

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



Diplomová práce

**Studie podmínek separace a stability vybraných fenolických
látek**

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

Hradec Králové, 2021

Zuzana Jandorová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Zuzana Jandorová

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

Název diplomové práce: Studie podmínek separace a stability vybraných fenolických látek

Cílem této diplomové práce bylo zjištění nejvhodnějších podmínek separace pro analýzu deseti fenolických látek pomocí ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie s PDA detekcí. Práce je zaměřena zejména na separaci kritického páru isorhamnetin a tamarixetin. Dalším cílem bylo zjištění krátkodobé stability všech testovaných látek po dobu 24 hodin.

Analýzy probíhaly s využitím chromatografického systému ACQUITY UPLC systém s PDA detektorem při vlnové délce 275 nm. Prvním krokem studie separačních podmínek byl screening 17 kolon od několika různých výrobců. Byly testovány kolony: ACE Excel C18, BEH C18, CSH C18, Arion Plus C18, Ascentis Express C18, Atlantis Premier BEH C18 AX, BEH Shield RP18, Cortecs Shield RP18, Ascentis Express RP-Amide, BEH Phenyl, CSH Phenyl-Hexyl, Kinetex Biphenyl, ACE Excel C18-AR, ACE Excel C18-PFP, CSH Fluoro-Phenyl, Ascentis Express F5 a Kinetex PFP. Během screeningu byly testovány 3 organické modifikátory (acetonitril, methanol a acetonitril s methanolem 1:1) v kombinaci se 2 vodnými složkami (0,1% kyselina mravenčí a 0,1% kyselina octovou). Druhým krokem byla optimalizace separačních podmínek na 3 nejvhodnějších kolonách, kterými byly Ascentis Express RP-Amide, Kinetex Biphenyl a ACE Excel C18-PFP. Optimalizován byl postupně vliv gradientových křivek, nastavení gradientové eluce, teplota separace a čas analýzy.

Nejlepších výsledků separace analyzovaných látek bylo dosaženo na koloně Kinetex Biphenyl za podmínek: methanol s 0,1% kyselinou mravenčí, gradientový program 15-98 % MeOH během 7 minut s následnou 2minutovou ekvilibrací, teplota separace 40 °C. Tyto podmínky byly také využity pro měření krátkodobé stability jednotlivých fenolických látek.

Stabilita byla měřena každou hodinu po dobu 24 hodin. Sledována byla změna plochy píku v čase a srážení látek při uchovávání v automatickém dávkovači. Měření probíhalo při teplotě 10 °C, 15 °C a 20 °C. Látky byly rozpuštěny ve vodě s HCOOH a ve 20% methanolu s HCOOH, který byl zvolen na základě srovnání vlivu rozpouštědla na tvar píku. Každá látka byla celkem podrobena 6 měřením. Jako látky stabilní za všech testovaných podmínek se projevíly PAA, 4MC, HFP a HVA. U těchto látek nedošlo k poklesu koncentrace pod limit 95 %. Látky PG, HFA a RUT vykazovaly stabilitu jen za určitých podmínek. Problémové chování vykazoval QCE, ISO a TAM, u nichž docházelo také ke srážení látky v roztoku.

Klíčová slova: UHPLC/PDA; fenolické látky; separační podmínky; screening kolon; optimalizace; stabilita

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Zuzana Jandorová

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

Title of the diploma thesis: A study of separation conditions and stability of selected phenolic compounds

The goal of this diploma thesis was to determine the most suitable separation conditions for the analysis of ten phenolic compounds by the ultra-high performance liquid chromatography with PDA detection. The thesis is focused mainly on the separation of critical pair tamarixetin and isorhamnetin. Another goal was to determine the short-term stability of all tested compounds for 24 hours.

Analyses were performed using the ACQUITY UPLC chromatographic system with PDA detector at a wavelength of 275 nm. The first step in the study of separation conditions was the screening of 17 columns from several different manufacturers. Tested columns included ACE Excel C18, BEH C18, CSH C18, Arion Plus C18, Ascentis Express C18, Atlantis Premier BEH C18 AX, BEH Shield RP18, Cortecs Shield RP18, Ascentis Express RP-Amide, BEH Phenyl, CSH Phenyl-Hexyl, Kinetex Biphenyl, ACE Excel C18-AR, ACE Excel C18-PFP, CSH Fluoro-Phenyl, Ascentis Express F5, and Kinetex PFP. During the screening, 3 organic modifiers (acetonitrile, methanol and acetonitrile with methanol 1:1) were tested in combination with 2 aqueous components (0.1% formic acid and 0,1% acetic acid). The second step was the optimization of separation conditions on the 3 most suitable columns, namely Ascentis Express RP-Amide, Kinetex Biphenyl, and ACE Excel C18-PFP. The effect of gradient curves, the gradient elution setting, the separation temperature and the analysis time were optimized.

The best results of separation of the analytes was achieved on the Kinetex Biphenyl column under the conditions: methanol with 0.1% formic acid, gradient program 15-98 % MeOH within 7 minutes followed by 2 minutes of equilibration, separation temperature 40 °C. These conditions were also used to measure the short-term stability of individual phenolic compounds.

The stability was measured every hour for 24 hours. The change in peak area over time and the precipitation of compounds during storage in the autosampler were monitored. The measurements were performed at 10 °C, 15 °C, and 20 °C. The compounds were dissolved in water with HCOOH and 20% methanol with HCOOH, which was chosen based on a comparison of the effect of the solvent on the peak shape. Each compound was subjected to 6 measurements. PAA, 4MC, HFP and HVA proved to be stable compounds under all tested conditions. For these compounds, the concentration didn't decrease below the limit of 95 %. PG, HFA and RUT were stable only under certain conditions. QCE, TAM and ISO showed problematic behaviour, with precipitation in the solution.

Keywords: UHPLC/PDA; phenolic compounds; separation conditions; column screening; optimization; stability

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

V Hradci Králové, dne 10.5.2021

Zuzana Jandorová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. PharmDr. Lucii Novákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a ochotu poskytnuté při zpracování diplomové práce. Mé poděkování patří též Kateřině Pražákové za pomoc při získání kompletních výsledků. Děkuji také své rodině a příteli za trpělivost a podporu během studia.

OBSAH

ABSTRAKT.....	2
ABSTRACT.....	4
OBSAH	8
SEZNAM ZKRATEK	10
1 ÚVOD.....	11
2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE	12
3 TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	13
3.1.1 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)	13
3.1.2 UHPLC instrumentace	15
3.1.3. Stacionární fáze v UHPLC	15
3.1.4 Detekční systémy v UHPLC	21
3.2 Fenolické látky	21
3.2.1 Výskyt a význam fenolických látek.....	22
3.2.2 Fenolické kyseliny	22
3.2.3 Flavonoidy.....	22
3.2.4 Metabolismus kvercetinu	24
3.2.5 Fyzikálně-chemické vlastnosti a struktury látek	25
3.2.6 Publikované metody zabývající se analýzou fenolických látek.....	26
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
4.1 Přístroje a pomůcky	29
4.2 Chemikálie.....	29
4.3 Standardní látky	29
4.4 Stacionární fáze.....	30
4.5 Příprava roztoků.....	30

4.5.1 Zásobní roztoky standardních látek.....	30
4.5.2 Pracovní roztoky	31
4.5.3 Směsný roztok.....	31
4.5.4 Mobilní fáze a oplachové kapaliny	31
4.5.5 Ředící roztoky.....	32
4.6 Studie podmínek separace	32
4.6.1 Výchozí chromatografické podmínky	32
4.6.2 Optimalizace chromatografických podmínek.....	33
4.7 Studie krátkodobé stability	34
4.7.1 Zásobní roztoky standardních látek.....	34
4.7.2 Pracovní roztoky	34
4.7.3 Ředící roztoky.....	34
4.7.4 Postup měření.....	34
4.7.5 Srážení roztoků	35
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	36
5.1 Optimalizace chromatografické separace	36
5.1.1 Screening kolon.....	36
5.1.2 Optimalizace podmínek na koloně Ascentis Express RP-Amide.....	53
5.1.3 Optimalizace podmínek na koloně Kinetex Biphenyl	61
5.1.4 Optimalizace podmínek na koloně ACE Excel C18-PFP	67
5.1.5 Výsledné podmínky chromatografické separace.....	74
5.2 Studie krátkodobé stability	75
6 ZÁVĚR.....	87
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	89

SEZNAM ZKRATEK

4MC	4-Methylcatechol
ACN	Acetonitril
BEH	Hybridní částice s ethylenovými můstky
C18	Osmnáctiuhlíkatý řetězec
CD	Cyklodextrin
CSH	Hybridní povrchově nabitě částice
PDA	Detektor s diodovým polem
F5	Pentafluorfenyl
HFA	3,4-Dihydroxyfenyloctová kyselina
HFP	3-(3-Hydroxyfenyl)propionová kyselina
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSS	Silikagelové částice s vysokou pevností
HVA	Homovanilínová kyselina
IL	Interleukin
ISO	Isorhamnetin
LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
Mh	Molární hmotnost
PAA	3-Hydroxyfenyloctová kyselina
PFP	Pentafluorfenyl
PG	Floroglucinol
QCE	Kvercetin
RUT	Rutin
RP18	Reverzní fáze s osmnáctiuhlíkatým řetězcem
SF	Stacionární fáze
TAM	Tamarixetin
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV/VIS	Ultrafialové záření – Viditelné záření

1 ÚVOD

Fenolické látky jsou nejčastěji zastoupenými antioxidanty v ovoci i zelenině. Na lidské zdraví mají v mnoha směrech prospěšný vliv. Jejich dostatečný příjem potravou například snižuje riziko kardiovaskulárních chorob, rakoviny nebo neurodegenerativních onemocnění. Fenolické látky tvoří obrovskou skupinu sloučenin, proto studium jejich vlastností a vývoj nových analytických metod může zjednodušit jejich výzkum a praktické využití.

Pro stanovení fenolických látek se často využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií nebo spektrofotometrickými detektory. Pro analýzu látek v této diplomové práci byla využita metoda UHPLC/PDA umožňující rychlé rozdělení a identifikaci jednotlivých fenolických látek.

Diplomová práce navazuje na práci Veroniky Pilařové publikovanou v odborném článku *Simultaneous determination of quercetin and its metabolites in rat plasma by using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry* [1]. S vývojem stále nových stacionárních fází se má práce zaměřuje na prověření, zda neexistuje vhodnější kolona pro rychlou analýzu. Problematické je oddělit především izomerní látky tamarixetin a isorhamnetin a současně nalézt kolonu a optimalizovat podmínky pro rozdělení všech 10 testovaných látek.

Během testování jednotlivých kolon jsem se potýkala také s problémem stability a srážení některých látek při nízké teplotě uchovávání v automatickém dávkovači. Z tohoto důvodu je do mé diplomové práce zahrnuto i měření krátkodobé stability a zjištění vlivu podmínek na srážení látek v roztoku při různých teplotách a rozpouštědlech. Určení stability látek je též klíčovou součástí vývoje každé metody.

2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zjištění nejvhodnějších separačních podmínek UHPLC/PDA metody pro separaci směsi deseti fenolických látek pomocí rychlé analýzy s důrazem na obtížnou separaci izomerů tamarixetinu a isorhamnetinu. Fenolické látky v této studii jsou kyselého charakteru a zahrnují 2 skupiny látek – malé molekuly typu fenolických kyselin s molární hmotností v rozmezí 100-200 g/mol a sloučeniny typu flavonoidních struktur s větší molární hmotností (300-650 g/mol).

První fází studie byl screening 17 kolon za podmínek obecného gradientu. Byla zjišťována vhodnost jednotlivých stacionárních fází pro analýzu směsi, s ohledem na kritický pár. Pro screening byly využívány 3 organické modifikátory a 2 vodné složky.

Druhou fází byla optimalizace podmínek separace na třech nejvhodnějších stacionárních fázích získaných screeningem kolon. Byla testována změna podmínek gradientové eluce, teploty, délky analýzy a gradientových křivek. Na závěr byla vybrána nejvhodnější kolona pro separaci látek pomocí UHPLC s PDA detekcí.

Dalším cílem práce bylo změření stability jednotlivých fenolických látek po dobu 24 hodin. Krátkodobá stabilita byla měřena za optimalizovaných separačních podmínek. Během měření byla sledována změna plochy píku v čase a vznik sraženiny látek v roztoku. Měření probíhalo při třech různých teplotách a ve dvou různých rozpouštědlech.

Výsledné podmínky separace i zjištěná stabilita fenolických látek budou prakticky využity Katedrou analytické chemie při práci s LC-MS.

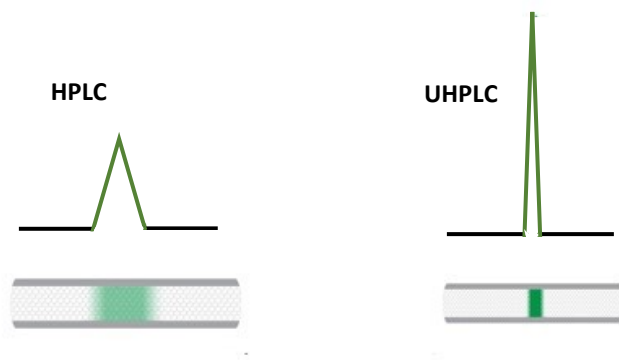
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie

3.1.1 Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

UHPLC je moderní separační technika, která má oproti vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) řadu předností. Vznik a zejména komerční dostupnost této metody zajistila revoluci v separačních metodách. Bylo dosaženo významně vyššího rozlišení, citlivosti a zkrácení doby analýzy, což vedlo ke snížení nákladů a zvýšení produktivity analytických laboratoří. Metoda je vhodná pro rutinní testování velkého počtu vzorků a hojně využívána v mnoha průmyslových odvětvích např. farmaceutický průmysl, bezpečnost potravin, identifikace metabolitů či bioanalýza [2][3][4].

