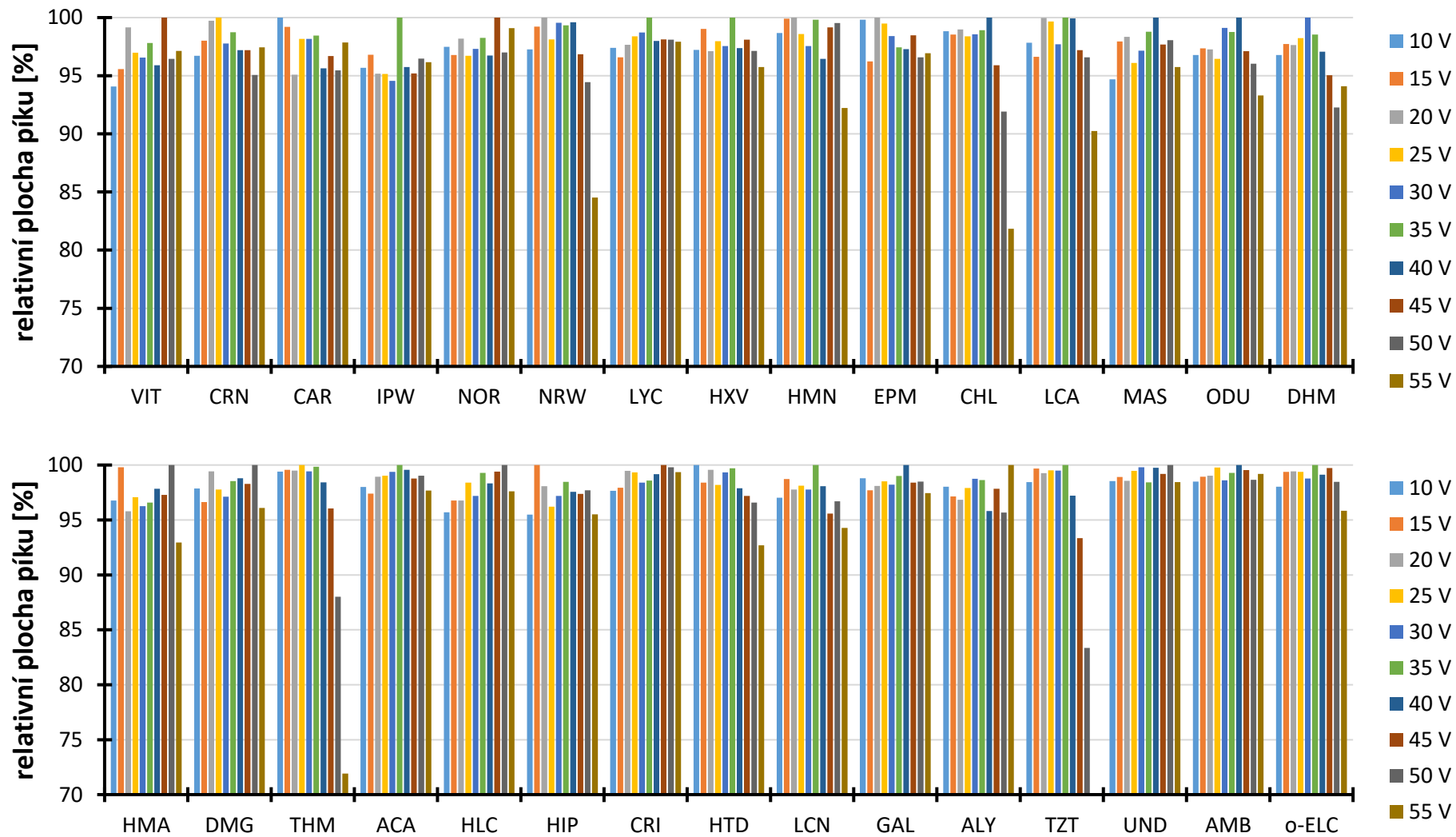
Při zpracování výsledků optimalizace nastavení iontového zdroje s cílem zpřehlednit jejich vyhodnocení byly do grafů zaneseny přepočtené relativní plochy píků. Jako referenční 100 % hodnota pro konkrétní alkaloid se označila vždy taková odezva detektoru, která při dané hodnotě optimalizovaného parametru byla pro tento alkaloid nejvyšší. Ostatní hodnoty ploch tohoto alkaloidu k ní byly vztaženy.

Hodnoty napětí na vstupním kuželu byly testované v rozmezí 10-55 V (Obr. č. 12). V rozmezí hodnot 15-40 V byla relativní odezva detektoru 95-100 % pro všechny analyty. U hodnot napětí vyšších než 35 V byl pozorován pokles odezvy. Proto byla jako optimální hodnota zvolena hodnota 35 V.

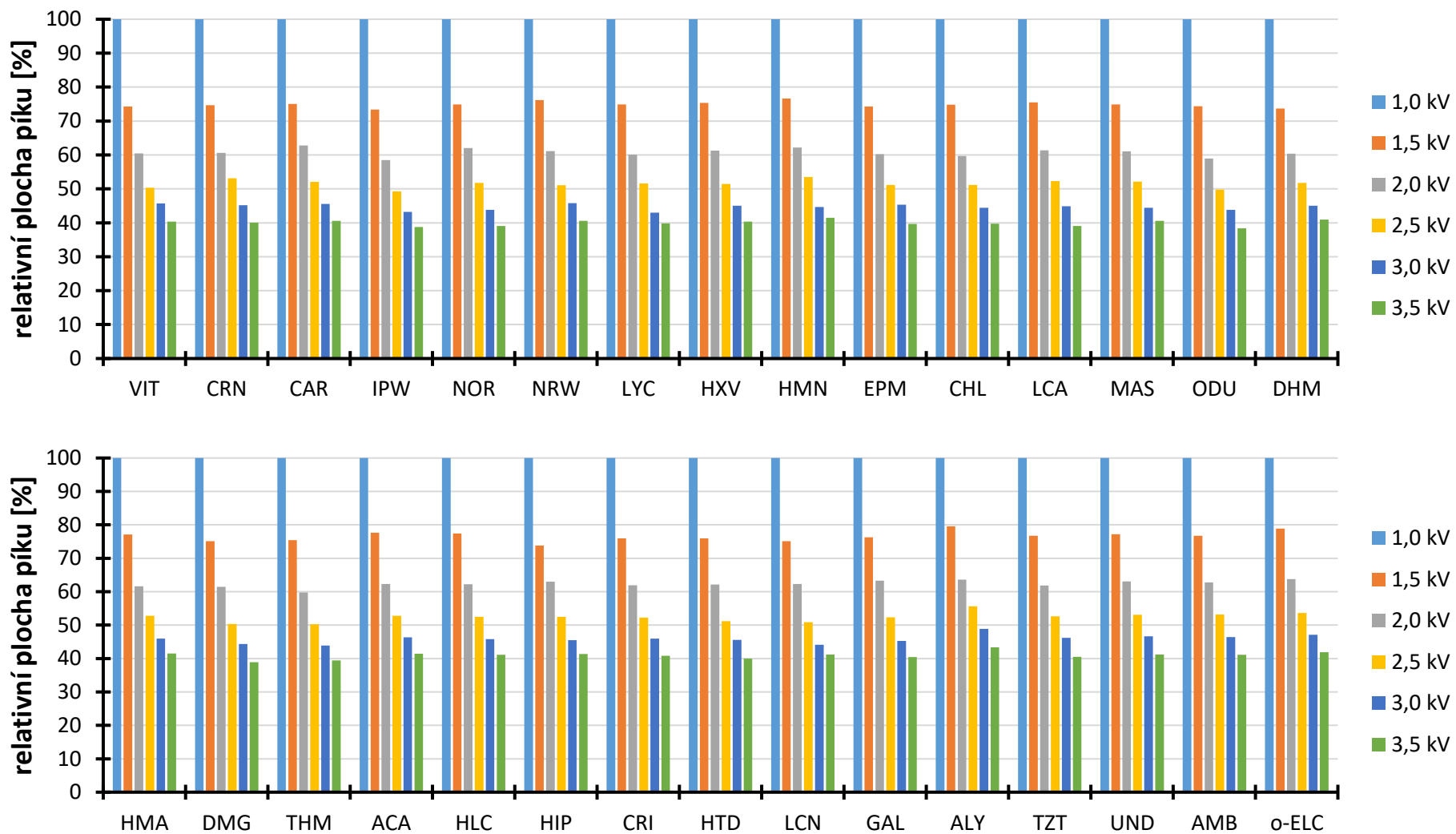
V testovaném rozmezí 1,0-3,5 kV pro napětí na kapiláře byla nejvyšší odezva detektoru dosažena s nejnižší hodnotou tohoto napětí. Z Obr. č. 13 je patrné, že se zvyšujícím se napětím na kapiláře se odpověď detektoru zmenšovala. Ve finální metodě proto byla použita hodnota 1,0 kV.

Při optimalizaci desolvatační teploty (Obr. č. 14) byl zaznamenán nárůst MS odezvy se vzrůstající teplotou testovanou v rozmezí 300-600 °C. Maximální odezva detektoru byla pozorována při 600 °C. Stejný trend byl také zjištěn při optimalizaci průtoku desolvatačního plynu (Obr. č. 15), kdy největší odezva detektoru byla dosažena při nejvyšší testované hodnotě průtoku 1200 l/h.

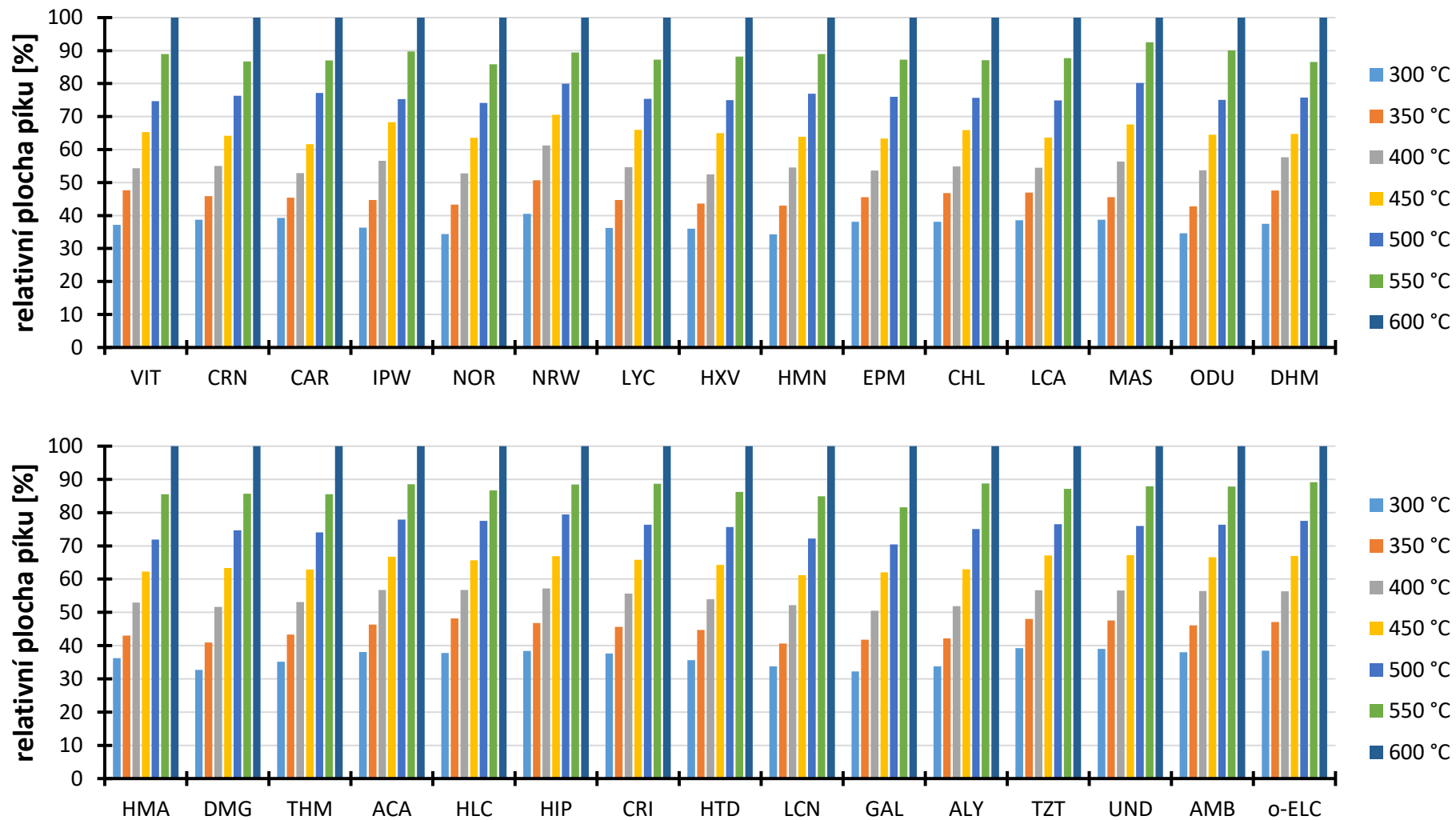
Při optimalizaci průtoku plynu na vstupním kuželu (Obr. č. 16) byla nejvyšší MS odezva pozorována při průtoku 250 nebo 300 l/h. Relativní plochy píků všech analytů byly sledovány v rozmezí 95-100 % při nastavení jednoho nebo druhého průtoku. Proto byla pro finální metodu vybrána hodnota 250 l/h.



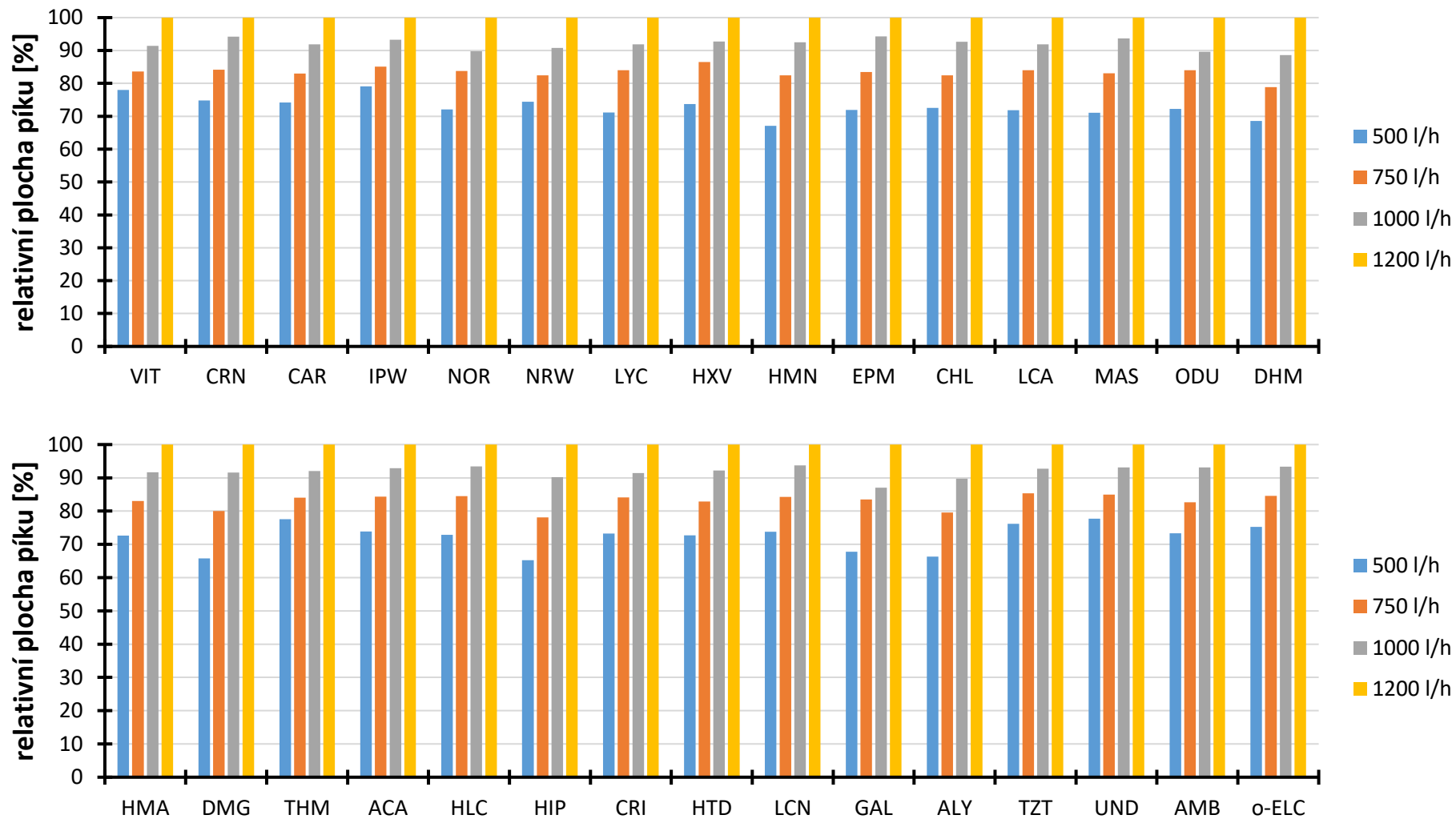
Obr. č. 12: Výsledky optimalizace napětí na vstupním kuželu



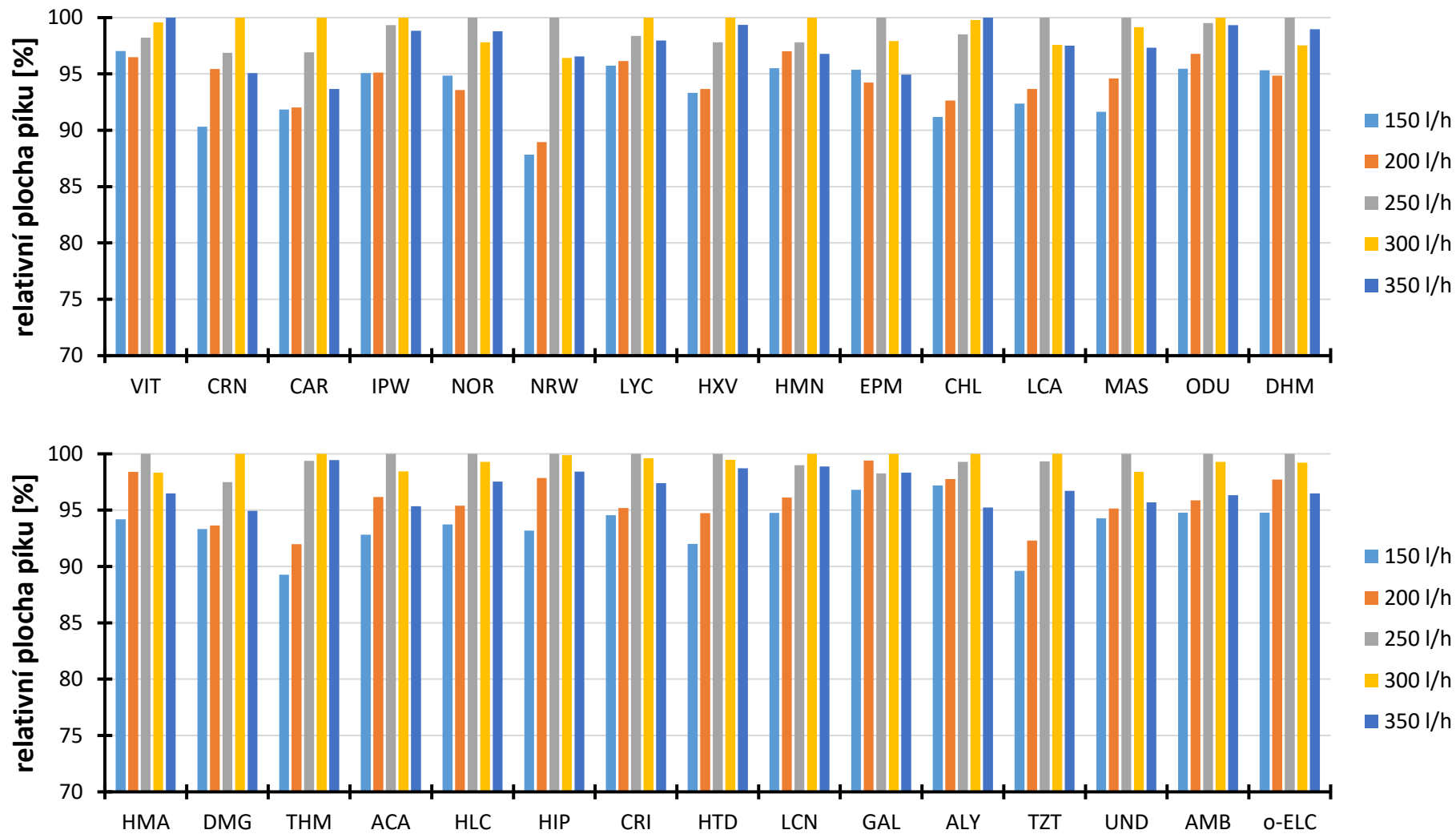
Obr. č. 13: Výsledky optimalizace napětí na kapiláře



Obr. č. 14: Výsledky optimalizace desolvatační teploty



Obr. č. 15: Výsledky optimalizace průtoku desolvatačního plynu



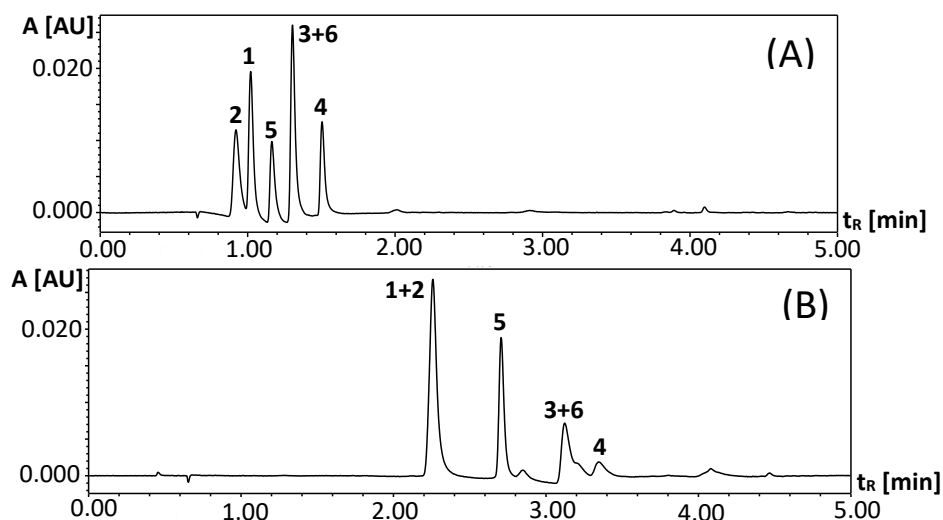
Obr. č. 16: Výsledky optimalizace průtoku plynu na vstupním kuželu

5.3. Optimalizace chromatografické separace

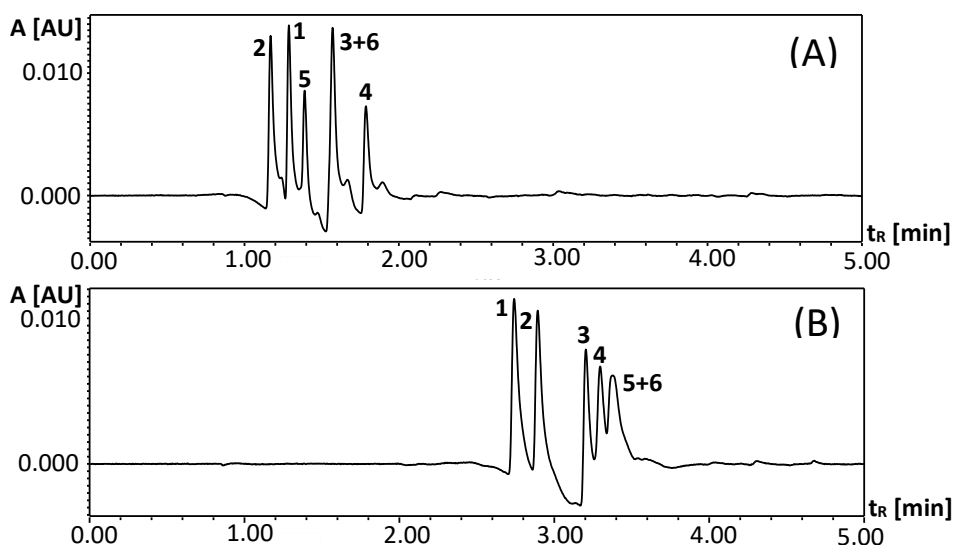
5.3.1. Výběr stacionární fáze

Cílem testování bylo vybrat SF s co nejlepší selektivitou a rozlišením separace izomerních analytů. Celkem bylo testováno 10 kolon (Tab. č. 3), které se lišily navázaným ligandem. Jednalo se o kolony vyrobené ze silikagelu nebo hybridního materiálu (BEH, CSH). Pro tyto rozdíly kolony poskytovaly různé interakce s analyzovanými látkami.

Klíčovými parametry pro výběr kolony byla symetrie píku, w_{50} a rozlišení analytů v jednotlivých izomerních skupinách. Tyto parametry byly vyhodnoceny pouze pro 8 kolon, a to Acquity UPLC BEH C18, Acquity UPLC CSH C18, Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl, Acquity UPLC BEH Shield RP18, ACE Excel C18-PFP, Kinetex PFP a Kinetex F5. Kolony Ascentis Express RP-Amide a Arion Plus C18 nebyly v rámci screeningu hodnoceny na základě pozorovaných nesymetrických a chvostujících píků. Na těchto kolonách navíc za žádných podmínek screeningu nebyla selektivita separace taková, jako byla pozorována u kolon, které se dále vyhodnocovaly. Tato tvrzení demonstruje Obr. č. 17 znázorňující separaci skupiny s Mw 287 na koloně Ascentis Express RP-Amide a Obr. č. 18 znázorňující separaci této skupiny na koloně Arion Plus C18.



Obr. č. 17: Chromatogram skupiny s Mw **287** (1 – HXV, 2 – LYC, 3 – HMN, 4 – EPM, 5 – CHL, 6 – LCA) na koloně Ascentis Express RP-Amide za použití MeOH / AmF pH 3 (A) a MeOH / AmF pH 9 (B). Použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut, teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: UV 290 nm.



Obr. č. 18: Chromatogram skupiny s Mw 287 (1 – HXV, 2 – LYC, 3 – HMN, 4 – EPM, 5 – CHL, 6 – LCA) na koloně Arion Plus C18 za použití MeOH / AmF pH 3 (A) a MeOH / AmF pH 9 (B). Použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut, teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: UV 290 nm

V následujícím textu bude popsána metodika vyhodnocení screeningu. Pro hodnocení symetrie píku byla jako nejlepší a zároveň referenční hodnota zvolena hodnota 1 (100 %). Pro každý pík analytu byla spočítána symetrie píku za daných separačních podmínek. Symetrie pro jednotlivé píky byly následně zprůměrovány a tato hodnota byla porovnána s referenční hodnotou. Výsledek procentuálně vyjadřoval, jak se průměr symetrií píků analytů za daných podmínek blíží referenční hodnotě.

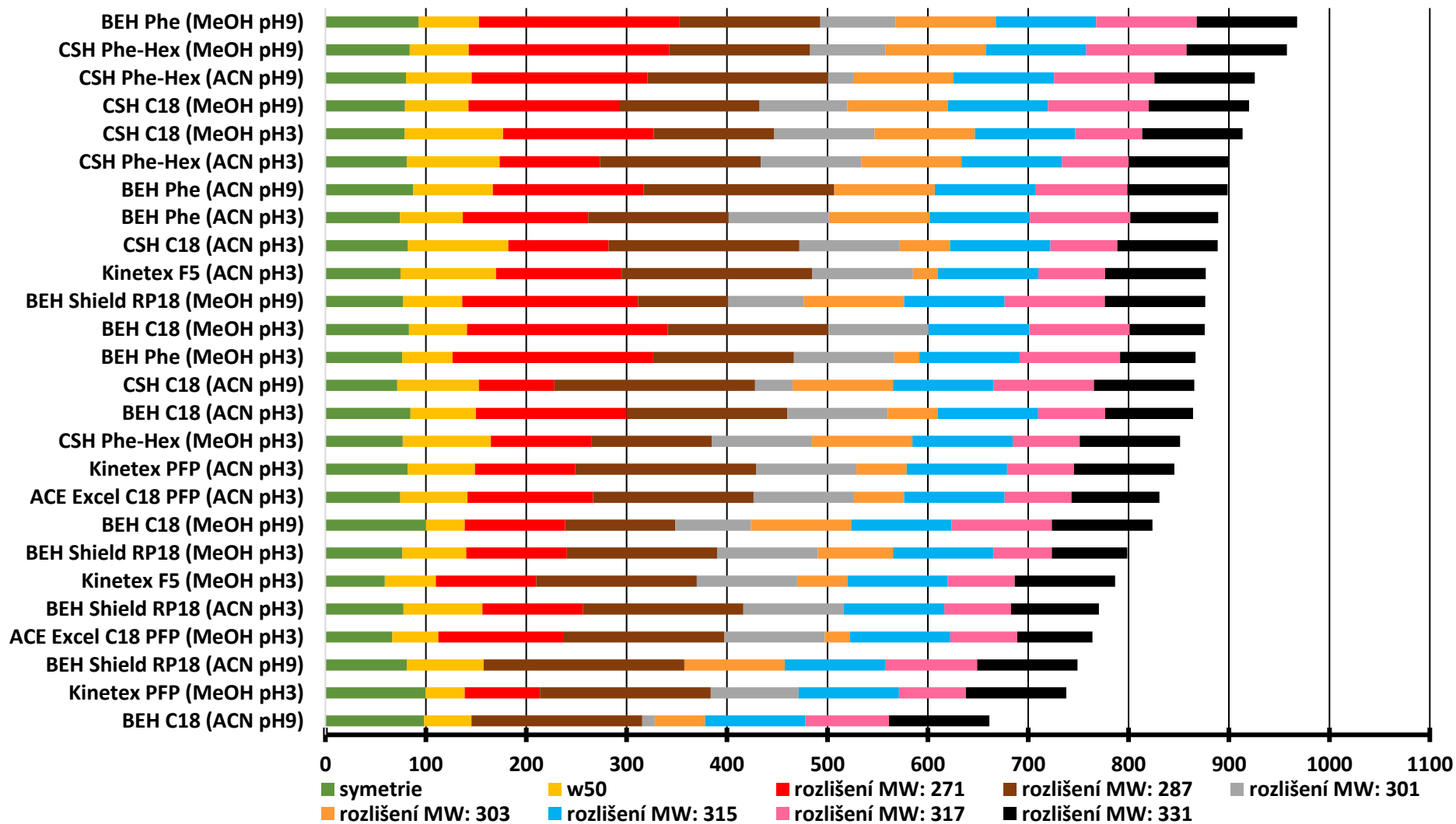
U w_{50} byla jako optimální hodnota zvolena nejnižší hodnota (100 %) dosažená v souboru získaných dat, tj. všech píků za daných podmínek separace. Hodnota w_{50} byla vypočítána pro jednotlivé píky všech analytů. Získaná hodnota byla následně zprůměrována a hodnota byla porovnána s referenční hodnotou. Výsledek procentuálně vyjadřoval, jak se průměr w_{50} analytů blíží zvolené referenční hodnotě.

Rozlišení analytů o stejné molekulové hmotnosti zahrnující izomery bylo pro optimalizaci metody klíčové. Aby bylo možné porovnat výsledky dosažené na jednotlivých kolonách, každému rozlišení píků byly přiřazeny body. Rozlišení < 1 bylo obdrželo 25 bodů, rozlišení v rozmezí 1-1,5 obdrželo 50 bodů, rozlišení v rozmezí 1,5-2 obdrželo 75 bodů a rozlišení s hodnotou > 2 obdrželo 100 bodů. Takto přiřazené body se u každé skupiny izomerů na dané koloně za dané podmínky sečetly. Jako referenční hodnota (100 %) každé skupiny izomerů byl vybrán nejvyšší součet bodů dosažený v souboru získaných dat. Ostatní součty byly vztaženy k referenčnímu součtu. Výsledky

vyjadřovaly procentuální podíl bodů, který daná skupina izomerů dosáhla za daných podmínek na dané koloně ve srovnání se zvolenou referenční hodnotou.

Vyhodnocení screeningu kolon bylo provedeno pomocí grafu zobrazeného na Obr. č. 19. Graf vzájemně porovnává hodnoty symetrie píku, w_{50} a rozlišení analytů v jednotlivých izomerních skupinách získané na testovaných kolonách za použití MeOH nebo ACN jako organické složky MF a AmF o pH 9 nebo pH 3 jako vodné složky MF. Na základě obtížné separace směsí alkaloidů s Mw 271 a Mw 287 byl proto v rámci vyhodnocení kladen důraz právě na tyto dvě skupiny. Pro tyto analyty bylo získané bodové hodnocení v rámci rozlišení násobeno faktorem 2 (Obr. č. 19). Podmínky separace zahrnující typ kolony a MF s nejvyšším hodnocením, tj. kolony poskytovaly nejvyšší selektivitu separace a umožnily nejlepší rozdělení směsi alkaloidů s Mw 271 a Mw 287. Tyto kolony byly Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl a Acquity UPLC CSH C18, a proto další optimalizace podmínek byla provedena právě na nich. Ze získaných bodových hodnocení je také patrné, že vyšší selektivitu separace bylo dosaženo za použití AmF o pH 9 jako vodné složky MF. Kyselé prostředí za použití AmF o pH 3 nebylo vhodné a nebylo dále testováno z důvodu nízké selektivity a nestabilnímu chování některých analytů. Celkově v popředí tabulky byly CSH kolony, což se dalo trochu očekávat, neboť tato úprava je vhodná pro bazické látky, kdy při jejich separaci jsou pozorovány vynikající tvary píků a vysoká účinnost separace.

Pro SF BEH Phenyl byl vhodnější MeOH jako organická složka MF, zatímco pro CSH phenyl-hexyl se jevílo vhodné použít MeOH i ACN. Obě dvě rozpouštědla poskytovala dobrou selektivitu separace. Z tohoto důvodu byl v následujících krocích testován vliv složení organické části MF na separaci, kdy místo MeOH byla použita i směs MeOH:ACN v objemových poměrech 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1.



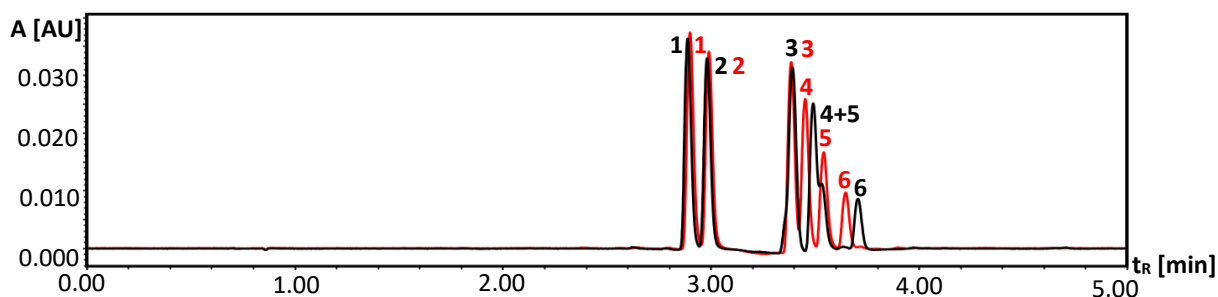
Obr. č. 19: Vyhodnocení screeningu kolon s váhou danou na směs alkaloidů s Mw 271 a Mw 287; maximální dosažitelná hodnota bodů byla 1100

5.3.2. Optimalizace UHPLC metody

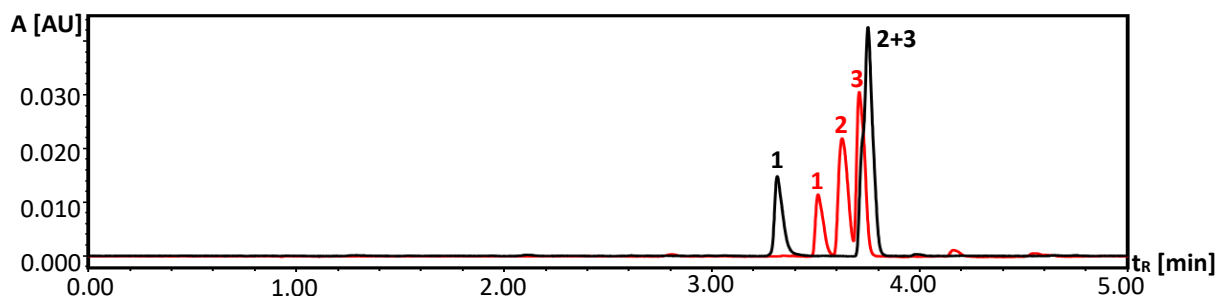
Na třech vybraných kolonách, Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl a Acquity UPLC CSH C18 bylo následně podrobně optimalizováno složení MF, včetně pH pufru, vliv složení organické složky MF, sklon gradientu, doba analýzy a teplota na koloně.