Na obrázku 1 je znázorněno srovnání účinnosti HPLC a UHPLC metody. Vyšší účinnost UHPLC separace se projeví viditelně menším rozmýváním zóny analytu, a tím i vyšším a užším tvarem píku, což také umožní lepší citlivost a rozlišení.



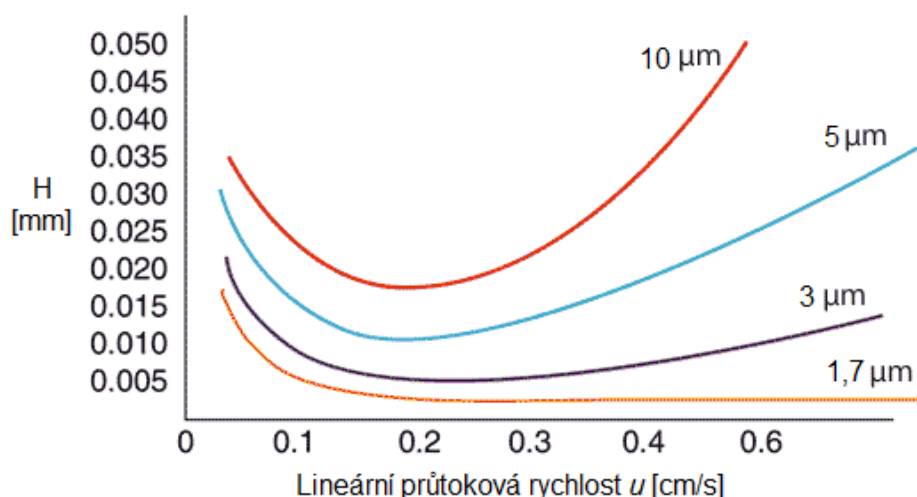
Obrázek 1: Srovnání účinnosti HPLC a UHPLC, upraveno dle [2].

Na míru rozmytí zóny analytu mají vliv kolonové i mimokolonové příspěvky. Mezi mimokolonové patří dávkovač, spojovací kapiláry od nástřiku po začátek kolony a od konce kolony po detektor, včetně průtokové cely. Mimokolonovým příspěvkům zabráníme snížením všech těchto objemů na minimum. Kolonové příspěvky zahrnují velikost částic, způsob naplnění kolony, délku a vnitřní průměr kolony. V porovnání s HPLC se používají kratší kolony o délce 50 až 100 mm s malým vnitřním průměrem

1,0 nebo 2,1 mm, což vede k rychlejšímu času analýzy a menší spotřebě rozpouštědel. [2][3][4][5].

Účinnost separace se zvyšuje zmenšováním velikosti částic stacionární fáze. Společně s účinností ovšem významně roste i zpětný tlak. Pro použití menších částic a dosažení optimální účinnosti proto bylo nezbytné použít specializované systémy. UHPLC přístroje jsou zkonstruovány z materiálů umožňujících práci i za velmi vysokých tlaků. Tlak se během separace pohybuje až kolem 1000 barů. Pro UHPLC jsou typické částice menší než 2 μm , které poskytují o 70 % vyšší rozlišení a 3x vyšší účinnost ve srovnání s velikostí částic 5 μm . Používají se částice o velikosti 1,5 až 2 μm , protože další zmenšování částic již zvyšuje účinnost jen zanedbatelně. Oproti tomu dochází k prudkému nárůstu zpětného tlaku [2][3][4][6].

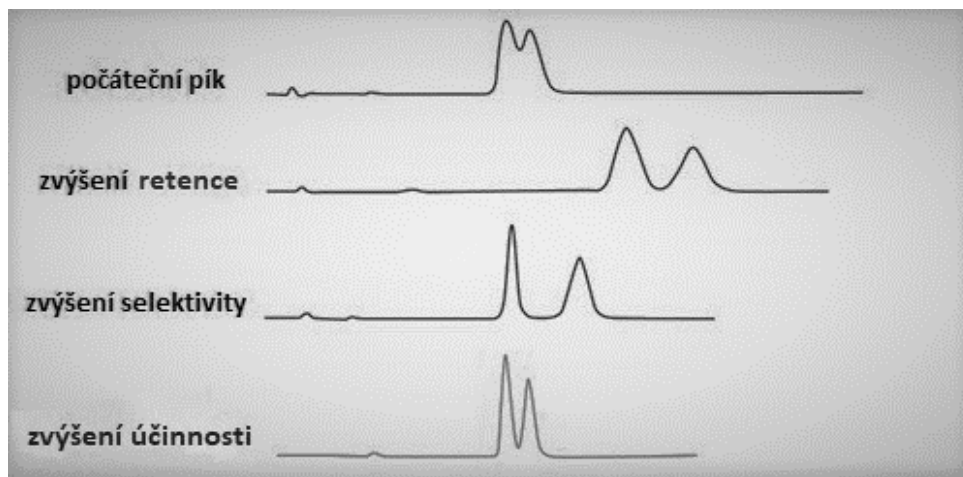
Účinnost separace je též ovlivněna průtokovou rychlostí mobilní fáze v závislosti na velikosti částic stacionární fáze. Tuto závislost znázorňují Van Deemterovy křivky na obrázku 2. Optimální průtoková rychlost je dána minimem křivky. S klesající velikostí částic se křivky stávají ploššími a umožňují tudíž využití většího rozsahu průtokových rychlostí bez ztráty účinnosti. Menší částice umožňují rychlejší analýzy pomocí vyšších průtoků a kratších kolon [3][6][7].



Obrázek 2: Van Deemterovy křivky pro částice o různé velikosti [8].

Rozlišení píků na chromatogramu je dáno 3 základními faktory – účinností, selektivitou a retencí. Pro dostatečné rozdělení dvou píků na základní linii je dáno

minimální rozlišení 1,5. Nejvýznamnějším faktorem je selektivita, kterou lze ovlivnit změnou stacionární fáze, mobilní fáze nebo teploty. Velikost rozlišení významně roste také s rostoucí účinností. Vyššího rozlišení lze do určité míry dosáhnout zvýšením retence analytu. Příliš vysoká retence ovšem vede k nižší citlivosti, širším píkům a delším retenčním časům. Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení je znázorněn na obrázku 3 [2][3][9].



Obrázek 3: Vliv jednotlivých faktorů na rozlišení, upraveno dle [2].

3.1.2 UHPLC instrumentace

Instrumentace UHPLC je vylepšenou verzí HPLC systémů. Základním požadavkem je minimalizace kolonových i mimokolonových příspěvků. Od HPLC se liší odolnou konstrukcí vůči vysokým tlakům, které v systému vznikají v důsledku použití malých částic. Je proto zapotřebí specializovaného chromatografického systému s celou řadou technických úprav. Zejména jsou potřeba čerpadla se schopností čerpat i za vysokých tlaků a automatické dávkovače kompatibilní i s ultravysokými tlaky. Chromatografický systém musí být též přizpůsoben pro provoz v rychlém režimu. V neposlední řadě je potřeba detektor s dostatečnou rychlostí sběru dat [10].

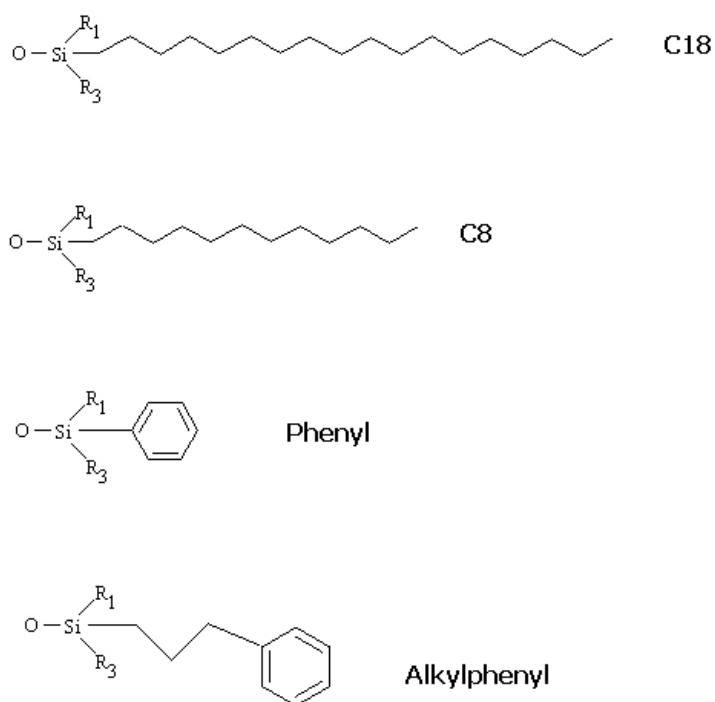
3.1.3. Stacionární fáze v UHPLC

Separace je silně ovlivněna typem stacionární fáze (SF). Kvůli stále rostoucím požadavkům na stacionární fázi jako je rychlost analýzy, rozsah pH, odolnost vůči vysokým teplotám a také vysoká separační účinnost a selektivita, jsou vyráběny stále

nové typy kolon a sorbentů. S rozmachem UHPLC metody vzrostla obliba zejména hybridních stacionárních fází [11].

Silikagelové SF

Silikagel je polární sorbent, který je po navázání ligandů hojně využíván v systému reverzních fází. Struktura silikagelu je tvořena oxidem křemičitým a silanolovými skupinami Si-OH. Pomocí těchto skupin dochází k navázání různých typů ligandů s rozdílnou selektivitou (obrázek 4). Výhodou silikagelu je mechanická odolnost umožňující práci za vysokých tlaků, možnost predikovat retenci analytů a vysoká účinnost kolony. Mezi nevýhody patří chvostování píků bazických látek, omezená teplotní stabilita (do 60 °C) a omezená chemická stabilita (pH v rozmezí 2-7). Nízké pH vede k hydrolyze ligandu, při vysokém pH dochází k rozpouštění silikagelu [12][13][14].



Obrázek 4: Příklady ligandů silikagelových stacionárních fází v systému RP [14].

HSS (High Strength Silica) částice jsou speciální silikagelové částice firmy Waters s vysokou pevností tvořené pouze oxidem křemičitým a vázaným ligandem. Pro UHPLC separaci jsou dostupné ve velikosti 1,8 μm. Oxid křemičitý odolává kyselé hydrolyze a poskytuje extrémně dlouhou životnost i ve velmi kyselém prostředí [15].

Polymerní SF

Polymerní stacionární fáze bývají v systému reverzních fází tvořeny nejčastěji polystyrendivinylbenzenem, dále také metakryláty či polyvinylalkoholem. Výhodou polymerních fází ve srovnání se silikagelovými je široký pracovní rozsah pH (1-14) a stabilita i za vysokých teplot. Také na nich nedochází k iontovým interakcím. Nevýhodou je omezený pracovní tlak (do 20 MPa) a hlavně nižší účinnost kolon [12][13].

Stacionární fáze na bázi oxidu zirkoničitého

Oxid zirkoničitý ve formě porézních sférických částic má spoustu výhod. Kolony jsou mechanicky odolné a jejich účinnost je podobná silikagelovým stacionárním fázím. Na rozdíl od silikagelu navíc vykazují vysokou teplotní stabilitu (až do 200 °C) i chemickou stabilitu (pH 1-14). Kolony na bázi oxidu zirkoničitého mohou být využívány i za extrémních podmínek a mají dlouhou životnost, čímž se snižuje i cena za analýzu [13][16].

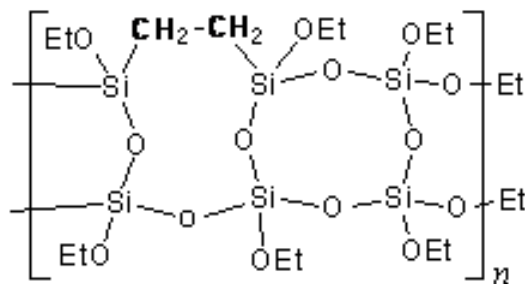
Stacionární fáze na bázi porézního grafitového uhlíku

Jedná se o vysoce inertní materiál tvořený grafitovými proužky s velmi odlišnou selektivitou ve srovnání se silikagelovými stacionárními fázemi. Kolony jsou termálně stabilní až do teploty 200 °C a chemicky stabilní v celém rozsahu pH. Při separacích často dochází k výskytu chvostujících píků. Kolony lze využít pro separaci chirálních látek. Změnou pH mobilní fáze je možné měnit retenci bazických látek [13][16].

Hybridní částice

První generací hybridních částic byla technologie, která využívala organicko-anorganické částice kombinující výhodné vlastnosti silikagelových a polymerních sorbentů. Kombinací obou sorbentů vznikly částice s optimálními vlastnostmi [12].

Druhou generací jsou BEH částice (Ethylene Bridged Hybrid). Liší se inkorporací ethylenových můstků do silikagelu, což vedlo k výrazně lepší účinnosti, mechanické pevnosti a širšímu rozsahu pH (1-12). Struktura je znázorněna na obrázku 6 [3].



Obrázek 6: Struktura BEH částic, upraveno dle [12].

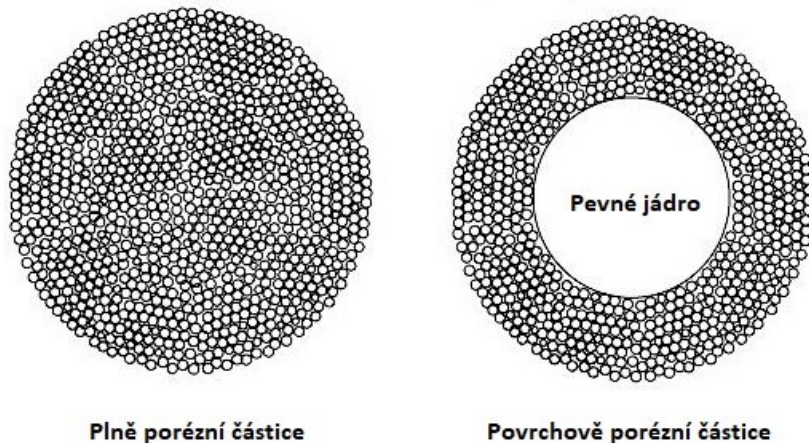
CSH částice (Charged Surface Hybrid) vycházejí z klasických BEH částic a jsou třetí generací hybridních kolon. Jde o povrchově nabitě částice připravované aplikací látek s nábojem na povrch BEH částic. Mezi výhody patří rychlá ekvilibrace kolony po změně pH mobilní fáze a vynikající stabilita při nízkém i vysokém pH. Technologie CSH je znázorněna na obrázku 7 [16][17].



Obrázek 7: CSH technologie, upraveno dle [18].

Povrchově porézní částice

Povrchově porézní částice (tzv. core-shell částice) jsou tvořené pevným jádrem ze silikagelu a tenkou vrstvou homogenního porézního obalu. Oproti plně porézním částicím je výhodou minimální difúze, nižší zpětný tlak a vyšší účinnost kolony [3].



Obrázek 5: Povrchově porézní a plně porézní částice, upraveno dle [19].

Kolony použité v této diplomové práci jsou shrnuty v tabulce 1 včetně uvedení jejich základních vlastností. Největší počet stacionárních fází bylo použito od firmy Waters.

Tabulka 1: Vlastnosti použitých stacionárních fází [20][21][22][23][24][25][26].

Kolona	ACE Excel C18	BEH C18	CSH C18	Arion Plus C18	Ascentis Express C18	Atlantis Premier BEH C18 AX
Velikost částic	1,7 µm	1,7 µm	1,7 µm	1,7 µm	2,7 µm	1,7 µm
Ligand	C18	C18	C18	C18	C18	C18
Maximální tlak	1000	1240 bar	1240 bar	-	600 bar	1240 bar
Maximální teplota	-	80 °C	80 °C	100 °C	60 °C	60 °C
Rozsah pH	2-8	1-12	1-11	1-10	2-9	max. 10
Výrobce	ACE	Waters	Waters	Arion	Supelco	Waters
Kolona	BEH Shield RP18	Cortecs Shield RP18	Ascentis Express RP-Amide	BEH Phenyl	CSH Phenyl-Hexyl	Kinetex Biphenyl
Velikost a typ částic	1,7 µm	2,7 µm	2,7 µm	1,7 µm	1,7 µm	1,7 µm
Ligand	C18 se zabudovanou karbamátovou skupinou	Karbamátová skupina s navázaným C18	C18 se zabudovanou amidovou skupinou	Fenyl-hexyl	Fenyl-hexyl	Bifenyl
Maximální tlak	1240 bar	1240 bar	-	1240 bar	1240 bar	1 000 bar
Maximální teplota	50 °C	45 °C	60 °C	80 °C	80 °C	60 °C
Rozsah pH	2-11	2-8	2-9	1-12	1-11	1,5-8,5
Výrobce	Waters	Waters	Supelco	Waters	Waters	Phenomenex
Kolona	ACE Excel C18-AR	ACE Excel C18-PFP	CSH Fluoro-Phenyl	Ascentis Express F5	Kinetex PFP	
Velikost a typ částic	1,7 µm	1,7 µm	1,7 µm	2,7 µm	2,6 µm	
Ligand	C18 s navázaným fenylem	C18 s navázaným pentafluorofenylem	Fluoro-fenyl	Pentafluorofenylpropyl	Pentafluorofenyl	
Maximální tlak	1000 bar	1000 bar	1240 bar	-	600 bar	
Maximální teplota	-	-	60 °C	60 °C	60 °C	
Rozsah pH	2-8	2-8	1-8	2-9	1,5-8,5	
Výrobce	ACE	ACE	Waters	Supelco	Phenomenex	

3.1.4 Detekční systémy v UHPLC

Po rozdělení jednotlivých složek směsi na koloně je potřeba detektor, který umožní převedení výsledků separace na elektrický signál. Detektor sleduje změny ve složení MF pomocí chemických nebo fyzikálních veličin [27].

Ideální detektor by měl splňovat několik požadavků:

- být schopný detekovat všechny přítomné komponenty ve vzorku
- mít velmi rychlou odezvu s širokým koncentračním rozmezím
- umožňovat gradientovou eluci
- mít co nejmenší mimokolonový příspěvek
- být vysoce citlivý
- být robustní proti změnám tlaku, teploty a průtoku MF [12][27]

V praxi neexistuje ideální detektor, reálné typy detektorů vyhovují daným požadavkům více či méně. Využívají se například detektory spektrofotometrické, fluorescenční, hmotnostní, refraktometrické nebo elektrochemické [12][27].

V této diplomové práci byl jako detekční systém využit detektor s diodovým polem (PDA). PDA detektor patří do skupiny spektrofotometrických detektorů, které fungují na principu absorpce záření UV a viditelného světla při dané vlnové délce [12][28].

3.2 Fenolické látky

Fenolické látky tvoří významnou skupinu sekundárních metabolitů v rostlinách. Dělí se na polyfenoly a fenolické kyseliny. Látky se vyznačují velkou strukturální rozmanitostí od malých jednoduchých molekul po vysoce polymerizované sloučeniny. Ve struktuře jsou pro ně charakteristické aromatické kruhy a hydroxylové skupiny. V rostlinách se vyskytují v kombinaci s monosacharidy nebo polysacharidy ve formě glykosidů nebo jako deriváty ve formě esterů a methylesterů [29][30][31].

3.2.1 Výskyt a význam fenolických látek

Fenolické látky jsou nejčastěji zastoupenými antioxidanty ve stravě. Vyskytují se ve většině rostlin včetně ovoce a zeleniny. Významnými zdroji je např. kakao, rajčata, brambory, listová tmavě zelená a pestrobarevná zelenina, luštěniny nebo červené víno. Z ovocných zdrojů se jedná především o třešně a citrusové plody [30][31].

Silná spojitost mezi obsahem fenolických látek a antioxidantním účinkem ovoce a zeleniny byla již prokázána mnoha studiemi. Přestože nejde o živiny, příjem těchto látek vede k protektivním účinkům na lidské zdraví. Byl prokázán zpomalený proces stárnutí a snížené riziko zánětu a oxidačního stresu spojené s chronickými onemocněními (kardiovaskulární choroby, ateroskleróza, rakovina, neurologická onemocnění nebo diabetes). Mezi hlavní faktory dodávající fenolickým látkám antioxidantní sílu patří pravděpodobně rozsah konjugace a stupeň hydroxylace molekuly [29][30][32].

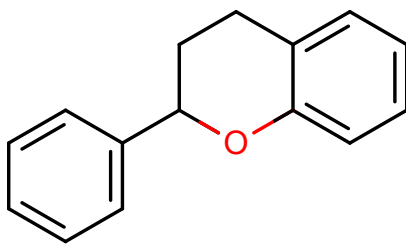
V rostlinách hrají fenolické látky roli v ochraně proti hmyzu, jsou nezbytné pro buněčný metabolismus, ovlivňují vůni, barvu a chuť rostlin, strukturu, opylování a rozmnožování rostlin. Vznikají dvěma metabolickými cestami, a to šikimátovou dráhou a dráhou kyseliny octové. Kombinací obou cest dochází k syntéze flavonoidů [31].

3.2.2 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny jsou jednoduché molekuly s hydroxylovými skupinami řazené zejména mezi deriváty kyseliny benzoové a kyseliny skořicové. První skupina zahrnuje např. kyselinu gentisovou, p-hydrobenzoovou nebo salicylovou. Mezi deriváty kyseliny skořicové patří kyselina kávová a ferulová. Stejně jako ostatní fenolické látky jsou fenolické kyseliny esenciální a musí být člověkem přijímány formou rostlinné stravy. [33]

3.2.3 Flavonoidy

Jednou z významných skupin polyfenolů jsou flavonoidy zahrnující více než 4 000 struktur. Základní strukturu tvoří flavan (obrázek 8). Dle modifikace jádra hydroxy a ketoskupinami se flavonoidy dělí do 9 základních skupin, a to na flavony, flavanony, flavonoly, dihydroflavonoly, flavanoly, flavandioly, chalkony, aurony a antokyany. Dále sem lze zařadit isoflavonoidy, biflavonoidy a flavonoidní glykosidy [34].



Obrázek 8: Flavan - základní struktura flavonoidů [35].

Flavonoidy jsou označovány za vysoce účinné rostlinné antioxidanty. Jejich antioxidační aktivita je dána vychytáváním volných radikálů, reaktivních forem kyslíku a chelatací kovů. Jsou běžnou součástí lidské stravy. Jejich biodostupnost se však může výrazně lišit v závislosti na zdroji. Například bylo prokázáno, že absorpce kvercetinu z cibule je čtyřikrát vyšší než absorpce z čaje či jablka [36].

Dalšími významnými vlastnostmi flavonoidů jsou antivirové, antialergické, protizánětlivé, antikarcinogenní, hepatoprotektivní, kardioprotektivní, antidiabetické nebo gastroprotektivní účinky [37][38][39].

Chemoprotektivní vlastnosti

Antikarcinogenní účinky jsou vysvětlovány schopností flavonoidů inhibovat buněčný cyklus, proliferaci a oxidační stres, indukovat detoxikační enzymy, apoptózu a také aktivovat imunitní systém [36].

Prevence srdečních onemocnění

Příjem flavonoidů ve stravě vede k nižšímu riziku srdečních chorob. Je to pravděpodobně způsobeno jejich schopností zpomalovat oxidaci lipoproteinů na aterogenní formu. Na výsledný efekt má rovněž vliv antiagreační a vasodilatační účinek flavonoidů. Rozdíly v příjmu flavonoidů ve stravě v různých zemích mohou částečně vysvětlit rozdílnou úmrtnost na ischemickou chorobu srdeční napříč zeměmi [36].

Antialergické účinky

Za jeden z faktorů zodpovědných za nárůst alergických onemocnění v posledních letech je považována změna stravy. Dle nedávných výzkumů je nízký výskyt astmatu

pozorován u populací s vysokým příjmem flavonoidů. Flavonoidy zabraňují alergiím nejspíše inhibicí uvolňování histaminu, syntézy IL-4 a IL-13 a expresi CD40 ligandu [38].

Prevence neurodegenerativních onemocnění

Účinek flavonoidů je také spojován s prevencí onemocnění jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba. Flavonoidy mohou ovlivnit kognitivní funkce pravděpodobně ochranou neuronů, regenerací a podporou jejich funkce. Bylo prokázáno, že na rozvoji těchto onemocnění se podílejí reaktivní formy kyslíku a dusíku, čemuž flavonoidy zabraňují svými antioxidačními účinky [39].

Flavonoidy vykazují mnoho ochranných účinků na lidské tělo. Ukazuje se však, že účinky in vitro jsou silnější než in vivo. Mechanismy těchto účinků navíc nejsou stále zcela objasněny. K potvrzení pozitivních účinků na lidské zdraví jsou proto potřeba další studie [39].

3.2.4 Metabolismus kvercetinu

Tato práce se zabývá kvercetinem a jeho metabolity. Kvercetin patřící do skupiny flavonolů se do gastrointestinálního traktu dostává nejčastěji ve formě glykosidů. Jednou z těchto glykosidických forem je rutin. Rutin se skládá z kvercetinu, na jehož hydroxyskupinu v poloze 3 je navázána cukerná složka (glukóza a rhamnóza). Tato cukerná složka ovšem znemožňuje průchod molekuly střešní stěnou. Prvním krokem metabolismu flavonoidních glykosidů je tedy hydrolýza pomocí enzymů. K hydrolýze na volné aglykony může docházet pomocí enzymů v buňkách tenkého střeva (β -glukosidázy) nebo mikroflóry v tlustém střevě (α -rhamnosidázy). Hydrolýza může také proběhnout již v samotné potravíně nebo během jejího zpracování [1][40].

Volný kvercetin může být ve střevě nebo později v játrech methylován za vzniku isorhamnetinu jeho izomeru tamarixetinu. Kromě methylace může dojít také k sulfataci nebo glukuronidaci molekuly, což významně sníží antioxidační aktivitu. V tlustém střevě je kvercetin rozložen bakteriální flórou za vzniku oxidu uhličitého a malých fenolických molekul (např. 4-methylkatecholu, 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny, 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny, homovanilínové kyseliny, floroglucinolu nebo 3-hydroxyfenyloctové kyseliny) [1][41].