Na základě výsledků selektivity při pH 9 byl testován vliv bazičtějšího pH AmF jako vodné složky MF. Kromě pH 9 zahrnutého do kolonového screeningu byl zkoumán vliv AmF o pH 9,5 a 10,0. Obecně lze říci, že zvyšování pH vedlo ke koeluci píků určitých skupin strukturních izomerů a ke zhoršení selektivity separace.

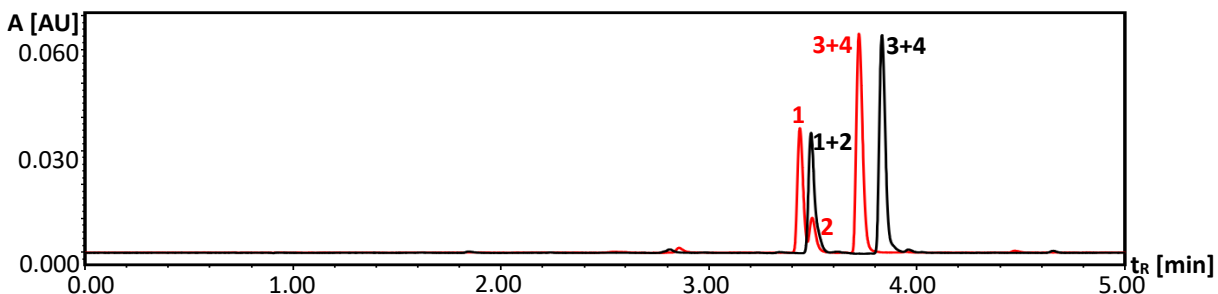
Na koloně Acquity UPLC BEH Phenyl došlo se zvýšením pH ke zhoršení rozlišení u skupiny m/z 287 (Obr. č. 20), kdy alkaloid EPM s pK_a 8,219 byl více v neionizované formě, což vedlo následně ke zvýšení retence na koloně a ke koeluci s alkaloidem CHL. Retenční chování CHL při pH 10 oproti pH 9 se zásadně nezměnilo, neboť pro jeho hodnotu pK_a 10,311 i v pH 10 byl cca z 50 % v neionizované podobě, a jeho interakce se SF byly proto omezené. HXV, LYC a HMN s pK_a 7,208, 7,326 a 7,208 byly zcela nenabitě jak při pH 9, tak při pH 10, proto jejich t_R zůstalo stejné. LCA s pK_a 8,699 při pH 10 oproti pH 9 byl více nenabitý, a tak zůstal na koloně více zadržován, což lze pozorovat posunem jeho t_R . Na koloně Acquity CSH Phenyl-hexyl došlo ke zhoršení rozlišení u skupiny m/z 301 (Obr. č. 21), kdy v pH 9 jsou DHM, ODU, HMA s pK_a 8,826, 8,394, 7,292 separovány v pořadí od látky s nejvyšší hodnotou pK_a po nejnižší. Je to opět dáno jejich poměrem disociované a nedisociované frakce. DHM při pH 10, i přesto, že by měl být nedisociovaný s vyšší retencí na koloně, bylo pozorováno snížení t_R , což může být dáno změnou selektivity SF. U kolony Acquity UPLC CSH C18 těmito způsoby došlo ke zhoršení selektivity skupiny m/z 271 (Obr. č. 22) i skupiny m/z 301 (Obr. č. 23).



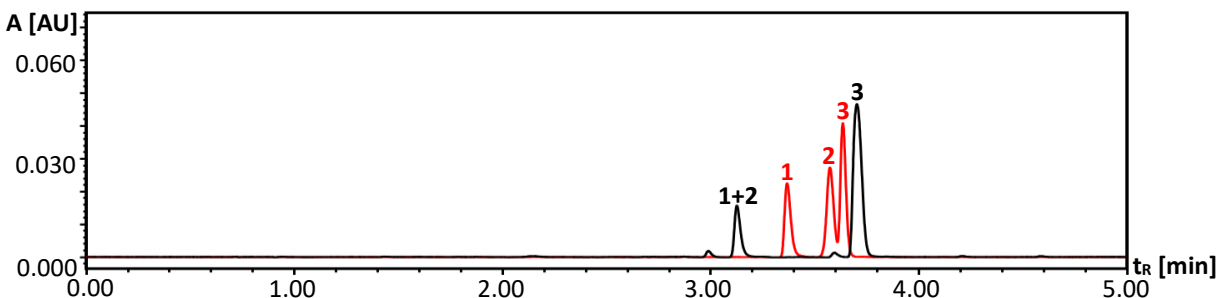
Obr. č. 20: Porovnání chromatogramů skupiny s Mw **287** (1 – HXV, 2 – LYC, 3 – HMN, 4 – EPM, 5 – CHL, 6 – LCA) na koloně Acquity UPLC BEH Phenyl za použití MF MeOH / AmF pH 9 (červeně) a MeOH / AmF pH 10 (černě). Použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut, teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: UV 290 nm.



Obr. č. 21: Porovnání chromatogramů skupiny s Mw **301** (1 – DHM, 2 – ODU, 3 – HMA) na koloně Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl za použití MF MeOH / AmF pH 9 (červeně) a MeOH / AmF pH 10 (černě). Použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut, teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: UV 290 nm.



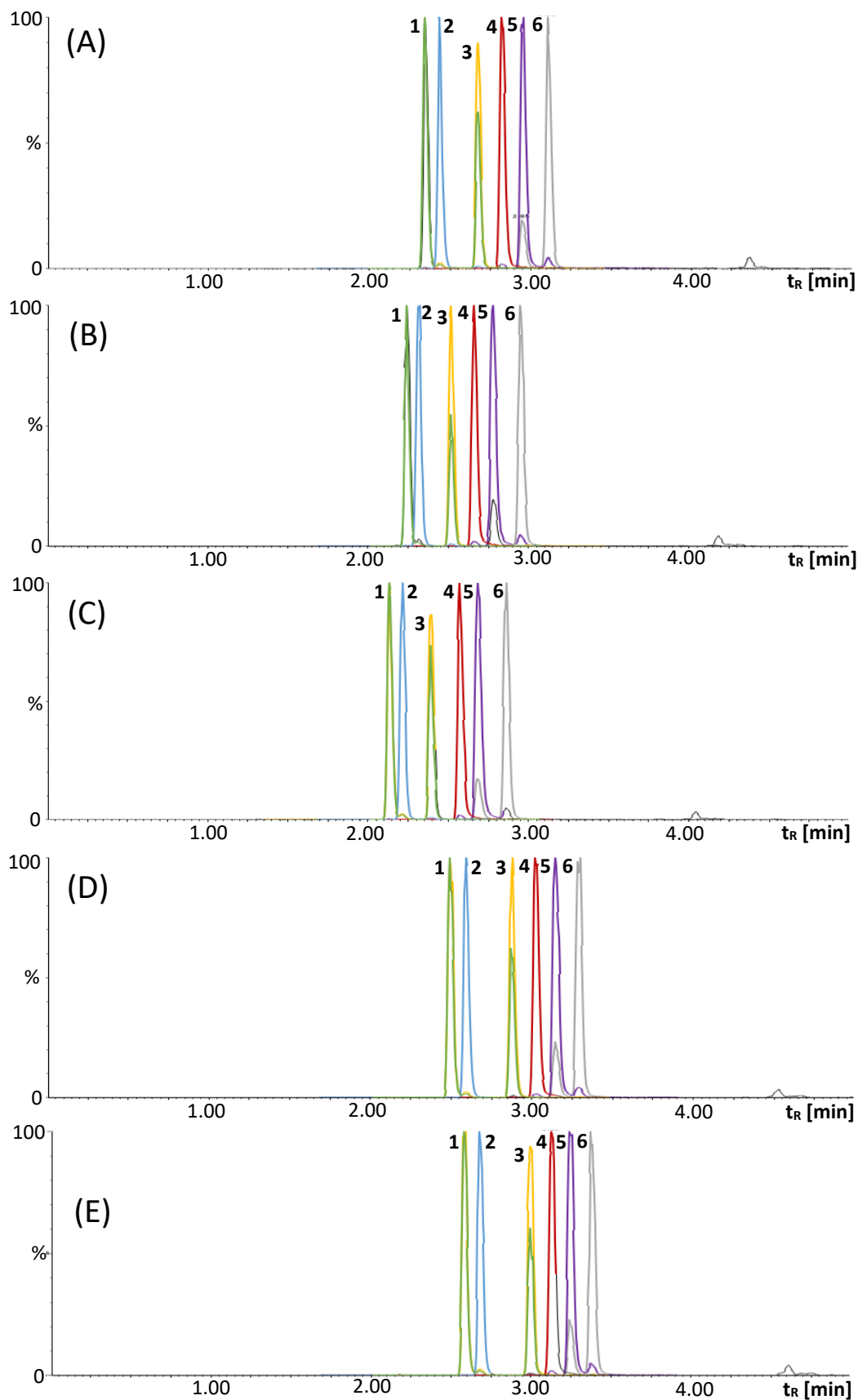
Obr. č. 22: Porovnání chromatogramů skupiny s Mw **271** (1 – CAR, 2 – IPW, 3 – VIT, 4 – CRN) na koloně Acquity UPLC CSH C18 za použití MF MeOH / AmF pH 9 (červeně) a MeOH / AmF pH 10 (černě). Použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut, teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: UV 290 nm.



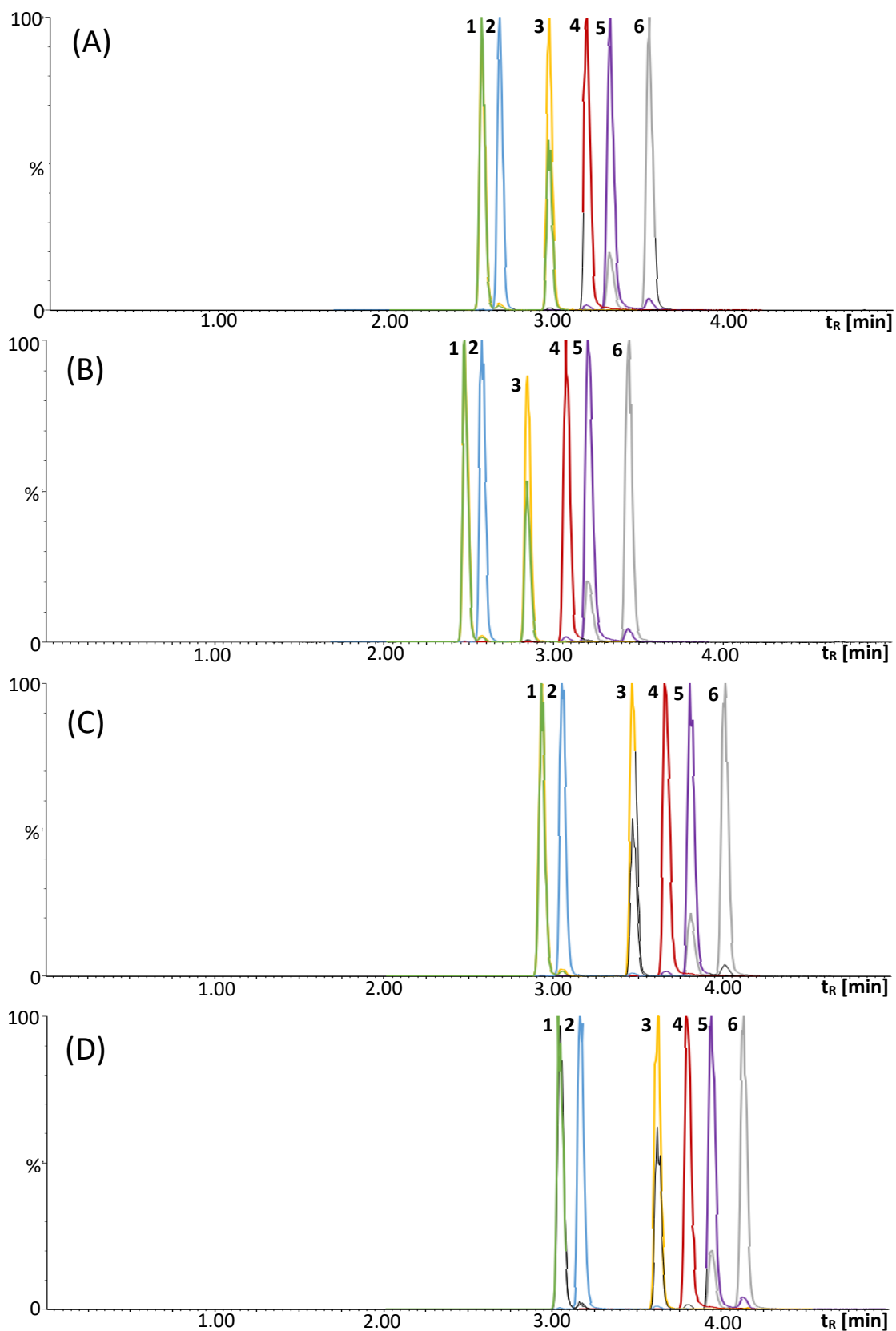
Obr. č. 23: Porovnání chromatogramů skupiny s Mw **301** (1 – DHM, 2 – ODU, 3 – HMA) na koloně Acquity UPLC CSH C18 za použití MF MeOH / AmF pH 9 (červeně) a MeOH / AmF pH 10 (černě). Použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut, teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: UV 290 nm.

Na vybraných kolonách Acquity UPLC BEH Phenyl, Acquity UPLC CSH Phenyl-hexyl a Acquity UPLC CSH C18 byl následně testován vliv složení organické složky MF, kdy byla místo čistého MeOH nebo ACN použita směs MeOH:ACN v objemovém poměru 1:1.

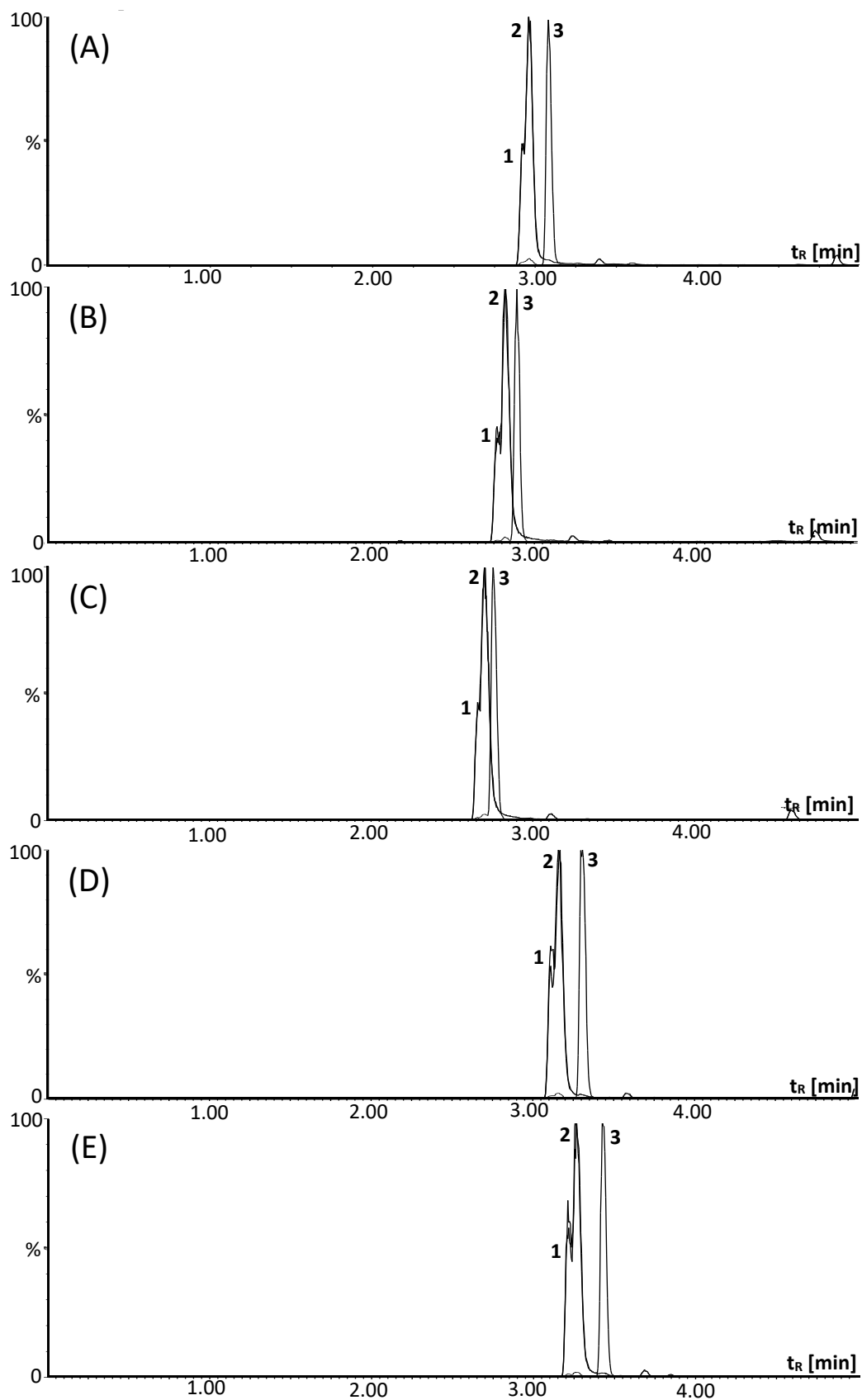
Kromě interakcí založených na vodíkových můstcích mezi volnými silanoly, MeOH a příslušnými funkčními skupinami, se na retenci u fenylových a fluorovaných kolon podílí π - π interakce. Jejich síla může být ovlivněna právě přidavkem ACN, který zvýšenou hustotu elektronů SF naruší, a může tak změnit retenční chování látek. Proto na koloně Acquity UPLC BEH Phenyl (zástupce fenylových kolon) a koloně ACE Excel C18-PFP (zástupce fluorovaných kolon) byly dále vyzkoušeny i objemové poměry MeOH:ACN 1:2, 2:1, 1:3, 3:1. Použitý gradient byl 2-98 %, s časem gradientu 5 a 7 minut. Prodloužení gradientu zvýšilo dobu pro interakci alkaloidů se SF, což mělo vést ke zvýšení separační účinnosti. Na koloně ACE Excel C18-PFP byla použita MF MeOH:ACN 1:2, 2:1, 1:3, 3:1 / AmF pH 3 – výsledky separace nebyly lepší než separace na koloně Acquity UPLC BEH Phenyl jak pro nízký vliv této změny na separaci, tak pro použití kyselého pH z důvodu stability kolony. Kyselé prostředí pH 3 nebylo vhodné kvůli nízké selektivitě a nestabilnímu chování některých alkaloidů. V práci jsou uvedeny výsledky pouze z kolony Acquity UPLC BEH Phenyl. U skupiny m/z 287 došlo se všemi přidavky ACN ke zlepšení rozlišení v pěti (Obr. č. 24) i sedmiminutové analýze (Obr. č. 25), a to především pro látky LYC, HMN a EPM. Opačný efekt byl však pozorován u skupiny m/z 301, u něhož nedošlo za žádných podmínek k separaci DHM a ODU, které byly částečně separovány při gradientu trvajícím 5 min (Obr. č. 26), ale s prodloužením doby gradientu na 7 minut zcela koeluovaly (Obr. č. 27). Rozlišení ostatních izomerních skupin (m/z 271, m/z 303, m/z 315, m/z 317, m/z 331) se zásadně neměnilo, selektivita separace těchto skupin byla při všech poměrech vyhovující. Proto byla dále pro další testování podmínek jako nejvhodnější vybrána směs MeOH:ACN o objemovém poměru 3:1, neboť pozitivní efekt na rozlišení separace skupiny m/z 287 daný přidavkem ACN byl významný a pro tento poměr ve skupině m/z 301 byl alkaloid HMA dostatečně rozlišen od píků ODU a DHM.