3.2.5 Fyzikálně-chemické vlastnosti a struktury látek

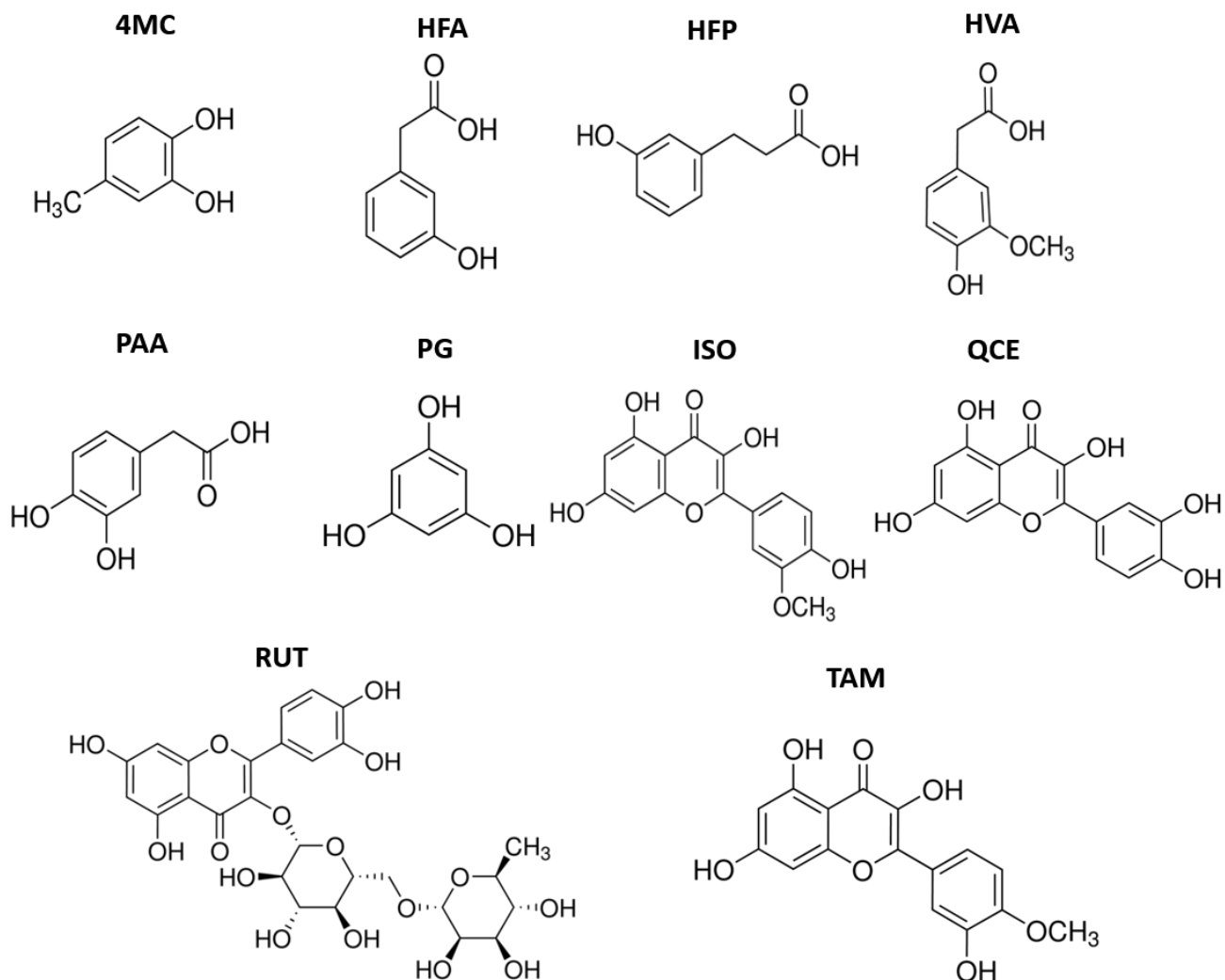
V tabulce 2 je z fyzikálně-chemických vlastností uvedena molární hmotnost (Mh), lipofilita (logP) a acidobazické vlastnosti (pKa) testovaných látek. Dle logP z tabulky vyplývá, že v případě malých fenolických látek s molární hmotností 100-200 g/mol se jedná o látky spíše hydrofilní, v případě isorhamnetinu, tamarixetinu a kvercetinů již o látky lipofilnějšího charakteru. Rutin se díky přítomnosti cukerné složky v molekule stává velmi hydrofilní sloučeninou.

pKa standardů se pohybuje v rozmezí 4,0 až 9,91. Všechny látky jsou tudíž spíše kyselé povahy. Čtyři z deseti látek jsou slabšími kyselinami (pKa kolem 4). U dalších látek s pKa kolem 6 se již jedná o velmi slabé kyseliny. Floroglucinol a 4-methylkatechol s pKa kolem 9 vykazují mírně kyselý charakter. Směs tudíž zahrnuje látky kyselé, mírně kyselé až látky téměř neutrální.

Tabulka 2: Fyzikálně-chemické vlastnosti standardů [35][42][43][44].

Zkratka	Standard	Sumární vzorec	Mh [g/mol]	LogP	pKa
4MC	4-methylkatechol	C ₇ H ₈ O ₂	124,14	1,37	9,91
HFA	Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová	C ₈ H ₈ O ₃	152,15	0,85	4,0
HFP	Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová	C ₉ H ₁₀ O ₃	166,17	1,75	4,68
HVA	Kyselina homovanilinová	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,17	0,33	4,39
ISO	Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,26	2,3	6,31
PAA	Kyselina 3-hydroxyfenyloctová	C ₈ H ₈ O ₄	168,15	0,98	4,25
PG	Floroglucinol	C ₆ H ₆ O ₃	126,11	0,16	9,06
QCE	Kvercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,2	2,16	6,31
RUT	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,50	- 0,87	6,17
TAM	Tamarixetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,26	2,3	6,31

Jednotlivé struktury analyzovaných látek jsou znázorněny na obrázku 9. Nacházejí se zde fenolické kyseliny s malou molární hmotností (4MC, HFA, HFP, HVA, PG, PAA) a také složitější molekuly typu flavonoidů s vyšší lipofilitou (ISO, TAM, QCE). Cukerná složka přítomná v molekule rutinu zásadně ovlivní fyzikálně-chemické vlastnosti, zejména lipofilitu.



Obrázek 9: Struktura analyzovaných fenolických látek, upraveno dle [42].

3.2.6 Publikované metody zabývající se analýzou fenolických látek

V tabulce 3 jsou uvedeny metody s využitím HPLC nebo UHPLC ve spojení s UV nebo PDA (detektor s diodovým polem) detekcí publikované v průběhu posledních deseti let. Jednoznačně nejčastěji zkoumanou látkou byl kvercetin, který byl analyzován ve 14 uvedených metodách. Některé látky nebyly naopak analyzovány v žádné z publikovaných studií (4MC, HFA, HFP). Žádná z metod navíc nezahrnovala analýzu více než 3 látek analyzovaných v této práci. Ve srovnání s HPLC byla UHPLC nalezena pouze v jedné metodě. Ze stacionárních fází byly nejčastěji využívány kolony s C18 řetězcem a rozměrem 250 mm x 4,6 mm x 5 μm. Organickou složkou mobilní fáze byl nejčastěji methanol či acetonitril. Vodnou složku tvořila nejčastěji kyselina fosforečná nebo kyselina octová v různých koncentracích. Z detektorů byla hojně využívána UV i PDA detekce. Vlnová délka detekce se pohybovala v rozmezí od 220 do 450 nm. Doba analýzy trvala 9 až 75 minut.

Tabulka 3: Publikované metody zabývající se analýzou fenolických látek pomocí UHPLC ve spojení s UV či PDA.

Analyt	Technika	Analytická kolona	Mobilní fáze	Detekce	Doba analýzy [min]	Rok Zdroj
HVA	HPLC	Waters XBridge C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A: MeOH (methanol) B: Vodný roztok kyseliny octové (15:85)	UV 280 nm	40	2012 [45]
QCE	HPLC	C18 (250 × 4,6 mm, 10 μm)	A: MeOH B: Kyselina fosforečná 0,3% (58:42)	UV 370 nm	20	2012 [46]
QCE	HPLC	Symmetry C18 (150 × 4,6 mm)	A: ACN (acetonitril) B: Kyselina fosforečná 0,02%	UV 254 nm	40	2015 [47]
RUT	UHPLC	UPLC HSS T3 (100 × 2,1 mm, 1,8 μm)	A: MeOH B: Kyselina mravenčí 0,1%	PDA	13	2012 [48]
QCE, ISO, TAM	HPLC	Ascentis C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A: ACN B: Kyselina mravenčí 0,1%	UV/PDA 370 nm	75	2014 [49]
PG	HPLC	Dionex Acclaim 120 C18 (250 × 4,6 mm)	A: ACN B: voda (10:90)	PDA 220 nm	-	2016 [50]
QCE, ISO	HPLC	Waters C18 (150 × 4,6 mm, 5 μm)	A: ACN B: Dihydrofosforečnan sodný 0,02 mol/l (35:65)	UV 360 nm	12	2010 [51]
QCE, RUT	HPLC	C18 Ascentis Express (150 × 4,6 mm, 2,7 μm)	A: Kyselina ortho-fosforečná 0,5% B: ACN C: Tetrahydrofuran	PDA 350 nm	37	2020 [52]
QCE	HPLC	Merck Purospher® STAR Shield RP 18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A: MeOH B: Kyselina fosforečná 0,1%	PDA 360 nm	55	2017 [53]
QCE	HPLC	TC-C(18) (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A: MeOH B: Kyselina fosforečná 0,2% (65:35)	UV 360 nm	9	2011 [54]

Analyt	Technika	Analytická kolona	Mobilní fáze	Detekce	Doba analýzy [min]	Rok Zdroj
QCE	HPLC	Hypersil gold C-18 (150 × 4,6 mm, 5 μm)	A: ACN B: Ledová kyselina octová 2%	PDA 346 nm	12	2020 [55]
QCE, ISO	HPLC	TSK-gel ODS-80Ts (150 × 4,6 mm)	A: ACN B: Kyselina fosforečná 0,5%	UV 370 nm	24	2011 [56]
RUT	HPLC	MC RP C30 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A: MeOH B: Methyl-terc-butyl ether	PDA 450 nm	48	2018 [57]
QCE, ISO	HPLC	Waters C18 (250 × 4,6 mm)	A: Kyselina fosforečná 1,5% B: Kyselina fosforečná 1,5% + ACN 25% + Kyselina octová 20%	UV/VIS 350 nm	40	2013 [58]
QCE, ISO, TAM	HPLC	Waters Spherisorb S3 ODS-2 C8 (150 × 4,6 mm, 3 μm)	A: Kyselina octová 2,5% B: Kyselina octová + ACN (10:90) C: ACN	370 nm	55	2010 [59]
PAA	HPLC	RP Diamonsil C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A: MeOH B: Kyselina trifluoroctová 0,1%	UV/VIS	18	2019 [60]
PAA, QCE	HPLC	Purospher RP-18e (250 × 4 mm, 5 μm)	A: MeOH + Kyselina octová 1,5% (1:4) B: MeOH	PDA 254 nm	-	2018 [61]
PAA, RUT, QCE	HPLC	Purospher RP-18e (250 × 4 mm, 5 μm)	A: MeOH + Kyselina octová 1,5% (1:4) B: MeOH	PDA 254 nm	65	2017 [62]
ISO, QCE	HPLC	Waters X-Bridge C18 RP (250 × 4,6 mm, 5 μm)	A: Kyselina fosforečná B: Metylalkohol (52:48)	PDA 360 nm	-	2017 [63]
HVA	HPLC	Aqua C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm)	0,1% Kyselina trifluoroctová v MeOH/voda (55:45)	UV 255 nm	10	[64]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a pomůcky

- Chromatografický systém ACQUITY UPLC, Binary solvent manager, Sample manager, Column manager, PDA detector, Waters, USA
- Analytické váhy, Sartorius, Německo
- Automatické mikropipety se špičkami, Eppendorf, Česká republika
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Digitec, Bandelin electronic, Německo
- Skleněné šroubovací vialky s uzávěry, Vitrum, Česká republika
- Třepačka Ika Vortex, Sigma-Aldrich, Česká republika
- Software Empower, Waters, USA

4.2 Chemikálie

Pro přípravu standardních roztoků, pracovních roztoků, směsného roztoku, mobilních fází a oplachových kapalin byly použity tyto chemikálie:

- Kyselina mravenčí, 98 % - 100 %, for LC-MS, Lichropur™, Německo
- Kyselina octová 100 %, for LC-MS, Lichropur™, Německo
- Methanol RS – For LC/MS, Carlo Erba Reagents s.a.s., Španělsko
- Methanol – for HPLC – ULTRA LC-MS, VWR Chemicals BDH, USA
- Acetonitril RS – For LC/MS Carlo Erba Reagents s.a.s., Španělsko
- Ultračistá voda, destilovaná v přístroji Milli Q RG, Millipore, USA

4.3 Standardní látky

- 4-methylkatechol ≥ 95 %, Sigma-Aldrich, Česká republika
- Floroglucinol $\geq 99,0$ % (HPLC) Sigma-Aldrich, Česká republika
- Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Česká republika
- Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová ≥ 98 %, Sigma-Aldrich, Česká republika
- Kyselina 3-hydroxyfenyloctová ≥ 99 %, Sigma-Aldrich, Česká republika
- Kyselina homovanilínová, ≥ 97 %, Sigma-Aldrich, Česká republika
- Isorhamnetin ≥ 99 % (HPLC) Extrasynthese, Francie
- Kvercetin ≥ 95 % (HPLC) Sigma-Aldrich, Česká republika

- Rutin-hydrát ≥ 95 % (HPLC) Sigma-Aldrich, Česká republika
- Tamarixetin ≥ 99 % (HPLC) Extrasynthese, Francie

4.4 Stacionární fáze

- ACE Excel C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies, Skotsko
- Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Waters, USA
- Acquity UPLC® CSH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Waters, USA
- Arion® Plus C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Chromservis, Česká republika
- Ascentis® Express C18 (2,1 x 100 mm, 2,7 μm), Supelco, USA
- Atlantis™ Premier BEH C18 AX (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Waters, USA
- Acquity UPLC® BEH Shield RP18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Waters, USA
- Cortecs® Shield RP18 (2,1 x 100 mm, 2,7 μm), Waters, USA
- Ascentis® Express RP-Amide (2,1 x 100 mm, 2,7 μm), Supelco, USA
- Acquity UPLC® BEH Phenyl (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Waters, USA
- Acquity UPLC® CSH Phenyl-hexyl (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Waters, USA
- Kinetex® Biphenyl (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Phenomenex, USA
- ACE Excel C18-AR (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies, Skotsko
- ACE Excel C18-PFP (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Advanced Chromatography Technologies, Skotsko
- Acquity UPLC® CSH Fluoro-Phenyl (2,1 x 100 mm, 1,7 μm), Waters, USA
- Ascentis® Express F5 (2,1 x 100 mm, 2,7 μm), Supelco, USA
- Kinetex® PFP (2,1 x 100 mm, 2,6 μm), Phenomenex, USA

4.5 Příprava roztoků

Všechny roztoky byly uchovávány v lednici při teplotě 8 °C.

4.5.1 Zásobní roztoky standardních látek

Z každé standardní látky byl připraven zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml. Pouze v případě isorhamnetinu byla připravena koncentrace 0,1 mg/ml. Roztoky byly

připraveny navážením látky ve vialce v rozmezí 0,9-1,6 mg a rozpuštěním v odpovídajícím objemu 0,1% HCOOH v MeOH. V případě isorhamnetinu byla látka navážena v rozmezí 0,3-0,6 mg a rovněž rozpuštěna v odpovídajícím objemu rozpouštědla. V případě potřeby bylo rozpouštění podpořeno ultrazvukem.

4.5.2 Pracovní roztoky

Pracovní roztoky byly připraveny ze zásobních roztoků odebráním 10 µl do nové vialky a naředěním 0,1% HCOOH ve vodě do 1 ml. Výjimku tvořily zásobní roztoky isorhamnetinu a kvercetinu. Pro jejich naředění bylo odebráno 75 µl zásobního roztoku isorhamnetinu nebo 10 µl zásobního roztoku kvercetinu a oba byly doplněny 0,1% HCOOH v MeOH do 1 ml.

4.5.3 Směsný roztok

Směsný roztok byl připraven ve vialce napipetováním všech 10 zásobních roztoků a doplněn 1,2 ml 0,1% HCOOH ve vodě. Objemy jednotlivých zásobních roztoků jsou znázorněny v tabulce 4. Objemy jednotlivých zásobních roztoků byly stanoveny tak, aby látky poskytovaly přiměřenou odezvu.

Tabulka 4: Objemy zásobních roztoků pro přípravu směsného roztoku.

Standard	V [µl]
4MC	15
HFA	15
HFP	22,5
HVA	15
ISO	150
PAA	15
PG	30
QCE	7,5
RUT	15
TAM	15

4.5.4 Mobilní fáze a oplachové kapaliny

Jako vodné složky mobilních fází byly použity 0,1% HCOOH a 0,1% CH₃COOH. Jako organické složky mobilních fází byly použity ACN, MeOH a ACN:MeOH (1:1). K oplachu

píšťů a jako slabá oplachová kapalina byl použit 10% MeOH. Jako silná oplachová kapalina byl použit ACN.

- **0,1% roztoky kyselin** byly připraveny napipetováním 0,5 ml koncentrovaných kyselin do odměrných baněk s vodou o objemu 500 ml a následně byly vodou doplněny po rysku.
- **10% MeOH** (oplachová kapalina) byl připraven nalitím 100 ml MeOH do zásobní lahve a následně doplněn vodou do objemu 1 l.
- **ACN:MeOH (1:1)** byl připraven smísením 500 ml ACN s 500 ml MeOH. Objemy byly odměřeny v odměrném válci.

4.5.5 Ředící roztoky

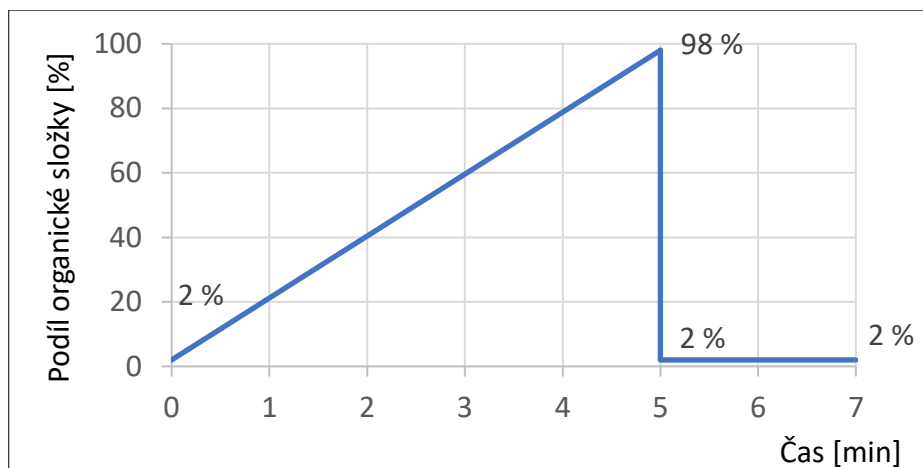
Ředící roztoky byly použity pro přípravu zásobních a pracovních roztoků.

- **0,1% HCOOH ve vodě** byla připravena napipetováním 0,1 ml koncentrované HCOOH do odměrné baňky s vodou o objemu 100 ml, která byla následně doplněna vodou po rysku.
- **0,1% HCOOH v MeOH** byla připravena napipetováním 0,1 ml koncentrované HCOOH do odměrné baňky s methanolem o objemu 100 ml, která byla následně doplněna methanolem po rysku.

4.6 Studie podmínek separace

4.6.1 Výchozí chromatografické podmínky

V první fázi byl proveden screening 17 stacionárních fází. Pro screening kolon bylo použito 6 mobilních fází. Provedena byla gradientová eluce dle programu, který je zobrazen na obrázku 10.



Obrázek 10: Průběh gradientové eluce, 2-98 % organické složky.

Všechny kolony byly na závěr promyty acetonitrilem, ve kterém byly uchovávány.

Průtok:	0,4 ml/min
Teplota na koloně:	40 °C
Teplota v autosampleru:	15 °C
Nástřikový objem:	5 µl
Počáteční ekvilibrace kolony:	10 min
Doba analýzy:	5 min (+2 min ekvilibrace)

4.6.2 Optimalizace chromatografických podmínek

V druhé fázi studie byla provedena optimalizace podmínek na 3 vybraných kolonách. Kolony byly vybrány na základě tvaru a počtu separovaných píků. Ze 17 testovaných SF byly pro optimalizaci vybrány kolony Ascentis Express RP-Amide, Kinetex Biphenyl a ACE Excel C18–PPF. Optimalizace podmínek na jednotlivých kolonách byla provedena se dvěma MF (ACN s 0,1% HCOOH a MeOH s 0,1% HCOOH).

V rámci optimalizace byla na těchto kolonách testována změna vždy jednoho parametru. Mezi zkoušené parametry patřil vliv gradientových křivek (křivka 4, 6 a 8), změna složení MF na počátku gradientu (2, 5 a 10 % organické složky) a na konci gradientu (98, 95 a 90 % organické složky), změna teploty na koloně (30, 40 a 50 °C) a změna času analýzy (5 min nebo 7 min s následnou 2minutovou ekvilibrací). V případě

změny teploty separace byla doba počáteční ekvilibrace kolony prodloužena na 30 minut.

4.7 Studie krátkodobé stability

Pro měření byly použity finální podmínky studie (Kinetex Biphenyl, MF 15-98 % během 7 min, organická složka: MeOH, vodná složka: 0,1% HCOOH, doba analýzy 7 min (+2 min ekvilibrace), T 40°C).

K oplachu pístů a jako slabá oplachová kapalina byl použit 10% MeOH. Jako silná oplachová kapalina byl použit ACN.

4.7.1 Zásobní roztoky standardních látek

Zásobní roztoky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.1.

4.7.2 Pracovní roztoky

Pracovní roztoky byly připraveny ze zásobních roztoků (kapitola 4.5.1) odebráním 15 µl do nové vialky a naředěním 0,1% HCOOH ve vodě nebo 0,1% HCOOH v 20% MeOH do 1,5 ml. V případě isorhamnetinu bylo do vialky odebráno 150 µl ze zásobního roztoku a přidáno 150 µl MeOH a 1,2 ml 0,1% HCOOH ve vodě.

4.7.3 Ředící roztoky

K rozpouštění standardů a k ředění jejich zásobních roztoků byla použita 0,1% HCOOH ve vodě a 0,1% HCOOH v MeOH, jejichž příprava je popsána v kapitole 4.5.5. Dále byla použita 0,1% HCOOH v 20% MeOH, která byla připravena smísením 20 ml 0,1% HCOOH v MeOH a 80 ml 0,1% HCOOH ve vodě pomocí odměrného válce.

4.7.4 Postup měření

Stabilita byla měřena po dobu 24 hodin, při třech různých teplotách (10, 15 a 20 °C) a ve dvou různých rozpouštědlech (0,1% HCOOH ve vodě a 0,1% HCOOH ve 20% MeOH). V hodinových intervalech byla sledována změna plochy píku. Provedeny byly vždy 2 nástřiky. Pracovní roztoky byly připravovány bezprostředně před měřením

a vloženy do autosampleru, kde byly přibližně 2 min temperovány na nastavenou teplotu. Teprve poté bylo spuštěno měření.

4.7.5 Srážení roztoků

Po proběhnutí stabilitní zkoušky byly měřené roztoky ve vialkách vizuálně zkontrolovány proti světlu, Bylo zjišťováno, zda při dané teplotě došlo k tvorbě sraženiny či nikoliv.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace chromatografické separace

5.1.1 Screening kolon

Screening kolon byl proveden s využitím výchozích podmínek separace uvedených v kapitole 4.6.1. Na každé koloně bylo provedeno 6 analýz, kdy se měnilo pouze složení mobilní fáze. Většina standardů byla eluována na všech kolonách. Výjimkou byl kvercetin, u kterého nedošlo k eluci na koloně CSH Fluoro-Phenyl.

Cílem screeningu bylo srovnání kolon s různými ligandy, částicemi a výrobci. Pomocí screeningu byly vybrány kolony s nejlepší separací, vhodné pro další optimalizaci podmínek. Míra separace byla hodnocena na základě počtu separovaných píků ve směsi a také podle toho, zda došlo k separaci kritického páru isorhamnetinu a tamarixetinu (tabulka 5). Podle výsledků screeningu byla pro další optimalizaci vybrána kolona Ascentis Express RP-Amide, Kinetex Biphenyl a ACE Excel C18-PFP.

Z použitých mobilních fází byly analyty nejrychleji eluovány s acetonitrilem, který má v systému reverzních fází nejvyšší eluční sílu. Nejdéle naopak eluce trvala při použití methanolu.

Při srovnání vlivu použité kyseliny (0,1% kyselina octová a 0,1% kyselina mravenčí) jako vodné složky mobilní fáze byl u většiny kolon zaznamenán mírný či výraznější vliv, zejména na tvar píku a míru separace analyzovaných látek. V případě kolony Atlantis Premier BEH C18 AX měl typ kyseliny vliv také na pořadí eluovaných píků. Pouze u tří testovaných kolon nebyl zaznamenán žádný rozdíl mezi použitými kyselinami, a to u kolony ACE Excel C18, ACE Excel C18-AR a kolony Ascentis Express RP-Amide.

Kromě kritického páru TAM a ISO se jako další kritické páryjevily HFA a HVA, HFP a 4MC a také HFP a RUT. Se změnou mobilní fáze a stacionární fáze se měnilo i pořadí těchto pěti látek. U kolon, na kterých došlo k oddělení tamarixetinu a isorhamnetinu, se ve většině případech eluoval nejprve TAM a těsně za ním ISO. Výjimku tvořila pouze kolona Kinetex Biphenyl, kde se isorhamnetin eluoval před tamarixetinem. Mezi bezproblémové látky, které se eluovaly na všech kolonách ve stejném pořadí a se samostatným píkem, patřily PG, PAA a QCE.

Tabulka 5: Porovnání testovaných kolon podle počtu separovaných píků.