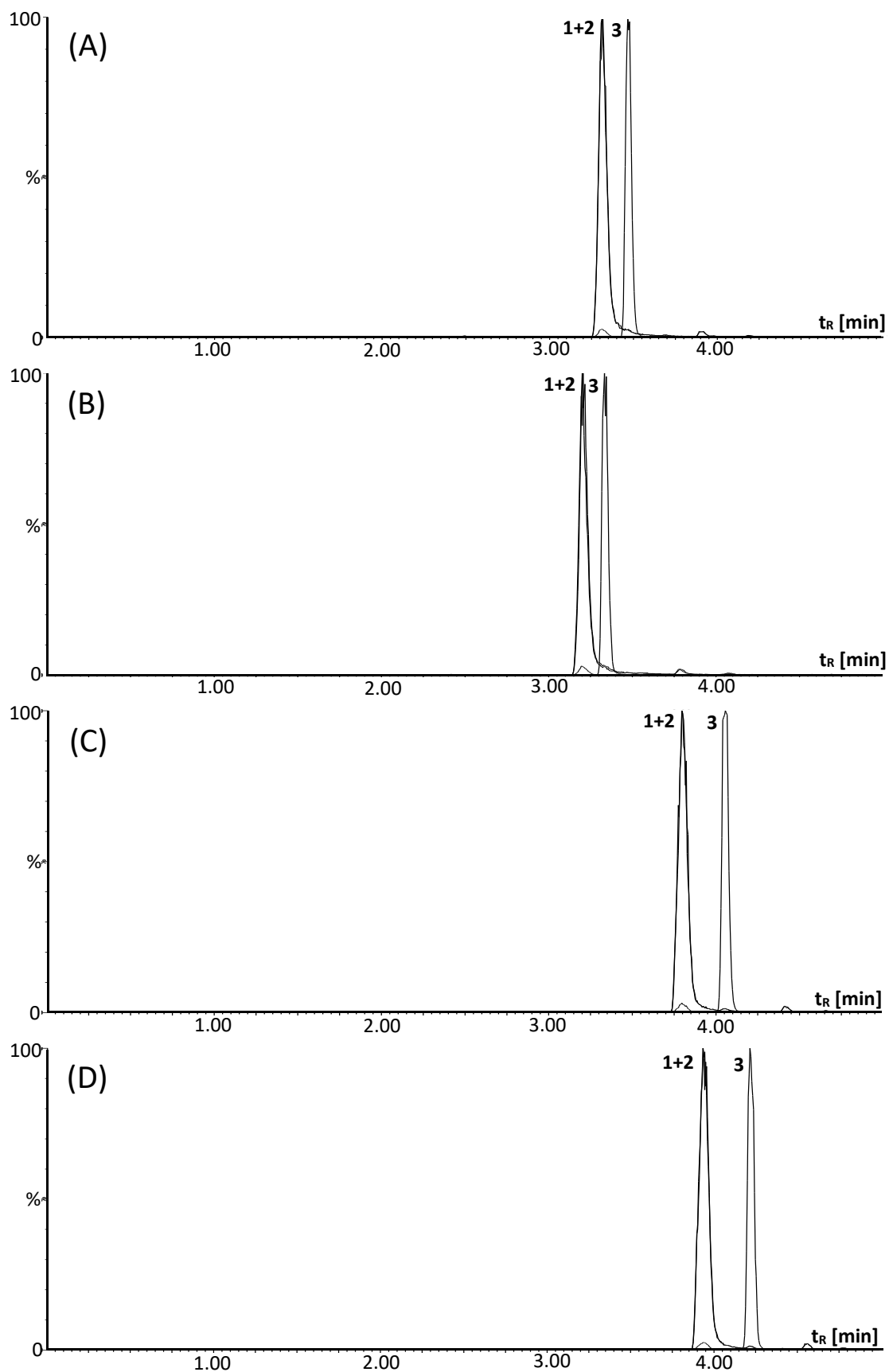
Obr. č. 24: Chromatogramy skupiny m/z 287 (1 – HXV, 2 – LYC, 3 – HMN, 4 – EPM, 5 – CHL, 6 – LCA) znázorňující vliv organického modifikátoru MF MeOH:ACN: 1:1 (A), 1:2 (B), 1:3 (C), 2:1 (D), 3:1 (E). Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl, použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut, teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: MS/MS.



Obr. č. 25: Chromatogramy skupiny m/z 287 (1 – HXV, 2 – LYC, 3 – HMN, 4 – EPM, 5 – CHL, 6 – LCA) znázorňující vliv organického modifikátoru MF MeOH:ACN za prodloužení doby gradientu na 7min: 1:2 (A), 1:3 (B), 2:1 (C), 3:1 (D). Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl, použitý gradient: 2-98 za 7 minut, teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: MS/MS.

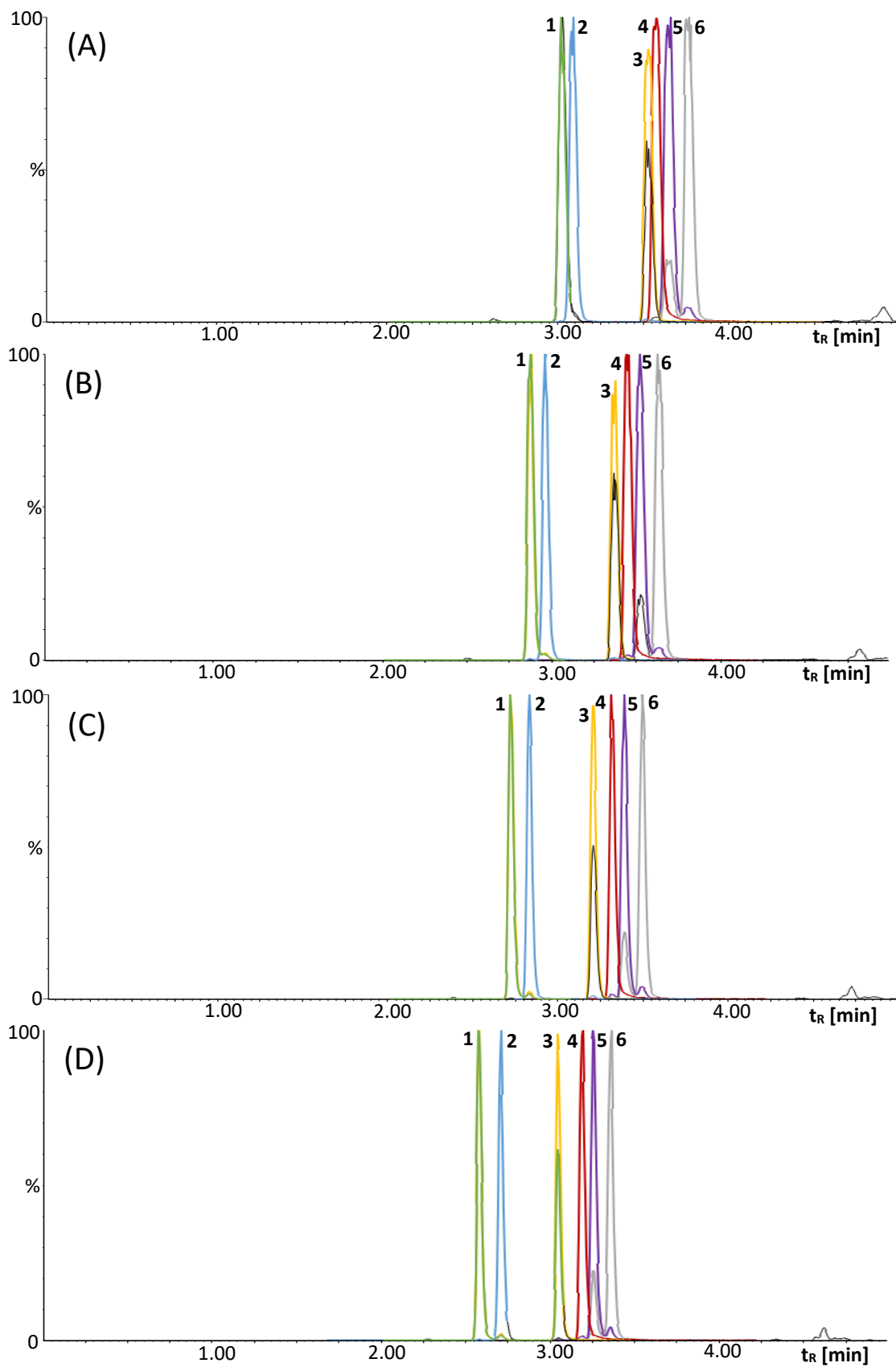


Obr. č. 26: Chromatogramy skupiny m/z 301 (1 – DHM, 2 – ODU, 3 – HMA) znázorňující vliv organického modifikátoru MF MeOH:ACN: 1:1 (A), 1:2 (B), 1:3 (C), 2:1 (D), 3:1 (E). Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl, použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut, teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: MS/MS.

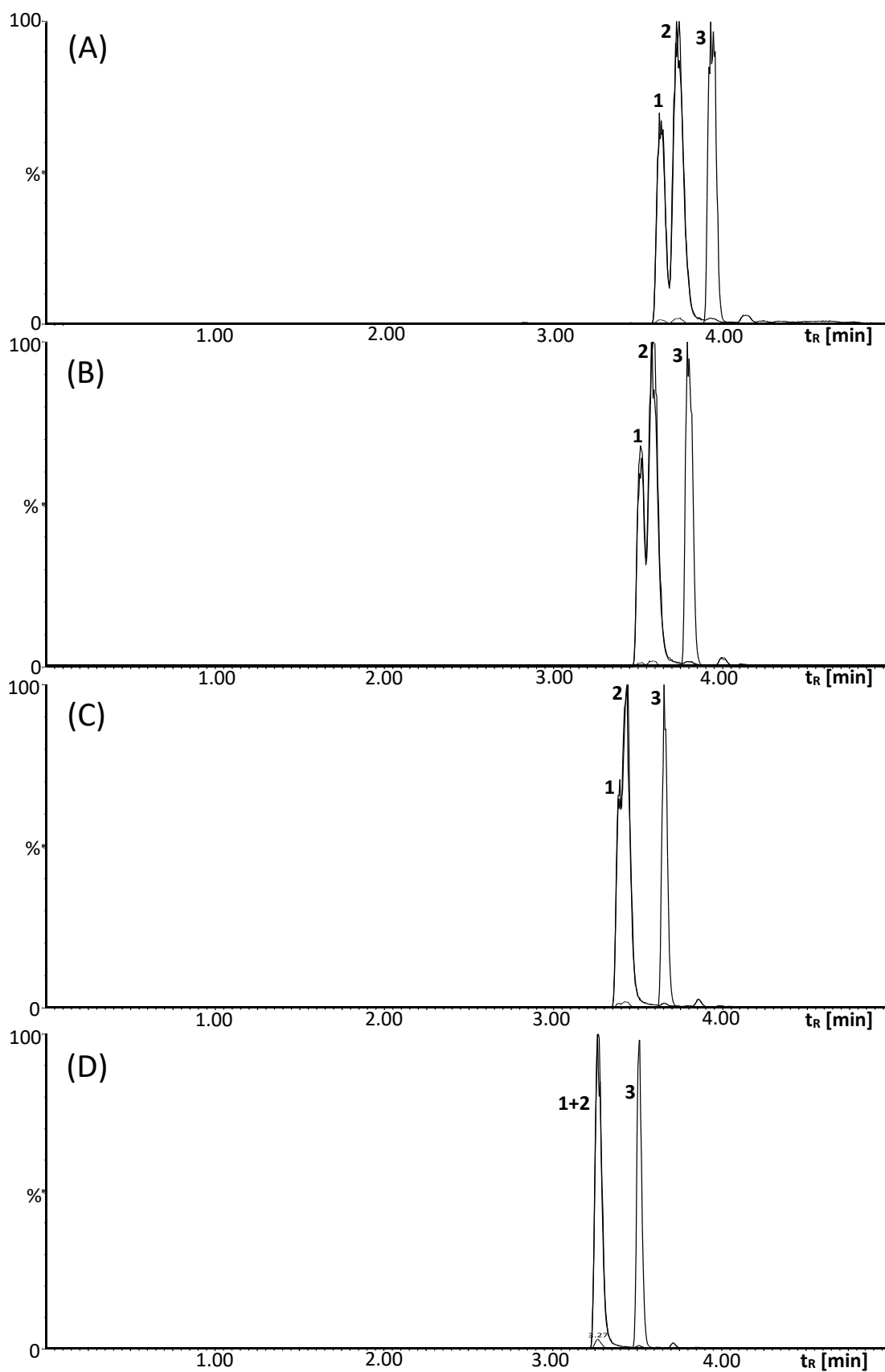


Obr. č. 27: Chromatogramy skupiny m/z 301 (1 – DHM, 2 – ODU, 3 – HMA) znázorňující vliv organického modifikátoru MF MeOH:ACN: s prodloužením doby analýzy na 7min 1:2 (A), 1:3 (B), 2:1 (C), 3:1 (D). Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl, použitý gradient: 2-98 %B za 7 minut, teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: MS/MS.

Při optimalizaci teploty na koloně byly testovány teploty 30, 40, 50 a 60 °C. Na základě předchozích výsledků byl tento experiment proveden pouze na koloně Acquity UPLC BEH Phenyl. Vliv teploty na separaci byl pozorován opět u skupiny m/z 287 (Obr. č. 28) a m/z 301 (Obr. č. 29). U skupiny m/z 287 došlo se zvyšující se teplotou ke zlepšení rozlišení alkaloidů HXV a LYC a HMN a EPM. Nicméně, u skupiny m/z 301 byl efekt teploty opačný. Zvyšující se teplota na koloně vedla ke sníženému rozlišení DHM a ODU, které při teplotě 60 °C zcela koeluovaly. Se zvyšující se teplotou bylo obecně u všech izomerních skupin pozorováno zužování píků, což může mít pozitivní dopad na citlivost metody.



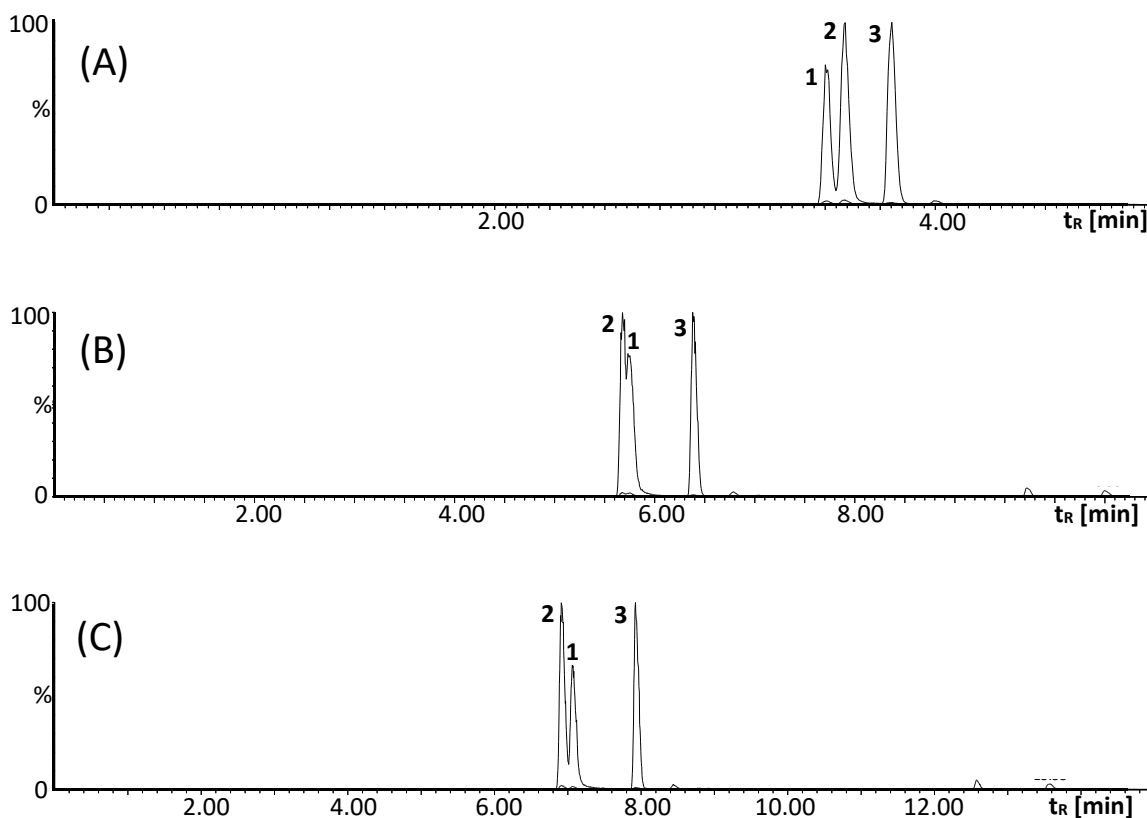
Obr. č. 28: Chromatogramy skupiny m/z 287 (1 – HXV, 2 – LYC, 3 – HMN, 4 – EPM, 5 – CHL, 6 – LCA) znázorňující vliv změny teploty na koloně: 30 °C (A), 40 °C (B), 50 °C (C), 60 °C (D). Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl, použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut, průtok: 0,4 ml/min, detekce: MS/MS.