	ACN			MeOH			ACN/MeOH		
	HCOOH	CH ₃ COOH		HCOOH	CH ₃ COOH		HCOOH	CH ₃ COOH	
ACE Excel C18	7	7	✗	8	8	✗	8	8	✗
BEH C18	7	7	✗	8	8	✗	7,5	8	✗
CSH C18	8	8	✗	8	8	✗	6,5	6	✗
Arion Plus C18	7	7	✗	8	8	✗	7	7	✗
Ascentis Express C18	8	8	✗	8	8	✗	6,5	6,5	✗
Atlantis Premier BEH C18 AX	9	7	✗	9	8	✗	9	8	✗
BEH Shield RP18	8,5	8,5	✗	9	9	✓	8	8	✓
Cortecs Shield RP18	8,5	8,5	✗	9	9	✓	7,5	8	✓
Ascentis Express RP-Amide	10	10	✓	9	9	✓	9,5	9,5	✓
BEH Phenyl	8	8	✗	9	9	✗	6	6	✗
CSH Phenyl-Hexyl	7	7	✗	8,5	8	✗	7	7	✗
Kinetex Biphenyl	8	8	✓	10	10	✓	8,5	8,5	✓
ACE Excel C18-AR	8	8	✗	9	9	✗	7	7	✗
ACE Excel C18-PFP	7,5	8	✗	9,5	9,5	✓	7	7	✗
CSH Fluoro-Phenyl	6,5	5,5	✗	7,5	8	✗	7,5	6,5	✗
Ascentis Express F5	7,5	7,5	✗	9,5	9	✓	7,5	8	✗
Kinetex PFP	7,5	8	✗	9	9	✓	8	8	✗

✗ - separace píků TAM a ISO neproběhla

✓ - separace píků TAM a ISO proběhla

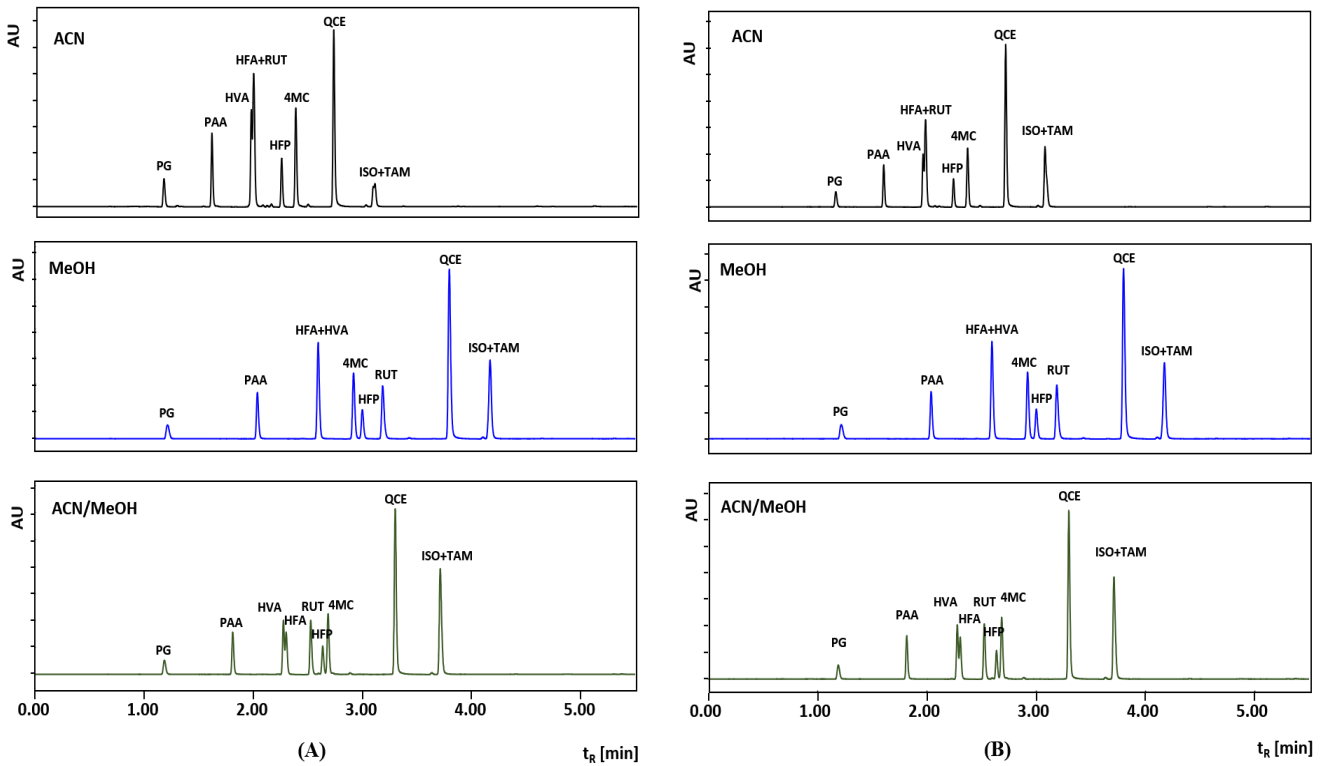
Separace na koloně ACE Excel C18

Na koloně ACE Excel C18 došlo k nejlepší separaci při použití MeOH nebo ACN/MeOH (1:1) jako organické složky mobilní fáze. Při těchto podmínkách bylo shodně separováno 8 píků. Separace TAM a ISO neproběhla za žádných podmínek. Problémem byla také separace HVA+HFA a dále HFA+RUT s ACN. Použitá kyselina neměla žádný vliv na pořadí eluce ani tvar píků (obrázek 11).

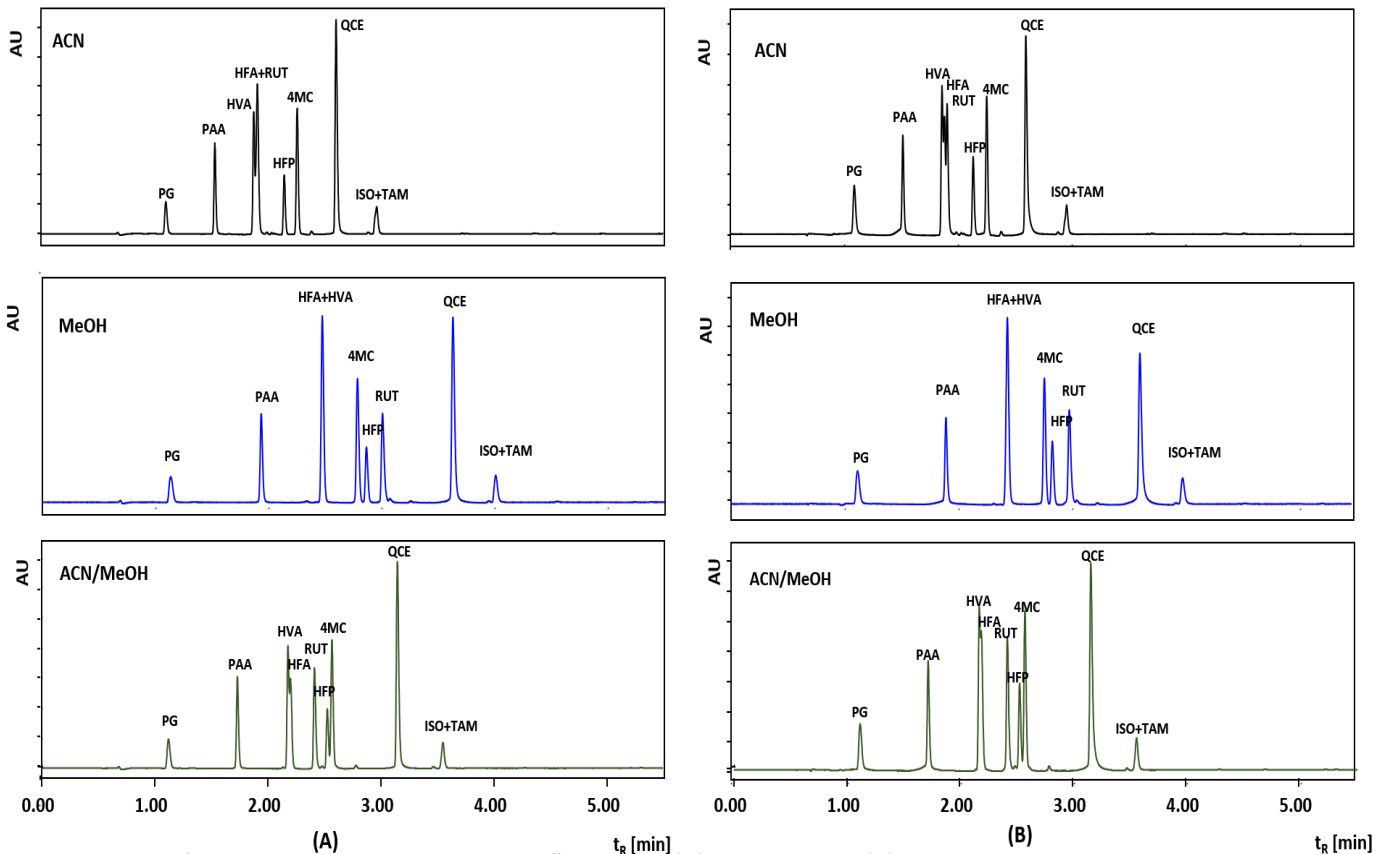
Separace na koloně BEH C18

Na koloně BEH C18 bylo nejlepších výsledků dosaženo při použití MF s MeOH. Při těchto podmínkách bylo separováno s oběma kyselinami shodně 8 píků. Vliv kyseliny se projevil u všech analýz na tvaru píků. Při použití kyseliny octové došlo k mírnému rozmytí píků všech analytů. Rozdíl je znát zejména u PG, PAA, 4MC a QCE. Mezi kritické páry

patřily TAM+ISO a také HVA+HFA, které se nepodařilo při žádné z analýz ani částečně rozdělit. V případě ACN docházelo dokonce ke koeluci HVA+HFA+RUT (obrázek 12).



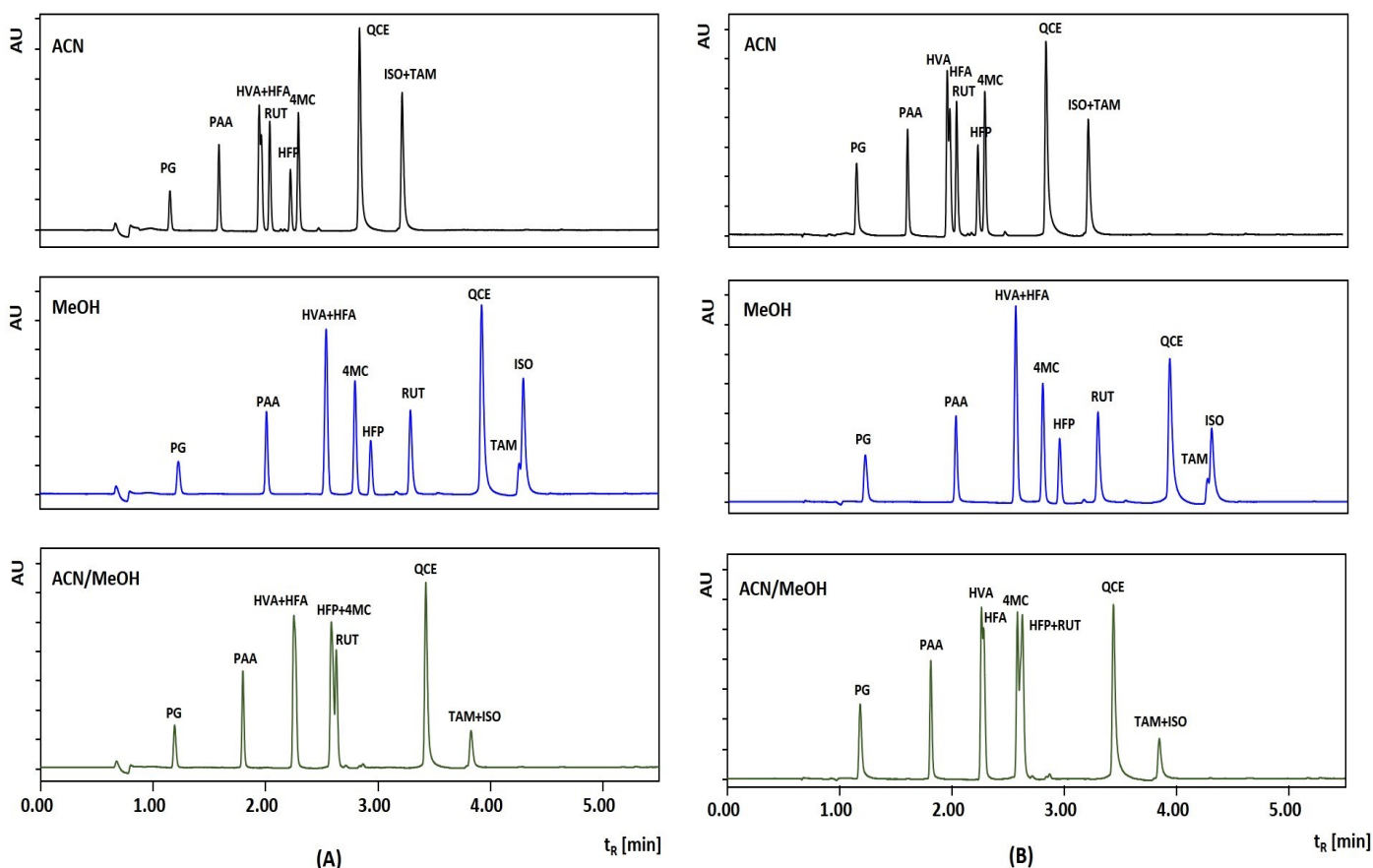
Obrázek 11: UHPLC separace na koloně ACE Excel C18, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.



Obrázek 12: UHPLC separace na koloně BEH C18, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.