Obr. č. 29: Chromatogramy skupiny m/z 301 (1 – DHM, 2 – ODU, 3 – HMA) znázorňující vliv změny teploty na koloně: 30 °C (A), 40 °C (B), 50 °C (C), 60 °C (D). Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl, použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut, průtok: 0,4 ml/min, detekce: MS/MS.

V dalším kroku bylo testováno počáteční a konečné složení MF gradientové eluce ovlivňující sklon gradientu. 6, 10, 14 % organické složky MF v počátku, ani změna konečného složení s 94, 90, 86 % organické složky MF neměly významný vliv na separaci. Byl pozorován pouze posun t_R .

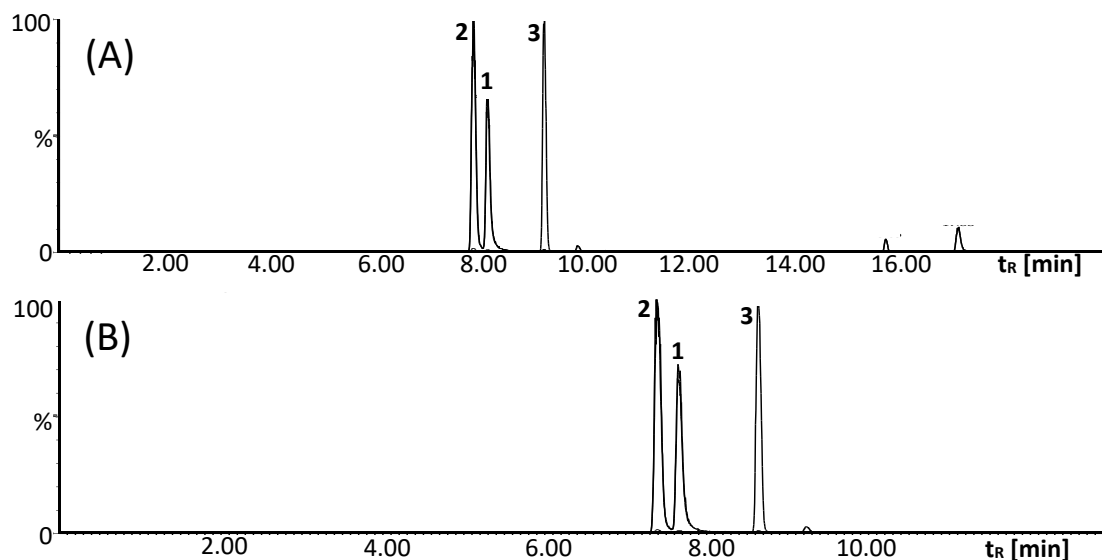
Prodloužení času gradientu z původních 5 minut na 7, 9, 11, 13 a 15 minut se projevilo zvýšením t_R pro většinu analytů, selektivita a rozlišení se zásadně neměnila. Pro skupinu m/z 301 (Obr. č. 30) došlo prodloužením gradientu k záměně pořadí analytů z DHM-ODU-HMA na ODU-DHM-HMA. Toto zjištění pro optimalizaci gradientu vyvinuté metody bylo klíčové.



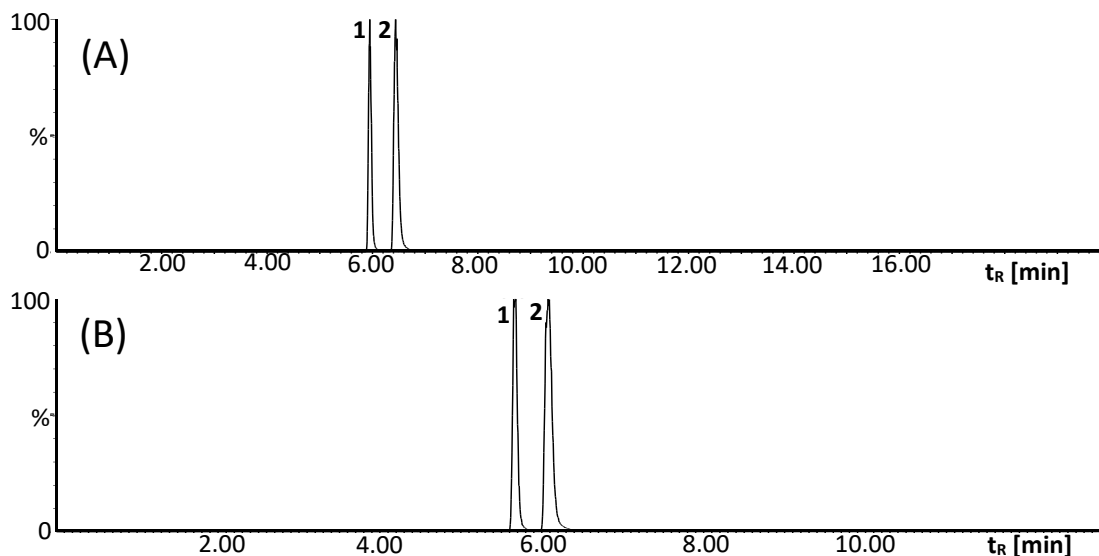
Obr. č. 30: Chromatogramy analytů skupiny m/z 301 (1 – DHM, 2 – ODU, 3 – HMA). Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl, použitý gradient: 2-98 %B za 5 minut (A), za 11 minut (B), za 15 minut (C), teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: MS/MS.

V posledním kroku optimalizace došlo ke zkombinování všech optimalizovaných podmínek. Byla použita kolona Acquity UPLC BEH Phenyl, MF byla tvořena směsí MeOH:ACN v poměru 3:1 a vodnou složkou s obsahem AmF o pH 9, teplota na koloně byla nastavena na 50 °C. Následně došlo k dalšímu ověření vlivu doby separace, kdy byl prodlužován čas analýzy na 10, 15, 20, 25 minut. Zde byla optimální selektivita separace

dosažena při 20minutové analýze. Protože analyty byly vymývány z kolony do 12 minut, byl gradient upraven tak, aby všechny látky eluovaly po celou dobu trvání gradientové eluce. Zkrácením doby gradientu z 20 minut na 13 a snížením konečného procenta organické složky gradientu na 70 % bylo dosaženo srovnatelných výsledků separace včetně rozlišení látek (Obr. č. 31, Obr. č. 32).



Obr. č. 31: Chromatogramy skupiny m/z 301 (1 – DHM, 2 – ODU, 3 – HMA) znázorňující srovnatelné výsledky separace za doby gradientu 20 min (A) a 13 min (B). Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl, použitý gradient: 2-98 %B za 20 minut (A) resp. 2-70 %B za 13 minut (B), teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: MS/MS.



Obr. č. 32: Chromatogramy skupiny m/z 303 (1 – THM, 2 – DMG) znázorňující srovnatelné výsledky separace za doby analýzy 22 min (A) a 15 min (B). Kolona: Acquity UPLC BEH Phenyl, použitý gradient: 2-98 %B za 20 minut (A) resp. 2-70 %B za 13 minut (B), teplota na koloně: 40 °C, průtok: 0,4 ml/min, detekce: MS/MS.

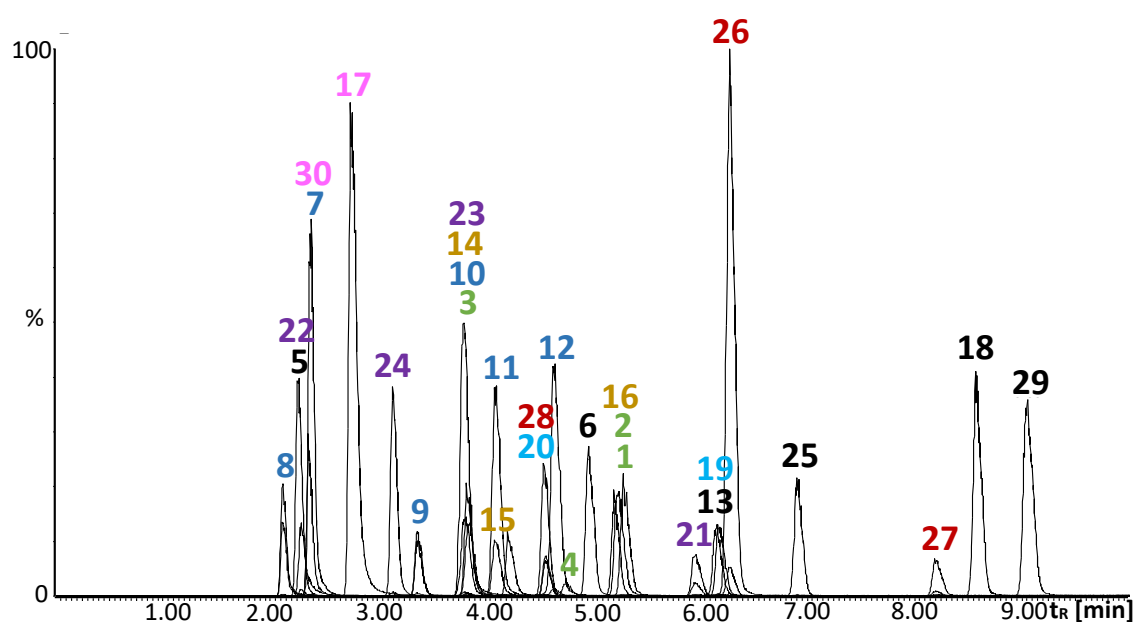
Při zkrácení doby analýzy na 15 minut ale bylo zjištěno, že o-ELC nebyl vymyt z kolony před koncem analýzy. Pro vyřešení tohoto problému byla nutná další úprava sklonu gradientu. Poslední experimenty vedly k finální optimalizaci gradientu a doby analýzy, jak je shrnuto v Tab. č. 10.

5.4. Výsledky separace za optimálních podmínek

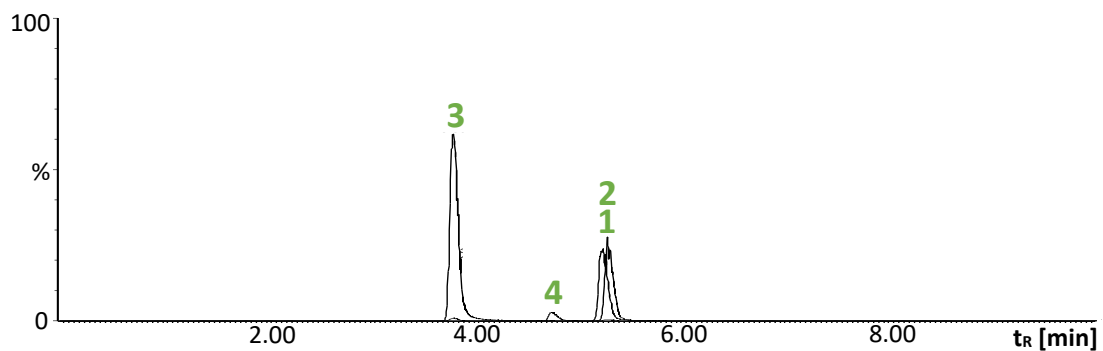
Optimalizovaná metoda, jejíž podmínky jsou shrnuté v kapitole 4.8, umožnila kompletní separaci 6 skupin strukturálních izomerů a neizomerních analytů z vybraných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Pouze ve skupině m/z 271 se nepodařilo rozdělit dva optické izomery VIT a CRN. Pro jejich separaci by bylo nutné použít chirální separaci s chirálním činidlem nebo chirální SF, případně by byla nutná derivatizace látek. Finální separace všech skupin analytů jsou znázorněny na Obr. č. 33-Obr. č. 41. Tab. č. 15 shrnuje retenční časy analytů spolu s barevným označením jednotlivých izomerních skupin.

Tab. č. 15: Retenční časy analytů spolu s barevným označením jednotlivých izomerních skupin

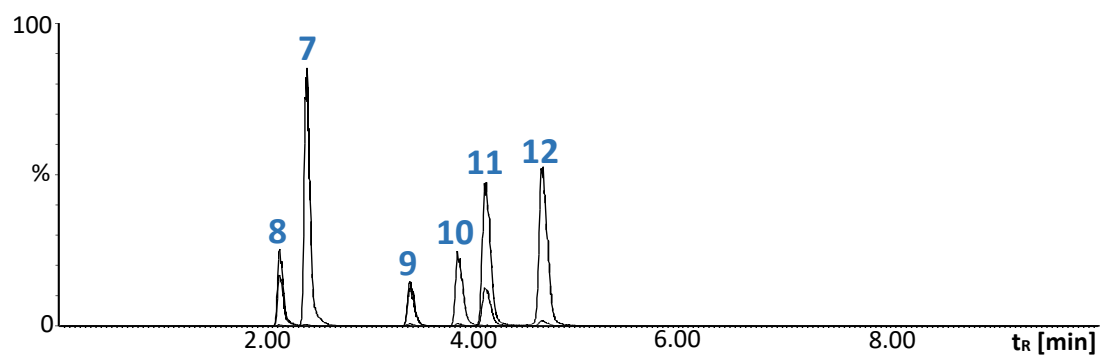
číslo	t_R [min]	zkratka alkaloidu	číslo	t_R [min]	zkratka alkaloidu
1	5,25	VIT	16	5,20	HMA
2	5,29	CRN	17	2,75	THM
3	3,80	CAR	18	8,57	ACA
4	4,75	IPW	19	6,19	HLC
5	2,26	NOR	20	4,57	HIP
6	4,96	NRW	21	5,97	CRI
7	2,38	LYC	22	2,28	HTD
8	2,12	HXV	23	3,82	LCN
9	3,37	HMN	24	3,14	GAL
10	3,82	EPM	25	6,90	ALY
11	4,10	CHL	26	6,28	TZT
12	4,66	LCA	27	8,19	UND
13	6,16	MAS	28	4,54	AMB
14	3,86	ODU	29	9,06	o-ELC
15	4,21	DHM	30	2,35	DMG



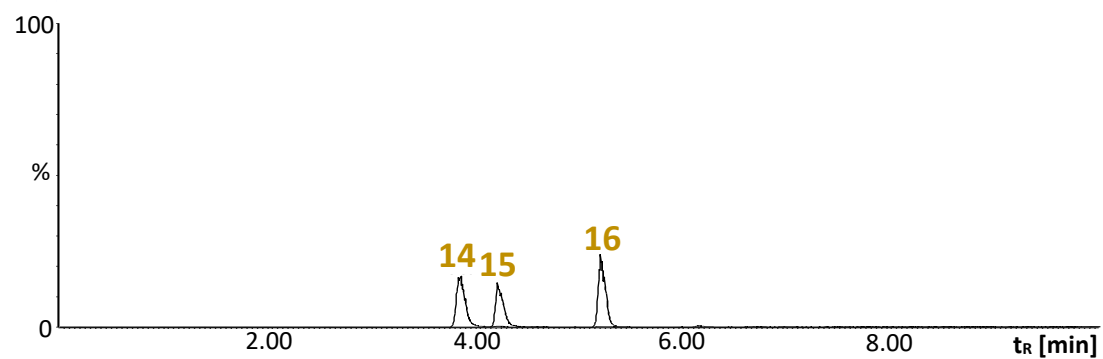
Obr. č. 33: Znáznornění separace všech analytů za optimalizovaných podmínek



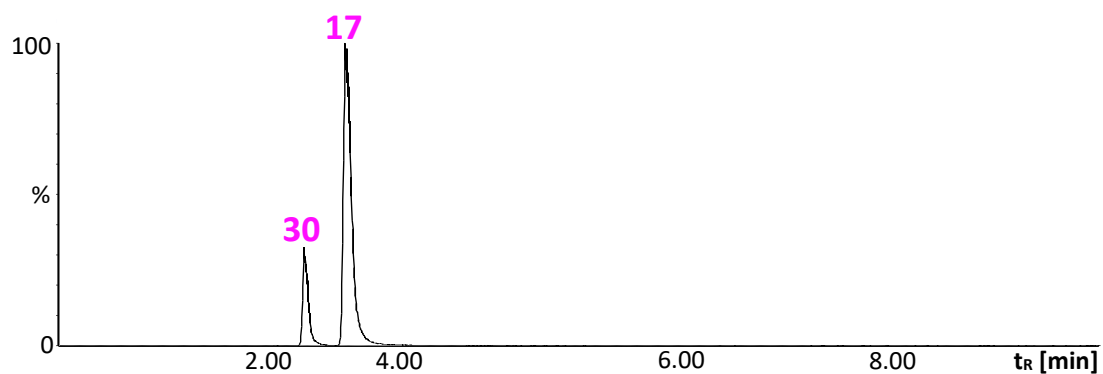
Obr. č. 34: Chromatogram izomerní skupiny m/z 271 za optimalizovaných podmínek



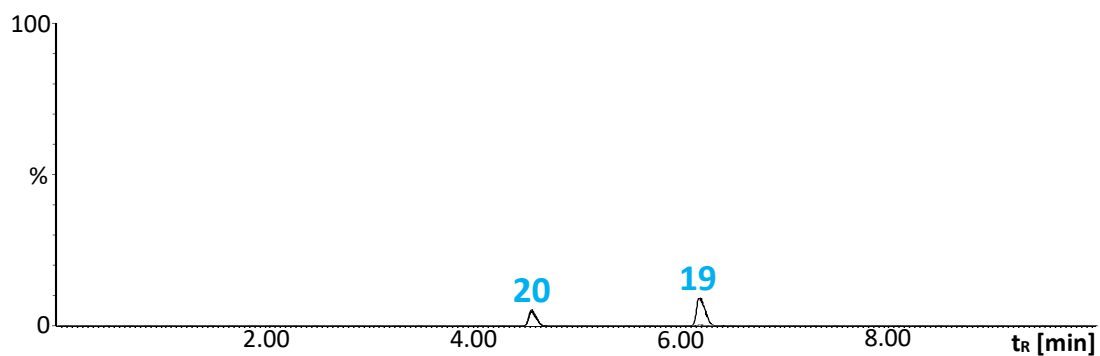
Obr. č. 35: Chromatogram izomerní skupiny m/z 287 za optimalizovaných podmínek