Separace na koloně CSH C18

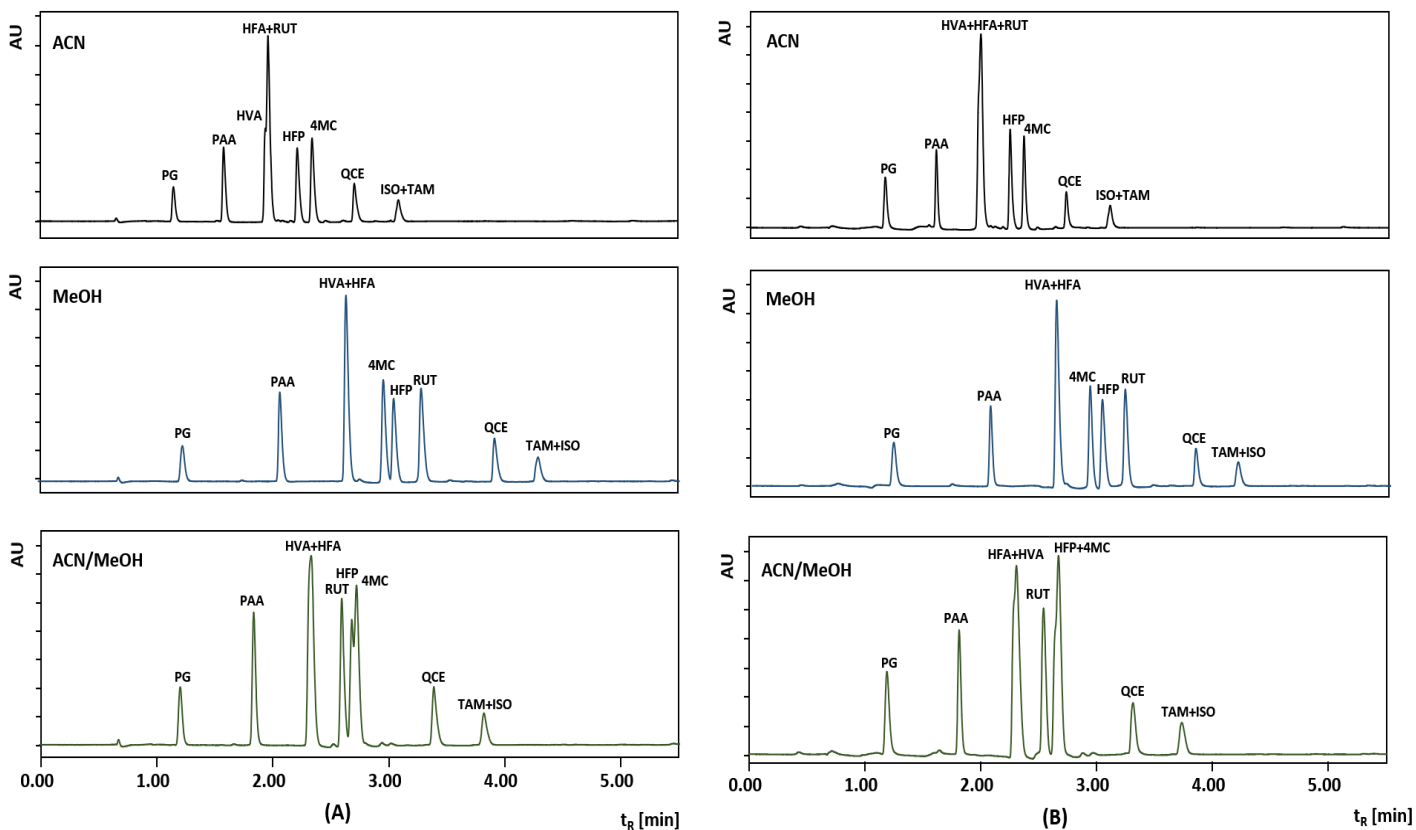
Na této koloně byl nejvhodnější organickou složkou MF methanol. Separováno bylo 8 píků, problémem byla separace kritického páru TAM+ISO a HVA+HFA. K chvostování píků docházelo při všech typech analýz, ovšem při použití kyseliny octové došlo ke zdatelně výraznějšímu chvostování. Chvostování se projevilo u všech látek kromě PG, PAA a HFP. Výrazně chvostující píky se vyskytují v případě QCE a TAM+ISO (obrázek 13). K chvostování píků docházelo v důsledku interakce kyselých ionizovaných skupin fenolických látek s nabitými funkčními skupinami CSH částic kolony.



Obrázek 13: UHPLC separace na koloně CSH C18, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH

Separace na koloně Arion Plus C18

Na koloně Arion Plus C18 byla směs standardů nejlépe separována při použití MeOH. Celkem bylo separováno 8 píků, při použití ostatních mobilních fází bylo separováno pouze 7 píků. I při použití methanolu však nebyl separován kritický pár TAM+ISO a HVA+HFA. Vliv použité kyseliny se na tvaru píku neprojevil (obrázek 14).

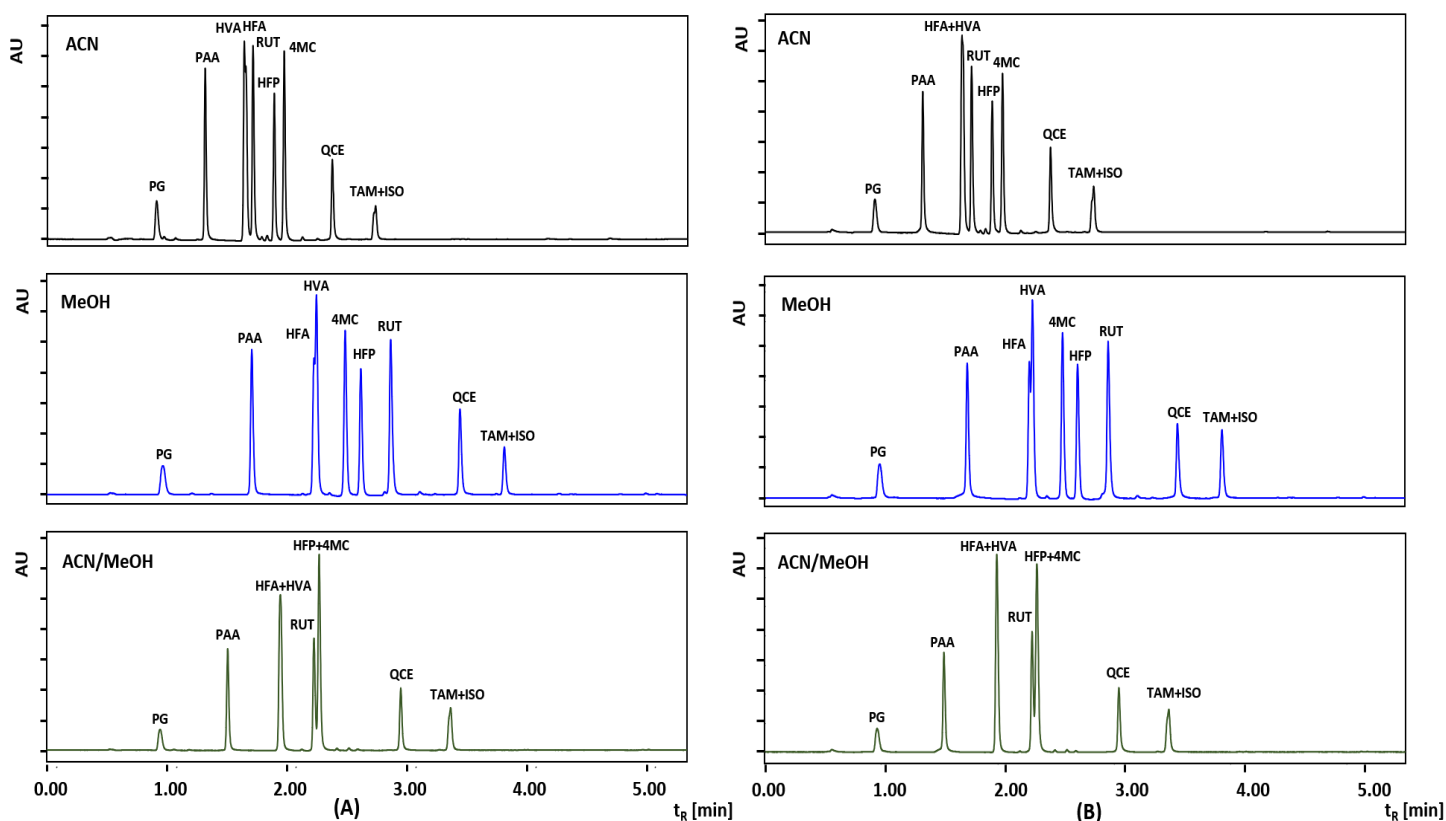


Obrázek 14: UHPLC separace na koloně Arion plus C18, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH

Separace na koloně Ascentis Express C18

Kolona Ascentis Express C18 se ukázala pro další optimalizaci také nevhodná. Kritický pár TAM a ISO se neseperoval při žádné z provedených analýz. Při použití ACN/MeOH (1:1) bylo separováno pouhých 6,5 píku (0,5 píku značí částečnou separaci). Lepší separace dosáhl methanol a acetonitril, u nichž došlo v obou případech k separaci 8 píků. Problémová byla také dvojice HVA a HFA.

Při srovnání ACN s MeOH je lepšího rozlišení u RUT a 4MC dosaženo při použití MeOH. Pík floroglucinolu má naopak lepší tvar při použití ACN. Vlivem kyseliny octové došlo k chvostování píku látek PAA, QCE a TAM+ISO (obrázek 15).



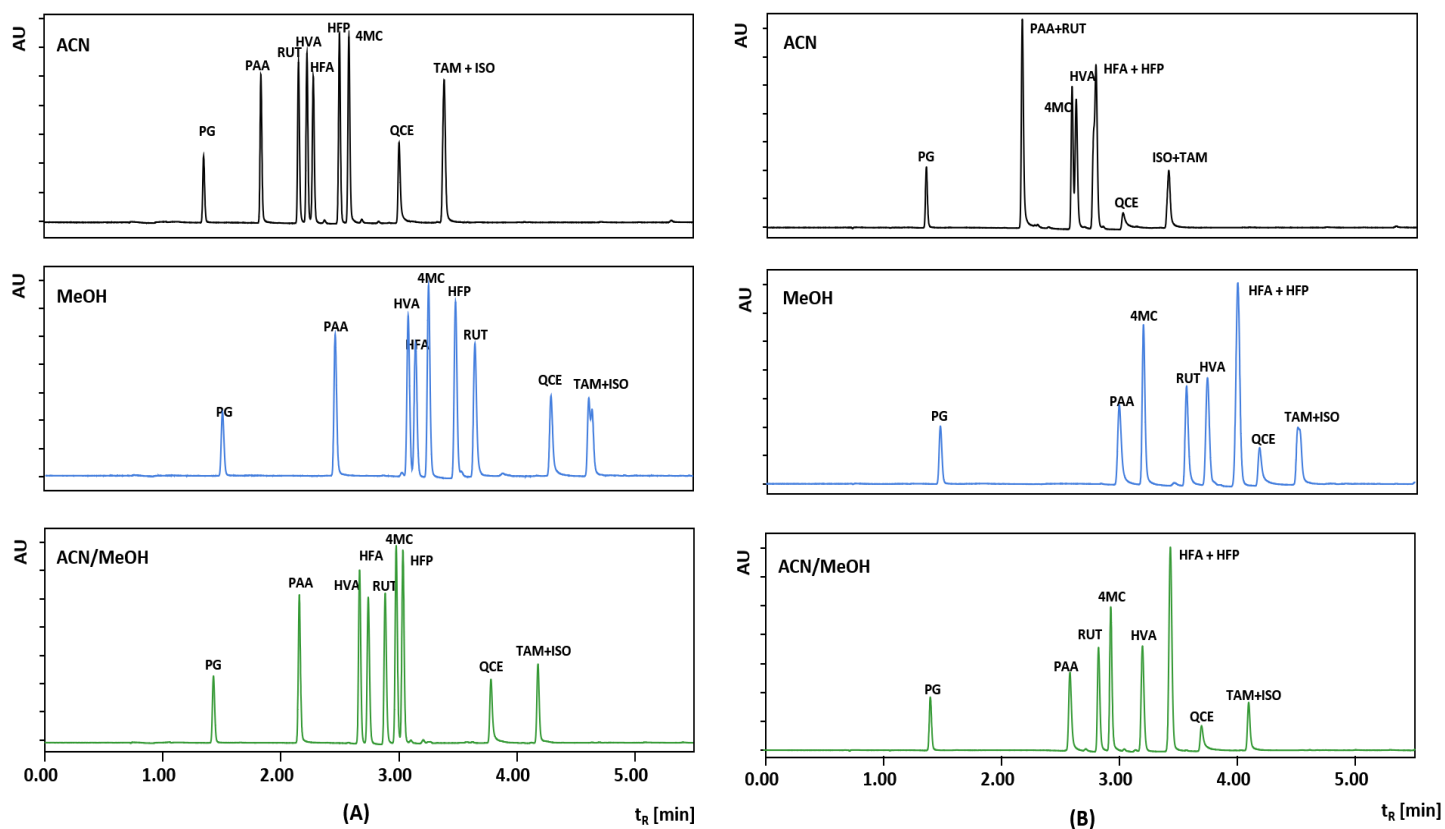
Obrázek 15: UHPLC separace na koloně Ascentis Express C18, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.