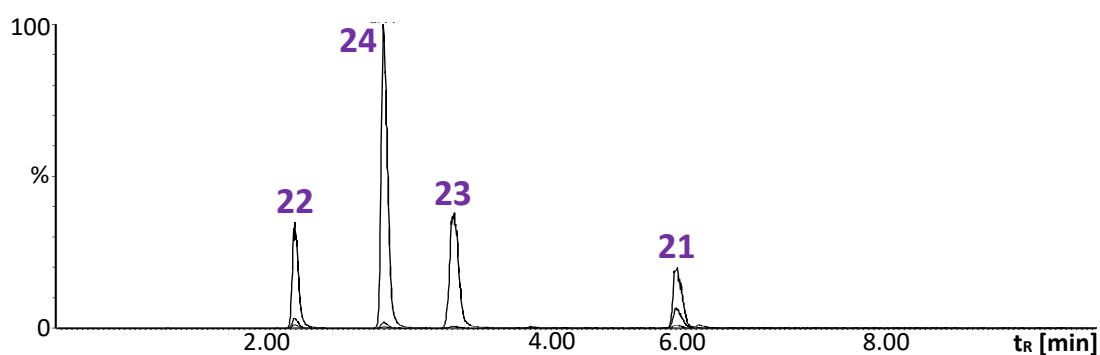
Obr. č. 36: Chromatogram izomerní skupiny m/z 301 za optimalizovaných podmínek



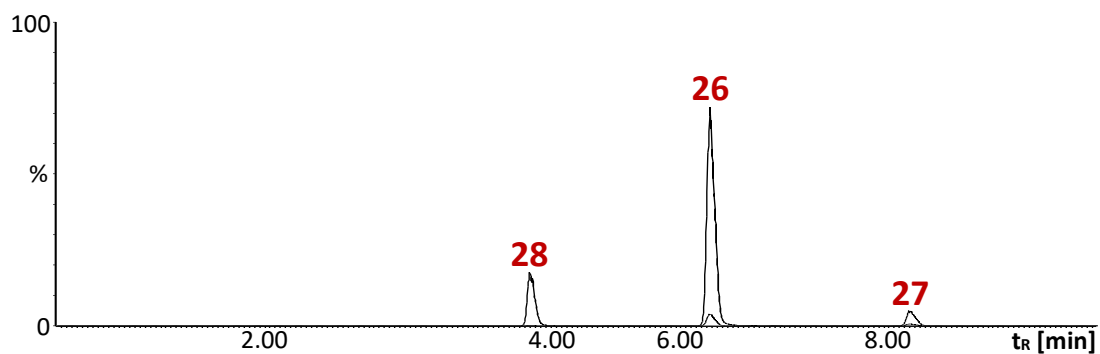
Obr. č. 37: Chromatogram izomerní skupiny m/z 303 za optimalizovaných podmínek



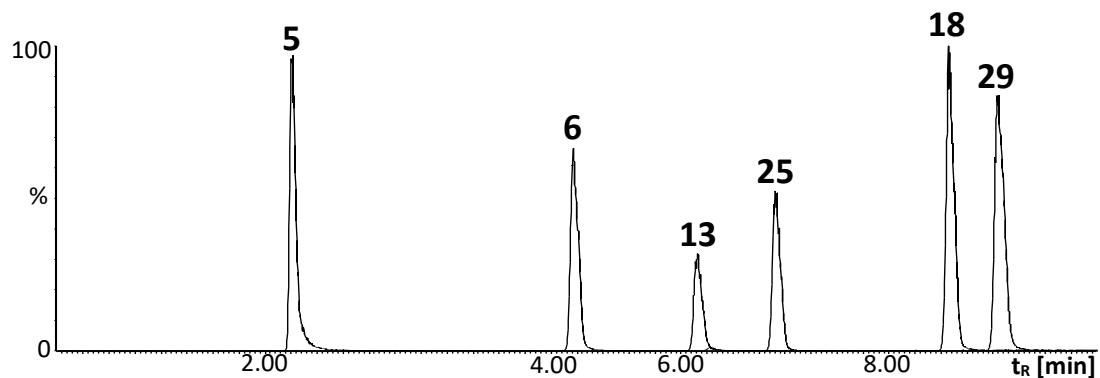
Obr. č. 38: Chromatogram izomerní skupiny m/z 315 za optimalizovaných podmínek



Obr. č. 39: Chromatogram izomerní skupiny m/z 317 za optimalizovaných podmínek



Obr. č. 40: Chromatogram izomerní skupiny m/z 331 za optimalizovaných podmínek



Obr. č. 41: Chromatogram skupiny *neizomerních* analytů za optimalizovaných podmínek

5.5. Vybrané validační parametry

5.5.1. Kalibrační křivka: rozmezí a linearita

Linearita byla ověřena v rozmezí 0,01-200 ng/ml. Z jednotlivých kalibračních roztoků byly sestrojeny kalibrační přímky pomocí lineární regrese metodou nejmenších čtverců s logaritmickou transformací dat. Logaritmická transformace dat byla zvolena, neboť poskytovala nižší odchylky [error%] oproti váženým funkcím $1/x$ a $1/x^2$. čímž bylo dosaženo nejvyšších hodnot korelačních koeficientů. Výsledné kalibrační křivky byly tvořeny 11-14 body. Po odměření 14 koncentrací byl totiž pro některé alkaloidy při vyšších koncentracích detektor přesycen, navíc v některých případech nebyla splněna podmínka hodnota odchylky do 15 %, a tak ULOQ bylo nutné upravit vyřazením daných koncentrací. V Tab. č. 16. jsou uvedeny rovnice kalibračních přímek a jejich korelační koeficienty, LLOQ, jeho odchylka a pozorovaný signál k šumu, a dále ULOQ.

5.5.2. Opakovatelnost metody

Opakovatelnost retenčních časů a ploch píků standardů byla ověřena na 10 replikátech na 4 koncentračních hladinách pokrývajících lineární rozmezí. Výsledky jsou shrnuty v Tab. č. 17.

Retenční časy byly opakovatelné pro všechny zvolené koncentrace, RSD byla v rozmezí 0,00-0,38 %. Opakovatelnost ploch píků standardů o koncentracích 1, 10 a 100 ng/ml byla v rozmezí RSD 0,34-8,43 %. RSD opakovatelnosti ploch měřená při koncentraci 0,05 ng/ml byla ve většině případech v rozmezí 0-10 %. Pro koncentraci 0,05 ng/ml blízké LLOQ standardů DHM, ODU, HLC, LCN a MAS byla RSD opakovatelnosti ploch > 10. Nicméně v žádném případě hodnoty RSD nebyly > 15 %, a tak hodnoty byly vyhovující. RSD 28,58 % u standardu IPW v této koncentrační hladině je dána tím, že tato koncentrace je nižší než stanovené LLOQ 0,1 ng/ml. Ve vyšších koncentracích je opakovatelnost ploch v optimu, tedy hodnocení pomocí kalibrační křivky, když bude použita v rámci jejího lineárního rozsahu, bude také optimální.

Tab. č. 16: Výsledky kalibrační křivky

zkratka	LLOQ [ng/ml]	odchylka [error%]			poměr signál/šum			ULOQ [ng/ml]	rovnice křivky	korelační koeficient
VIT	0,01	-9,3	1,4	2,8	9	11	12	50	0,01012x+5,32331	0,9995
CRN	0,01	17,8	19,7	15,1	11	10	12	100	0,998489x+5,36569	0,9992
CAR	0,01	0,0	-7,1	5,5	22	28	31	100	1,00617x+5,73582	0,9999
IPW	0,10	-2,0	2,2	-12,0	8	10	11	50	1,0587x+4,4281	0,9943
HXV	0,01	4,7	-5,0	4,7	17	18	18	50	1,00371x+5,1842	0,9999
LYC	0,01	3,8	-11,7	-1,3	38	25	27	50	1,01042x+5,71902	0,9998
HMN	0,02	-9,0	9,3	-0,2	10	13	13	200	1,00067x+5,01048	0,9998
EPM	0,02	5,7	4,2	4,4	18	19	20	100	0,996572x+5,2689	0,9998
CHL	0,01	-3,7	8,0	9,8	32	35	37	50	0,98355x+5,61271	0,9984
LCA	0,01	-1,4	-3,1	3,2	40	36	37	20	1,01539x+5,63491	0,9999
DHM	0,05	-3,6	-5,3	8,0	8	11	14	20	1,01801x+5,03735	0,9997
ODU	0,05	0,9	-14,4	-9,7	12	11	12	100	1,01028x+5,16876	0,9996
HMA	0,01	-8,1	9,4	-10,1	16	21	13	50	1,00955x+5,2298	0,9997
DMG	0,01	3,0	-0,1	12,8	18	20	18	50	0,9805x+5,34635	0,9977
THM	0,01	-10,8	-4,7	-1,6	13	15	16	50	1,01181x+5,96129	0,9998
HIP	0,02	-3,2	-3,2	19,7	13	17	19	50	0,996102x+4,85783	0,9995
HLC	0,05	-5,6	6,8	2,9	15	16	16	200	0,999836x+5,13806	0,9998
GAL	0,01	-3,6	-12,1	-4,9	31	29	24	50	1,00652x+5,48659	0,9999
LCN	0,05	11,2	16,2	4,6	20	20	15	50	1,0032x+5,2595	0,9986
HTD	0,05	16,2	-2,2	-0,3	22	14	16	200	0,990849x+5,03003	0,9997
CRI	0,05	7,7	10,1	-9,0	31	30	23	50	1,0018x+4,90909	0,9997
AMB	0,01	-9,0	3,6	12,0	16	19	23	50	1,00723x+5,37172	0,9998
TZT	0,01	1,4	-4,6	11,4	20	19	23	20	1,0027x+5,99052	0,9999
UND	0,05	-3,1	16,2	2,0	17	26	17	100	1,01983x+4,86639	0,9996
NOR	0,01	8,7	4,6	11,7	22	18	19	50	1,02783x+5,50898	0,9989
NRW	0,01	-17,5	-6,4	5,3	19	24	23	50	1,01858x+5,41373	0,9997
MAS	0,05	3,9	6,7	5,3	12	10	13	100	0,999916x+5,13686	0,9998
ALY	0,01	-2,5	4,0	2,7	17	14	22	100	1,00131x+5,32691	0,9999
ACA	0,01	-10,8	-2,0	3,6	13	14	17	50	1,01071x+5,60886	0,9998
o-ELC	0,01	-5,0	4,0	16,2	23	20	28	100	1,01943x+5,53907	0,9988

Tab. č. 17: Výsledky opakovatelnosti metody

zkratka	koncentrace 0,05 ng/ml		koncentrace 1,00 ng/ml		koncentrace 10,00 ng/ml		koncentrace 100,00 ng/ml	
	RSD t_R	RSD plochy	RSD t_R	RSD plochy	RSD t_R	RSD plochy	RSD t_R	RSD plochy
VIT	0,23	4,84	0,09	2,44	0,06	1,55	0,06	1,14
CRN	0,19	6,85	0,16	1,90	0,12	1,43	0,06	1,10
CAR	0,13	2,62	0,19	2,48	0,08	1,46	0,14	1,29
IPW	0,38	28,58	0,13	6,14	0,20	2,91	0,09	2,38
HXV	0,25	4,61	0,23	3,11	0,20	2,13	0,00	1,23
LYC	0,18	4,03	0,00	1,23	0,00	1,96	0,00	1,78
HMN	0,37	8,51	0,20	1,84	0,13	1,27	0,13	0,88
EPM	0,21	3,64	0,13	1,41	0,11	1,47	0,08	1,10
CHL	0,19	4,72	0,17	1,47	0,14	1,15	0,10	1,75
LCA	0,17	2,76	0,21	0,90	0,10	1,15	0,07	1,42
DHM	0,32	10,93	0,12	2,56	0,16	1,70	0,08	0,74
ODU	0,22	11,85	0,26	2,01	0,18	1,70	0,08	0,67
HMA	0,09	2,51	0,08	1,60	0,09	1,43	0,09	1,12
DMG	0,24	4,44	0,18	3,21	0,00	1,66	0,00	1,93
THM	0,25	2,13	0,00	1,45	0,16	1,47	0,12	0,48
HIP	0,17	6,47	0,07	2,64	0,07	1,15	0,11	1,40
HLC	0,14	10,86	0,05	2,31	0,07	0,93	0,08	1,30
GAL	0,10	3,36	0,10	1,01	0,00	1,39	0,00	1,32
LCN	0,29	11,97	0,17	1,93	0,15	1,04	0,11	1,18
HTD	0,21	4,98	0,21	2,33	0,23	2,49	0,23	0,68
CRI	0,16	7,72	0,09	2,07	0,11	1,61	0,07	1,48
AMB	0,17	4,23	0,13	0,90	0,07	1,03	0,11	1,35
TZT	0,11	2,99	0,08	1,36	0,08	0,34	0,08	0,70
UND	0,19	5,99	0,11	2,19	0,06	1,33	0,08	0,94
NOR	0,30	8,01	0,19	8,43	0,23	6,97	0,24	6,31
NRW	0,17	3,24	0,00	1,51	0,00	1,03	0,10	0,81
MAS	0,12	11,13	0,11	1,89	0,09	1,70	0,08	0,80
ALY	0,07	2,88	0,05	1,64	0,05	0,86	0,06	0,73
ACA	0,12	4,02	0,06	1,45	0,06	1,45	0,06	1,43
o-ELC	0,12	3,52	0,04	0,89	0,05	1,35	0,05	1,02

t_R – retenční čas, RSD – relativní směrodatná odchylka

5.5.3. Selektivita metody

V pracovních roztocích každého jednotlivého standardu by měl být pozorován signál detekce pouze v kanále se SRM přechodem, který byl určený právě pro tento alkaloid. Pokud byl ale pozorován i pík o stejném t_R i v kanálech SRM přechodů jiných alkaloidů, jedná se o příspěvek daného analytu („křížový přenos“). V tabulce pro SRM1 (Tab. č. 18) a SRM2 (Tab. č. 19) byly označeny zeleně kanály analytů, ve kterých byl křížový přenos v daném standardu pozorován.

Tab. č. 18: Přehled křížových přenosů (zeleně) v SRM1

zkratka m/z		kanál daného alkaloidu																																			
		VIT	CRN	CAR	IPW	NOR	NRW	LYC	HXV	HMN	EPM	CHL	LCA	MAS	ODU	DHM	HMA	DMG	THM	ACA	HLC	HIP	CRI	HTD	LCN	GAL	ALY	TZT	UND	AMB	o-ELC						
standard alkaloidu	VIT 271																																				
	CRN 271																																				
	CAR 271																																				
	IPW 271																																				
	NOR 273																																				
	NRW 285																																				
	LYC 287																																				
	HXV 287																																				
	HMN 287																																				
	EPM 287																																				
	CHL 287																																				
	LCA 287																																				
	MAS 299																																				
	ODU 301																																				
	DHM 301																																				
	HMA 301																																				
	DMG 303																																				
	THM 303																																				
	ACA 313																																				
	HLC 315																																				
	HIP 315																																				
	CRI 317																																				
	HTD 317																																				
	LCN 317																																				
	GAL 317																																				
	ALY 329																																				
	TZT 331																																				
	UND 331																																				
	AMB 331																																				
	o-ELC 345																																				

Tab. č. 19: Přehled křížových přenosů (zeleně) v SRM2

zkratka m/z		kanál daného alkaloidu																																		
		VIT	CRN	CAR	IPW	NOR	NRW	LYC	HXV	HMN	EPM	CHL	LCA	MAS	ODU	DHM	HMA	DMG	THM	ACA	HLC	HIP	CRI	HTD	LCN	GAL	ALY	TZT	UND	AMB	o-ELC					
standard alkaloidu	VIT 271																																			
	CRN 271																																			
	CAR 271																																			
	IPW 271																																			
	NOR 273																																			
	NRW 285																																			
	LYC 287																																			
	HXV 287																																			
	HMN 287																																			
	EPM 287																																			
	CHL 287																																			
	LCA 287																																			
	MAS 299																																			
	ODU 301																																			
	DHM 301																																			
	HMA 301																																			
	DMG 303																																			
	THM 303																																			
	ACA 313																																			
	HLC 315																																			
	HIP 315																																			
	CRI 317																																			
	HTD 317																																			
	LCN 317																																			
	GAL 317																																			
	ALY 329																																			
	TZT 331																																			
	UND 331																																			
	AMB 331																																			
	o-ELC 345																																			

5.6. Využití UHPLC-MS/MS metody pro analýzu rostlinných extraktů

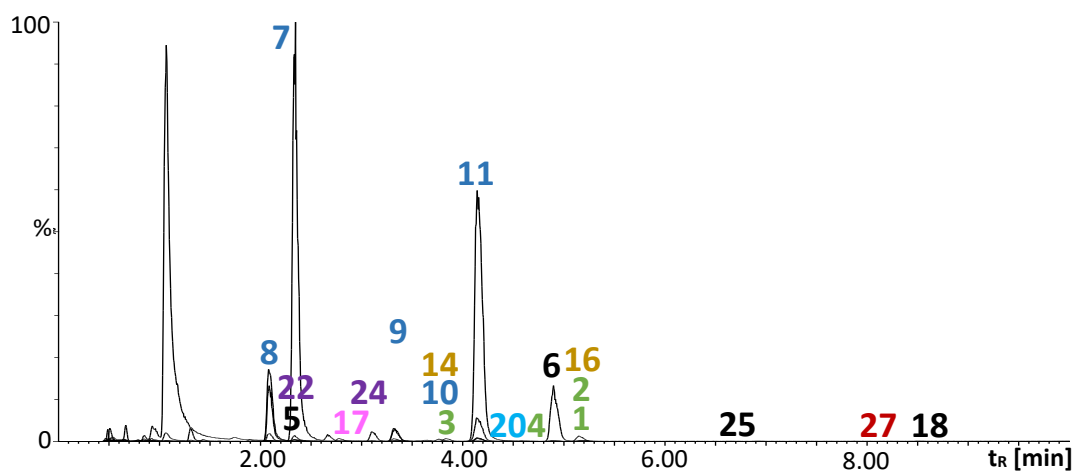
Analyzovány byly extrakty z listů a z cibulí připravený SFE metodou. Nenaředené extrakty obou typů rostlinného materiálu, spolu se vzorky zředěnými, byly změřeny v duplikátu vyvinutou UHPLC-MS/MS metodou. Sledované alkaloidy, které byly ve vzorcích identifikovány, byly následně zhodnoceny za pomoci rovnic příslušných kalibračních křivek (Tab. č. 16), a to z důvodu nedostupnosti vnitřních izotopicky značených standardů a rostlinné matrice stejného složení pouze bez obsahu vybraných alkaloidů. Hodnocení jednotlivých alkaloidů probíhala ze vzorku s co nejmenším ředěním, ve kterém hodnota koncentrace alkaloidu byla v lineárním rozmezí příslušné kalibrační křivky. Legenda ke chromatogramům obou extraktů je uvedena v Tab. č. 20. Chromatogram 20x naředeného extraktu ze sušených listů *Crinum asiaticum*, Amaryllidaceae je zobrazen na Obr. č. 42. Chromatogram 20x naředeného extraktu ze sušených cibulích rodu *Narcissus*, Amaryllidaceae je zobrazen na Obr. č. 43.

V extraktu ze sušených listů *Crinum asiaticum*, Amaryllidaceae bylo zaznamenáno 20 ze 30 sledovaných alkaloidů. Hodnocení identifikovaných alkaloidů v tomto extraktu je uvedena v Obr. č. 44. Světle modře jsou znázorněny koncentrace ng/ml a tmavě modře koncentrace pg/ml. Alkaloidy LCA, MAS, DHM, DMG, HLC, CRI, LCN, TZT, AMB a o-ELC nebyly detekovány. Nejvyšší koncentrace v extraktu dosáhly alkaloidy LYC, HXV, NRW s hodnotami 800,5 ng/ml, 577,9 ng/ml, 317,2 ng/ml.

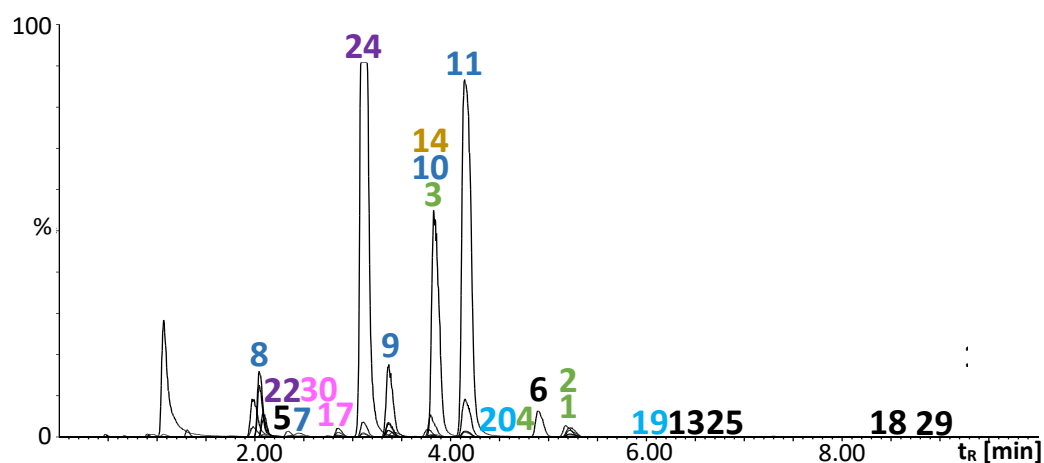
V extraktu ze sušených cibulích rodu *Narcissus*, Amaryllidaceae pak bylo detekováno 22 ze 30 sledovaných alkaloidů. Hodnocení identifikovaných alkaloidů je pak uvedena v Obr. č. 45. V tomto extraktu nebyly detekovány alkaloidy LCA, DHM, HMA, CRI, LCN, TZT, UND a AMB. Alkaloid MAS byl pouze detekován, jeho koncentrace byla nižší než stanovená LLOQ. Alkaloid GAL v extraktu dominoval. Ve vzorcích při všech zředěních nabýval koncentrace převyšující ULOQ kalibrační křivky, a tak nemohl být stanoven. Jeho množství se orientačně pohybovalo v řádech jednotek µg/ml. Další alkaloidy s vysokou koncentrací ve vzorku byly HMN, HXV, EPM a CHL s hodnotami 903,3 ng/ml, 768,8 ng/ml, 719,3 ng/ml a 718,2 ng/ml.

Tab. č. 20: Retenční časy analytů spolu s barevným označením jednotlivých izomerních skupin

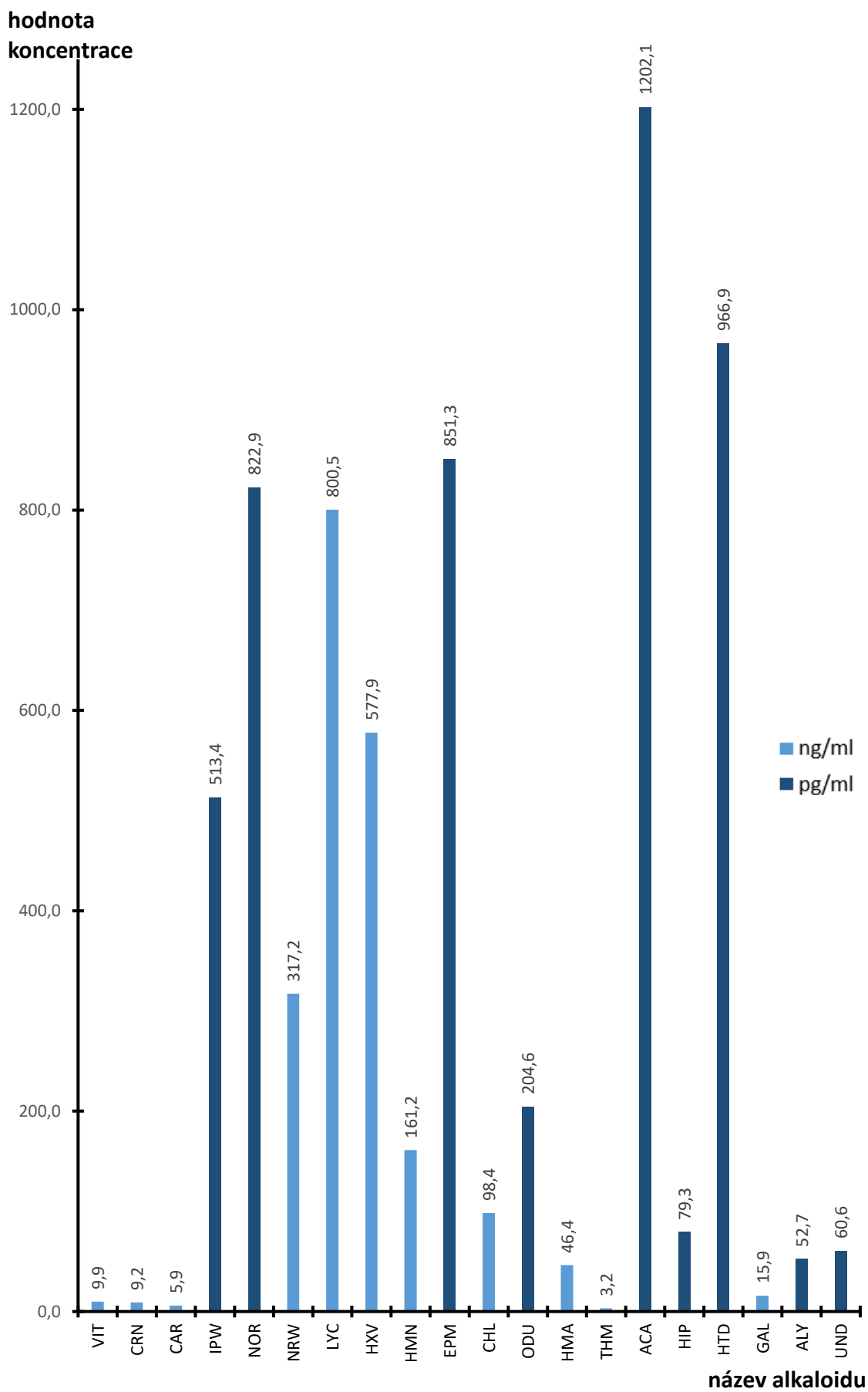
číslo	t _R [min]	zkratka alkaloidu	číslo	t _R [min]	zkratka alkaloidu
1	5,16	VIT	14	3,76	ODU
2	5,16	CRN	16	5,15	HMA
3	3,76	CAR	17	2,78	THM
4	4,72	IPW	18	8,55	ACA
5	2,37	NOR	19	6,10	HLC
6	4,90	NRW	20	4,49	HIP
7	2,35	LYC	22	2,33	HTD
8	2,08	HXV	24	3,10	GAL
9	3,37	HMN	25	6,78	ALY
10	3,80	EPM	27	8,22	UND
11	4,14	CHL	29	8,92	o-ELC
13	6,16	MAS	30	2,35	DMG



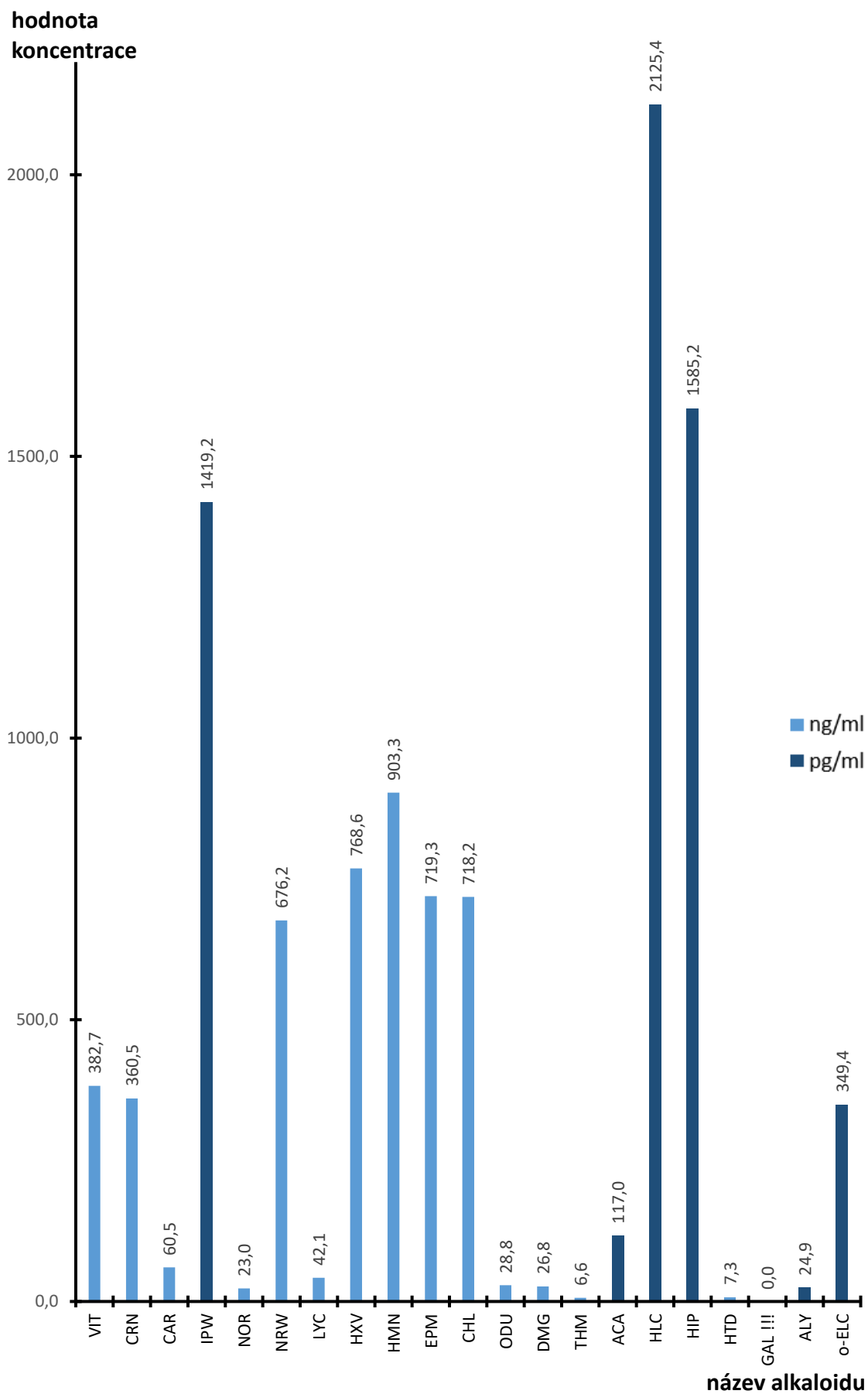
Obr. č. 42: Chromatogram 20x naředěného extraktu z listů *Crinum asiaticum*, Amaryllidaceae za optimálních podmínek



Obr. č. 43: Chromatogram 20x naředěného extraktu z cibulí rodu *Narcissus*, Amaryllidaceae za optimálních podmínek



Obr. č. 44: Analýza extraktu z listů *Crinum asiaticum*



Obr. č. 45: Analýza extraktu z cibulí rodu *Narcissus*

6. Závěr

V této práci byla úspěšně vyvinuta UHPLC-MS/MS metoda pro separaci 30 vybraných alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. Doba gradientu byla 10 minut, celková doba analýzy včetně ekvibrace kolony 12 minut. V porovnání s již publikovanými pracemi umožňuje tato metoda stanovení 30 alkaloidů v kratším čase, a to cca 4-7x kratším ve srovnání s metodami, kde bylo identifikováno okolo 30 alkaloidů (z nichž ale bylo maximálně pouze 8 ze spektra zvoleného pro tuto práci).

Nejllepší separace s optimálním rozlišením, symetrií a šířkou píků byla dosažena za použití kolony Acquity UPLC BEH Phenyl jako SF a MF MeOH:ACN 3:1 / AmF pH 9. Použitý gradient byl: 0 min 20 %B; 0-9 min 50 %B; 9-10 min 70 %B; 10-10,1 20 %B, 10,1-12,0 min 20 %B. Teplota na koloně byla nastavena na 50 °C, teplota automatického dávkovače pak na 10 °C, průtok na 0,4 ml/min a dávkovaný objem byl 2 µl. Parametry iontového zdroje v módu ESI⁺ byly nastaveny následovně: napětí na vstupním kuželu bylo nastaveno na 35 V, napětí na kapiláře na 1,0 kV, desolvatační teplota na 600 °C, průtok desolvatačního plynu na 1200 l/h a průtok na vstupním kuželu na 250 l/h. Pro jednotlivé analyty byly optimalizovány dva SRM přechody s cílem získat citlivou a selektivní metodu.

Kromě VIT a CRN se t_R látek v izomerních skupinách lišily, a tak selektivita nebyla ovlivněna pozorovanými křížovými přenosy při MS/MS detekci. t_R byly opakovatelné pro všechny zvolené koncentrace, a to 0,05, 1, 10 a 100 ng/ml, kdy RSD byla v rozmezí 0,00-0,38 %. RSD opakovatelnosti ploch pak byla při koncentracích 1, 10 a 100 ng/ml pro většinu analytů < než 2,5 %. Pro koncentraci 0,05 ng/ml RSD opakovatelnosti ploch většiny analytů byla < 0-10 %. Tato koncentrace byla blízká hodnotám LLOQ standardů DHM, ODU, HLC, LCN a MAS, a proto byla RSD opakovatelnosti ploch v těchto případech > 10, nicméně v žádném z těchto případů hodnoty RSD nebyly > 15 %. Metoda vykazovala v závislosti na analytu linearitu s R^2 0,9977-0,9999. LLOQ analytů se pohyboval v rozmezí 0,01-0,1 ng/ml a ULOQ analytů byl v rozmezí 20-200 ng/ml. Toto rozmezí bylo dostačující pro hodnocení rostlinných extraktů, které byly ředěny 20x a 100x. Pouze v jednom případě pro alkaloid GAL v extraktu ze sušených cibulí rodu *Narcissus*, Amaryllidaceae, by bylo zapotřebí větší ředění. V extraktech různých částí rostlin čeledi Amaryllidaceae jsou častěji zastoupené alkaloidy obsaženy většinou

v řádech jednotek až stovek mikrogramů, kdy jednoduchým ředěním 20x až 100x se koncentrace vzorků bude pohybovat v lineárním rozmezí daných kalibračních křivek. V případech, kdy by koncentrace alkaloidů byla nižší, a to v řádech desítek až desetitisíců pg/ml, by nebylo ředění třeba.

Optimalizovanou metodou bylo separováno kompletně 6 z 7 izomerních skupin a všechny neizomerní analyty. Skupinu *m/z* 271 se nepodařilo kompletně rozdělit, protože VIT a CRN byly optickými izomery, jejichž separaci v achirálním prostředí nelze očekávat.

V extraktu ze sušených listů *Crinum asiaticum*, Amaryllidaceae bylo zaznamenáno 20 ze 30 sledovaných alkaloidů. Nejvyšší koncentrace v extraktu dosáhly alkaloidy LYC, HXV, NRW s hodnotami 800,5 ng/ml, 577,9 ng/ml, 317,2 ng/ml. V extraktu ze sušených cibulích rodu *Narcissus*, Amaryllidaceae pak bylo detekováno 22 ze 30 sledovaných alkaloidů. Alkaloid GAL v extraktu dominoval, kvůli přesycení detektoru a nedostatečnému ředění jej nebylo možné hodnotit. Další hodnocené alkaloidy s nejvyšší koncentrací v extraktu byly HMN, HXV, EPM a CHL s hodnotami 903,3 ng/ml, 768,8 ng/ml, 719,3 ng/ml a 718,2 ng/ml.

Závěrem lze říci, že cíle této diplomové práce byly splněny.

7. Seznam použité literatury

- [1] Ding, Yan et al. Phytochemical and biological investigations of Amaryllidaceae alkaloids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* [online]. 2017, **19**(1), 53-100 [cit. 2024-04-23]. ISSN 1478-6427. Dostupné z doi: <https://doi.org/10.1080/10286020.2016.1198332>
- [2] EVIDENTE, Antonio. Advances on the Amaryllidacea Alkaloids Collected in South Africa, Andean South America and the Mediterranean Basin. *Molecules* [online]. 2023, **28**(10), 4055-4084 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/molecules28104055>
- [3] CASTAÑEDA, Carol et al. Amaryllidaceae alkaloids in skin cancer management: Photoprotective effect on human keratinocytes and anti-proliferative activity in melanoma cells. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2023, **21**(1), 36-47 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1214-0287. Dostupné z: doi:10.32725/jab.2023.004
- [4] BABASHPOUR-ASL, Marzieh et al. Therapeutic and medicinal effects of snowdrop (*Galanthus* spp.) in Alzheimer's disease: A review. *Journal of Education and Health Promotion* [online]. 2023, **12**(128), 1-7 [cit. 2023-08-20]. ISSN 2319-6440. Dostupné z: doi:10.4103/jehp.jehp_451_22
- [5] BERKOV, Strahil et al. Chapter Two - Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. Online. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*. 2020, roč. 2022, č. 83, s. 113-185. ISSN 1099-4831. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2019.10.002>. [cit. 2024-04-06].
- [6] LE, Ngoc-Thao-Hien et al. A mini-review of the anti-SARS-CoV-2 potency of Amaryllidaceae alkaloids. Online. *Phytomedicine*. 2024, roč. 129, č. 2024, s. článek 155576. ISSN 0944-7113. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.155576>. [cit. 2024-04-23].
- [7] COELHO SILVA, Lorene et al. Lycorine Alkaloid and *Crinum americanum* L. (Amaryllidaceae) Extracts Display Antifungal Activity on Clinically Relevant *Candida* Species. Online. *Molecules*. Roč. 27, č. 9, s. 12 stran. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules27092976>. [cit. 2024-04-23].
- [8] DEL C. ROJAS-VERA, Janne et al. Alkaloid profile and cholinesterase inhibition activity of five species of Amaryllidaceae family collected from Mérida state-

- Venezuela. Online. *South African Journal of Botany*. 2021, roč. 136, č. 2021, s. 126-136. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sajib.2020.03.001>. [cit. 2024-04-26]., obrázky ze strany 127 upraveny autorkou DP
- [9] DESGAGNÉ-PENIX, Isabel. Biosynthesis of alkaloids in Amaryllidaceae plants: a review. Online. *Phytochemistry Reviews*. 2020, roč. 20, č. květen 2020, s. 409-431. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09678-5>. [cit. 2024-04-28].
- [10] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vittatine#section=Structures> online 27.4.2024, upraveno autorkou DP
- [11] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Crine online 27.4.2024>, upraveno autorkou DP
- [12] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11-Hydroxyvittatine#section=2D-Structure> online 27.4.2024, upraveno autorkou DP
- [13] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hamayne#section=2D-Structure> online 27.4.2024, upraveno autorkou DP
- [14] NOVÁKOVÁ, Lucie a kolektiv. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. 2*. Brno: Tisk Centrum, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [15] ŠVEC, František. Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií? *Chemické Listy* [online]. 2009, **103**(4), 266-270 [cit. 2023-08-11]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_04_266-270.pdf
- [16] KUMAR D, Sanjay a D.R. Harish KUMAR. IMPORTANCE OF RP-HPLC IN ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT: A REVIEW. *International journal of pharmaceutical sciences and research* [online]. 2012, **3**(12), 4626-4633 [cit. 2023-08-11]. ISSN 0975-8232. Dostupné z: doi: [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3\(12\).4626-33](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.3(12).4626-33)
- [17] VIDUSHI, Yadav a Bharkatiya MEENAKSHI. A REVIEW ON HPLC METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences* [online]. 2017, **2**(6), 166-178 [cit. 2023-08-11]. ISSN 2454-6348. Dostupné z: doi:10.26479/2017.0206.12
- [18] SÝKORA, David a další. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické Listy* [online]. 2007, **101**(3), 190-199 [cit. 2023-08-11]. ISSN 1213-7103.

- Dostupné z: <http://www.w.w-chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1807/1807>
- [19] <https://hplcmart.com/hplc/viewproduct/id:9492/xbridge-c18/waters/reversed-phase#undefined> online 23.4.2024
- [20] *Charged Surface Hybrid (CSH) Technology and Its Use in Liquid Chromatography*. Online. Waters. Dostupné z: <https://www.waters.com/waters/library.htm?lid=10167251>. [cit. 2024-01-20].
- [21] https://www.researchgate.net/figure/Structure-of-BEH-Color-figure-available-online_fig2_233355015 online 14.9.2023, upraveno autorkou DP
- [22] https://www.waters.com/webassets/cms/promotion/docs/us_promos/CSH130_C18_Webinar_030713.pdf slide 12 online 14.9.2023, upraveno autorkou DP
- [23] CIELECKA-PIONTEK, Judyta et al. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia* [online]. 2013, **76**, 1429–1437 [cit. 2023-08-11]. ISSN 1612-1112. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2434-6>
- [24] WALTER, Thomas H. a Richard W. ANDREWS. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, **63**(str. 14-20), 14-20 [cit. 2023-08-11]. ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.016>
- [25] FEKETE, Szabolcs et al. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2014, **63**(str. 2-13), 2-13 [cit. 2023-08-11]. ISSN ISSN 0165-9936. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.007>
- [26] *A Review of Waters Hybrid Particle Technology: Ethylene-Bridged [BEH Technology] Hybrids and Their Use in Liquid Chromatography*. Online. Waters. Dostupné z: <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1546204>. [cit. 2024-01-20].
- [27] *Column Particle Technologies*. Online. Waters. Dostupné z: [https://www.waters.com/waters/en_US/BEH-\(Ethylene-Bridged-Hybrid\)-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=en_US](https://www.waters.com/waters/en_US/BEH-(Ethylene-Bridged-Hybrid)-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=en_US). [cit. 2024-01-20].
- [28] https://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10163613&locale=en_US online 23.4.2024

- [29] *A Review of Waters' Bonded-Phase Shield Technology and Its Use in High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Online. Waters. Dostupné z: https://www.waters.com/waters/library.htm?locale=en_US&lid=1546290. [cit. 2024-01-20].
- [30] *ACQUITY UPLC and ACQUITY Premier BEH Columns*. Online. Waters. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001371.pdf> Strana 6. [cit. 2024-01-20].
- [31] *ACQUITY UPLC and ACQUITY Premier CSH Columns*. Online. Waters. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720003397en.pdf> strana 4 [cit. 2024-01-20].
- [32] *ACQUITY UPLC and ACQUITY Premier BEH Columns*. Online. Waters. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001371.pdf>. Strana 6 [cit. 2024-01-20].
- [33] *ACQUITY UPLC and ACQUITY Premier CSH Columns*. Online. Waters. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720003397en.pdf>. Strana 4 [cit. 2024-01-20].
- [34] *ARION® Plus C18 UHPLC kolona, 1,7 µm 100 mm × 2,1 mm*. Online. Chromservis. Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/cz/arion-plus-c18-uhplc-kolona-1-7-m-100-mm-2-1-mm>. [cit. 2024-01-20].
- [35] *ACQUITY UPLC and ACQUITY Premier BEH Columns*. Online. Waters. Dostupné z: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001371.pdf>. Strana 6 [cit. 2024-01-20].
- [36] *Ascentis® Express RP-Amide, 2.7 µm HPLC Column*. Online. Merck. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/supelco/53931u>. [cit. 2024-01-20].
- [37] *Avantor® ACE® HPLC and UHPLC columns product catalogue*. Online. Avantor. Dostupné z: https://fr.vwr.com/assetsvc/asset/fr_FR/id/33800139/contents/avantor-ace-hplc-and-uhplc-columns.pdf strana 21 [cit. 2024-01-20].
- [38] *Better UHPLC Performance Starts NOW 1.7µm Core-Shell Columns*. Online. Phenomenex. Dostupné

- z: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/ef8950ec-aa2c-4c78-919b-18e3c432b638.pdf>. strana 6 [cit. 2024-01-20].
- [39] *New Kinetex F5 HPLC/UHPLC Core-Shell columns*. Online. Phenomenex.
Dostupné
z: <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/dd27011c-d610-4fd4-93ee-7d892c4058f8.pdf> . strana 17 [cit. 2024-01-20].
- [40] vlastní tvorba autorky díla
- [41] https://www.researchgate.net/figure/Columns-used-in-UPLC_fig2_326597434
online 14.9.2023, upraveno autorkou DP
- [42] DE HOFFMANN, Edmond a Vincent STROOBANT. Introduction, Analytical Information. In: *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3. England: John Wiley, 2007, 1-10, 243-268. ISBN 978-0-470-03310-4.
- [43] KHALIKOVA, Maria a další. What is the role of current mass spectrometry in pharmaceutical analysis? Online. *Special Issue to honor František Tureček*. 2024, roč. 43, č. 3, s. 560-609. Dostupné
z: <https://doi.org/doi.org/10.1002/mas.21858>. [cit. 2024-05-15].
- [44] BACON, Jeffrey R. et al. Atomic spectrometry update – a review of advances in environmental analysis. Online. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2024, roč. 2024, č. 39, s. 11-65. Dostupné
z: <https://doi.org/10.1039/D3JA90044D>. [cit. 2024-05-15].
- [45] WOOD, Michelle et al. Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry in forensic science. Online. *Journal of Chromatography A*. 2006, roč. 1130, č. 1, s. 3-15. Dostupné
z: <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.084>. [cit. 2024-05-15].
- [46] PICÓ, Yolanda. Chapter 1 - Mass Spectrometry in Food Quality and Safety: An Overview of the Current Status. Online. *Comprehensive Analytical Chemistry*. 2015, roč. 68, č. 2015, s. 3-76. Dostupné
z: <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-444-63340-8.00001-7>. [cit. 2024-05-15].
- [47] WATSON, J. Throck a O. David SPARKMAN. The Need for Chromatography. In: *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and*

Strategies for Data Interpretation. 4. England: John Wiley, 2007, s. 42-43. ISBN 978-0470-51634-8.

- [48] PILAŘOVÁ, Veronika a další. Analysis of vitamin D and its metabolites in biological samples – Part I: Optimization and comparison of UHPSFC-MS/MS and UHPLC-MS/MS methods. Online. *Journal of Chromatography B*. 2024, roč. 1237, článek 124087. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124087>. [cit. 2024-04-25].
- [49] WATERS, Brian et al. A validated method for the separation of ethyl glucoside isomers by gas chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation in human whole blood and urine. Online. *Journal of Chromatography B*. 2022, roč. 1188, č. 2022, s. článek 123074. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.123074>. [cit. 2024-04-25].
- [50] CARNES, Stephanie et al. Comparison of ultra high performance supercritical fluid chromatography, ultra high performance liquid chromatography, and gas chromatography for the separation of synthetic cathinones. Online. *The Journal of Separation Science*. 2017, roč. 40, č. 17, s. 3545-3556. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.201700349>. [cit. 2024-04-25].
- [51] HAAG, Anthony M. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. Online. In: *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications*. 919. Springer, 2016, s. 158-159, 166. Dostupné z: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-41448-5_7#citeas. [cit. 2024-04-25].
- [52] LI, Aiqian et al. Discovery and characterisation of lycorine-type alkaloids in *Lycoris* spp. (Amaryllidaceae) using UHPLC-QTOF-MS. *Phytochemical Analysis* [online]. 2018, **30**(3), 268-277 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1099-1565. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/pca.2811>
- [53] KATOCH, Deepali et Upendra SHARMA. Simultaneous quantification and identification of Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus tazetta* by ultra performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2019, **175**(112750), 1-7 [cit. 2023-08-20]. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.047>

- [54] ZHANG, Xi et al. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Crinum* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2009, **23**(18), 2903-2916 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1097-0231. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/rcm.4205>
- [55] TIAN, Yongqiang et al. Comparative Analysis of Amaryllidaceae Alkaloids from Three *Lycoris* Species. *Molecules* [online]. 2015, **20**(12), 21854–21869 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules201219806
- [56] KATOCH, Deepali et al. Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC–DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2012, **71**(-), 187-192 [cit. 2023-08-20]. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.001>
- [57] LÓPEZ, Susana et al. Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of the five major alkaloids in *Narcissus confusus*. *Phytochemical Analysis* [online]. 2002, **13**(6), 311-115 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1099-1565. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/pca.660>
- [58] NAIR, J.J. et al. Identification of Amaryllidaceae alkaloids in larvae of the ‘lily borer’ moth *Brithys crini*. Online. *South African Journal of Botany*. 2020, roč. 2020, č. 131, s. 351-359. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.036>. [cit. 2024-01-21].
- [59] SIBANYONI, Mary Nokuthula et al. Isolation, in vitro evaluation and molecular docking of acetylcholinesterase inhibitors from South African Amaryllidaceae. Online. *Fitoterapia*. 2020, roč. 146, č. 104650, s. 1-8. ISSN 0367-326X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104650>. [cit. 2024-01-21].
- [60] ATRAHIMOVICH, Dana et al. Galantamine Quantity and Alkaloid Profile in the Bulbs of *Narcissus tazetta* and daffodil cultivars (Amaryllidaceae) Grown in Israel. Online. *Metabolites*. 2021, roč. 11, č. 3, s. 185-198. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/metabo11030185>. [cit. 2024-01-21].
- [61] QUECKENBERG, O. R. et al. Reinvestigation of *Amaryllis belladonna*. Online. *Phytochemical Analysis*. 1996, roč. 7, č. 3, s. 156-160. ISSN 1099-1565.

- Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199605\)7:3<156::AID-PCA291>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199605)7:3<156::AID-PCA291>3.0.CO;2-%23). [cit. 2024-04-14].
- [62] <https://www.teknokroma.es/en/products/gc-chromatography/gc-capillary-columns/ultrainert-capillary-columns/sapiens-x5ms>, online 14.5.2024
- [63] KARAKOYUN, Çiğdem et al. Simultaneous quantitative analysis of biologically important Amaryllidaceae alkaloids in *Narcissus tazetta* L. subsp. *tazetta* by HPLC/PDA. Online. *Journal of Research in Pharmacy*. 2019, roč. 23, č. 3, s. 498-505. ISSN 2630-6344. Dostupné z: <https://doi.org/10.12991/jrp.2019.156>. [cit. 2024-04-14].
- [64] GUO, Ying et al. Analysis of Bioactive Amaryllidaceae Alkaloid Profiles in *Lycoris* Species by GC-MS. *Natural Product Communications* [online]. 2014, 9(8), 1081-1086 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1555-9475. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900806>
- [65] LEÓN, Karen Acosta et al. Alkaloids of *Phaedranassa dubia* (Kunth) J.F. Macbr. and *Phaedranassa brevifolia* Meerow (Amaryllidaceae) from Ecuador and its cholinesterase-inhibitory activity. *South African Journal of Botany* [online]. 2021, 136(-), 91-99 [cit. 2023-08-20]. ISSN 0254-6299. Dostupné z: doi:10.1016/j.sajb.2020.09.007
- [66] ZARAGOZA-PUCHOL, Daniel et al. Alkaloids Analysis of *Habranthus cardenasianus* (Amaryllidaceae), Anti-Cholinesterase Activity and Biomass Production by Propagation Strategies. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 1, s. článek 192. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26010192>. [cit. 2024-04-26].
- [67] ZHANG, Yulin a Zilin CHEN. Nonaqueous CE ESI-IT-MS analysis of Amaryllidaceae alkaloids. *Journal of Separation Science* [online]. 2013, 36(6), 1078-1084 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1615-9314. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201201083>
- [68] GOTTI, Roberto et al. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC-MS and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, 42(1), 17-24 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1873-264X. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.003>

- [69] BERKOV, Strahil et al. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochemical Analysis* [online]. 2008, **19**(5), 411-419 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1099-1565. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1002/pca.1066>
- [70] MROCZEK, Tomasz. Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, **1216**(12), 2519-2528 [cit. 2023-08-20]. ISSN 1873-3778. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.061>
- [71] BERKOV, Strahil et al. The Amaryllidaceae alkaloids: an untapped source of acetylcholinesterase inhibitors. Online. *Phytochemistry Reviews*. 2022, roč. 21, č. listopad 2021, s. 1415-1443. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/s11101-021-09790-0\(0123456789\(\).,-volV\)\(01234567](https://doi.org/10.1007/s11101-021-09790-0(0123456789().,-volV)(01234567). [cit. 2024-04-28].
- [72] CAHLÍKOVÁ, Lucie a další. Recent Progress on Biological Activity of Amaryllidaceae and Further Isoquinoline Alkaloids in Connection with Alzheimer's Disease. Online. *Molecules*. 2021, roč. 26, č. 17, s. článek 5240. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26175240>. [cit. 2024-04-28].
- [73] HULCOVÁ, Daniela a další. Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus* L. cv. Dutch Master as potential drugs in treatment of Alzheimer's disease. Online. *Phytochemistry*. 2019, roč. 165, č. září 2019, s. článek 112055. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112055>. [cit. 2024-04-27].
- [74] VANĚČKOVÁ, Nina a další. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. Online. 2016, roč. 83, č. 6, s. 80114-80120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6RA20205E>. [cit. 2024-04-27].
- [75] SHAMMARI, L. Al a další. Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum X Hybridum* CV. Ferrari, and preparation of vittatine derivatives as potential ligands for Alzheimer's disease. Online. *South African Journal of Botany*. 2021,

- roč. 136, č. leden 2021, s. 137-146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.06.024>. [cit. 2024-04-27].
- [76] KULHÁNKOVÁ, Andrea a další. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* BAKER and their acetylcholinesterase- and butyrylcholinesterase-inhibitory activity. Online. *Chemistry & Biodiversity*. 2013, roč. 10, č. 6, s. 1120-1127. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cbdv.201200144>. [cit. 2024-04-27].
- [77] CAHLÍKOVÁ, Lucie a další. Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Activities. Online. *Natural Product Communications*. 2013, roč. 8, č. 11, s. 1541-1544. Dostupné z: <https://doi.org/PMID: 24427936>. [cit. 2024-04-27].
- [78] ŠAFRATOVÁ, Marcela a další. Amaryllidaceae Alkaloids from *Clivia miniata* (Lindl.) Bosse (Amaryllidaceae): Isolation, Structural Elucidation, and Biological Activity. Online. *Plants*. 2022, roč. 11, č. 22, s. článek 3034. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants11223034>. [cit. 2024-04-28].
- [79] KOHELOVÁ, Eliška a další. Alkaloids of *Zephyranthes citrina* (Amaryllidaceae) and their implication to Alzheimer's disease: Isolation, structural elucidation and biological activity. Online. *Bioorganic Chemistry*. 2021, roč. 107, č. ú2021, s. článek 104567. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104567>. [cit. 2024-04-28].
- [80] https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf strana 9, online 12.5.2024