Separace na koloně Atlantis Premier BEH C18 AX

V případě kolony Atlantis BEH C18 AX se vliv kyseliny významně projevil na počtu i pořadí separovaných píků. Nejvýznamnější rozdíl je znát u acetonitrilu, kde bylo v případě kyseliny mravenčí separováno píků 9, při použití kyseliny octové docházelo ke koelucím a separováno bylo pouhých 7 píků. Podobný vliv měl typ kyseliny i v případě ostatních rozpouštědel. Důvodem rozdílné separace je menší ionizace fenolických látek při použití silnější kyseliny mravenčí a důsledkem toho dochází k slabším interakcím s kolonou. Naopak vliv typu organické složky rozpouštědla při využití kyseliny mravenčí se na počtu separovaných píků neprojevil. U všech tří organických složek bylo separováno celkem 9 píků. K separaci kritického páru TAM a ISO však nedošlo ani v jednom případě. K chvostování píků docházelo při všech podmínkách kromě ACN s HCOOH. Chvostování se projevilo u většiny látek, výjimkou byl floroglucinol, který poskytoval symetrické píky.

Zajímavá změna separace ve srovnání s ostatními kolonami nastala v případě kyseliny octové a při použití MeOH i v případě kyseliny mravenčí. Rutin se totiž oproti

všem ostatním kolonám eluoval s rychlým retenčním časem, v blízkosti fenolických kyselin (obrázek 16).

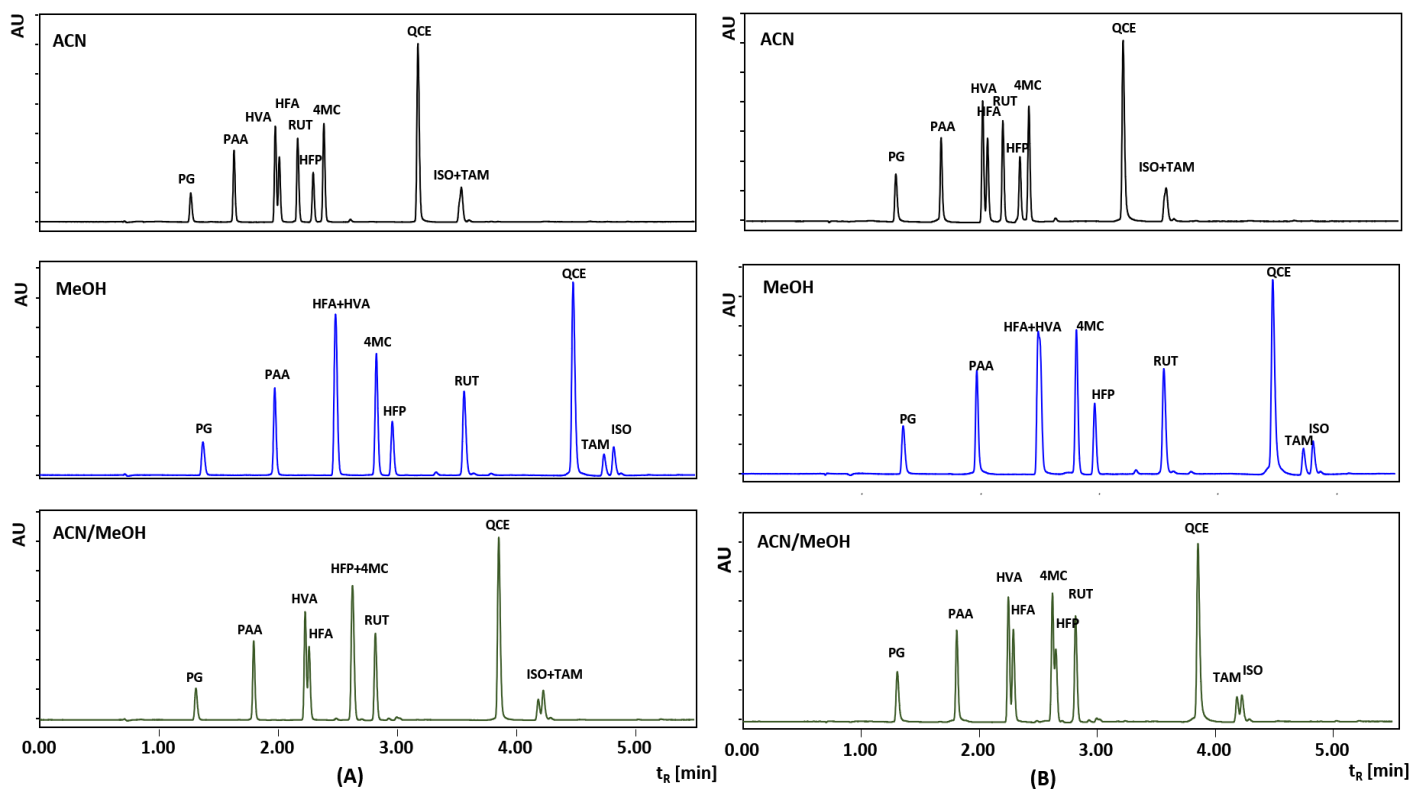


Obrázek 16: UHPLC separace na koloně Atlantis Premier BEH C18 AX, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.

Separace na koloně BEH Shield RP18

Na koloně BEH Shield RP18 závisela separace kritického páru TAM a ISO především na typu MF. Při použití ACN k separaci vůbec nedošlo, s ACN/MeOH (1:1) byla separace částečná a teprve s MeOH proběhla separace páru úplně. Bohužel však při použití MeOH nedošlo k separaci páru HVA a HFA, která byla naopak lepší s ACN a ACN/MeOH (1:1).

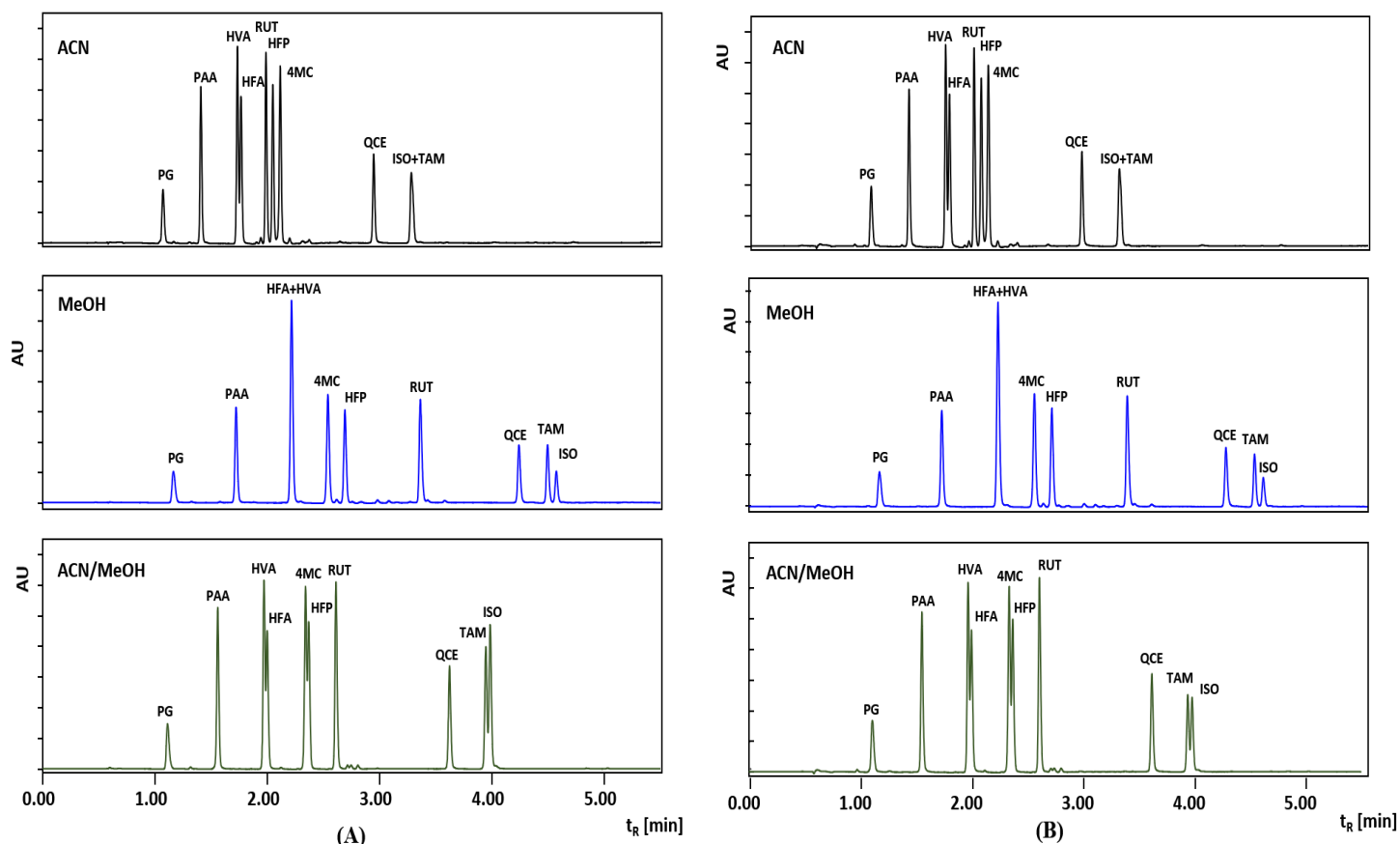
Vliv kyseliny na rozlišení pík se projevil při analýze s ACN/MeOH (1:1) a s MeOH. Kyselina octová zajistila lepší separaci páru HVA+HFA a HFP+4MC. Naopak kyselina mravenčí poskytovala při všech analýzách symetričtější a užší píky (obrázek 17).



Obrázek 17: UHPLC separace na koloně BEH Shield RP18, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH

Separace na koloně Cortecs Shield RP18

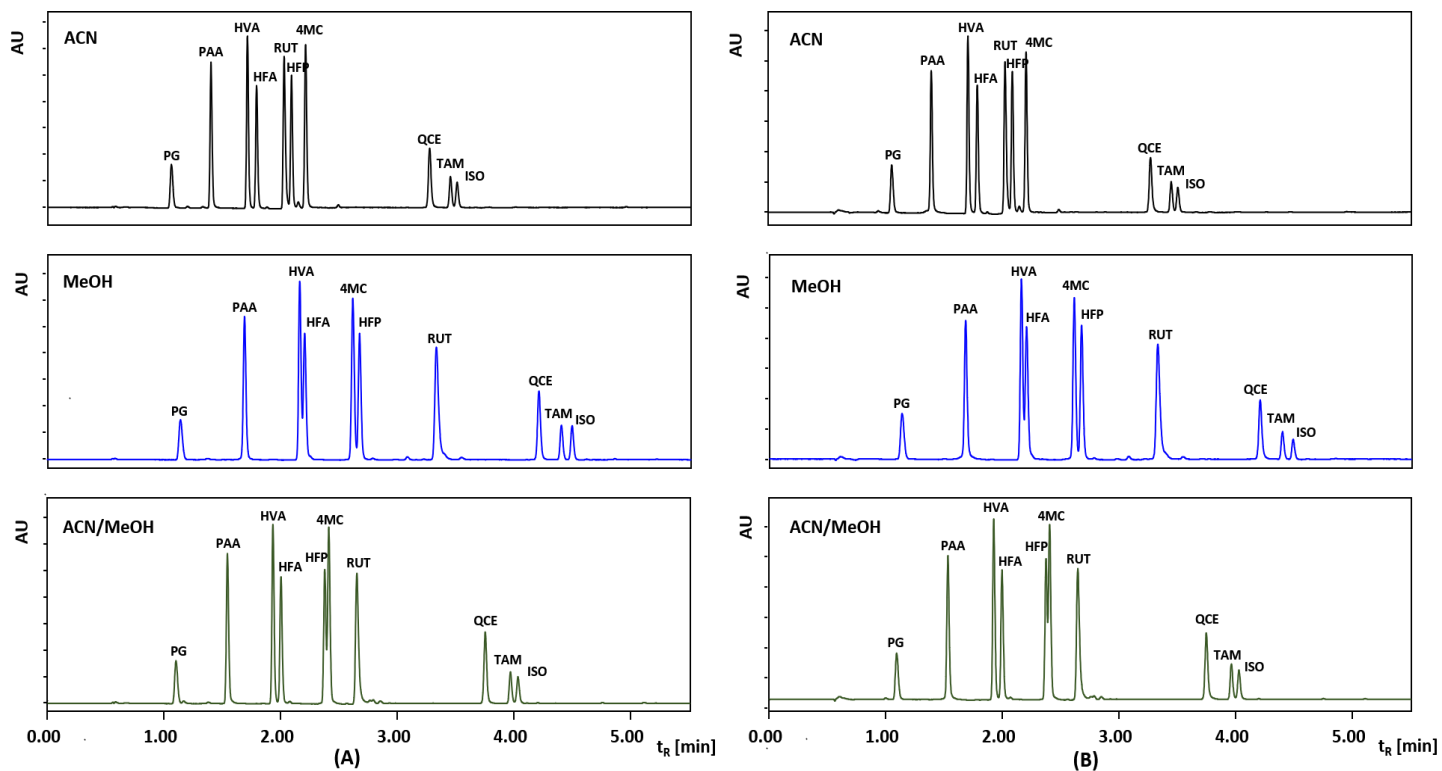
Kolona Cortecs Shield RP18 poskytovala při použití MeOH téměř kompletní separaci směsi. Na koloně bylo separováno 9 píků včetně kritického páru TAM a ISO. Rozdělit se nepodařilo pár HFA a HVA. Při použití jiných mobilních fází však došlo k výraznému poklesu počtu separovaných píků. Vliv použité kyseliny se projevil v případě ACN/MeOH, kdy při použití kyseliny mravenčí došlo k lepší separaci páru TAM a ISO (obrázek 18).



Obrázek 18: UHPLC separace na koloně Cortecs Shield RP18, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.

Separace na koloně Ascentis Express RP-Amide

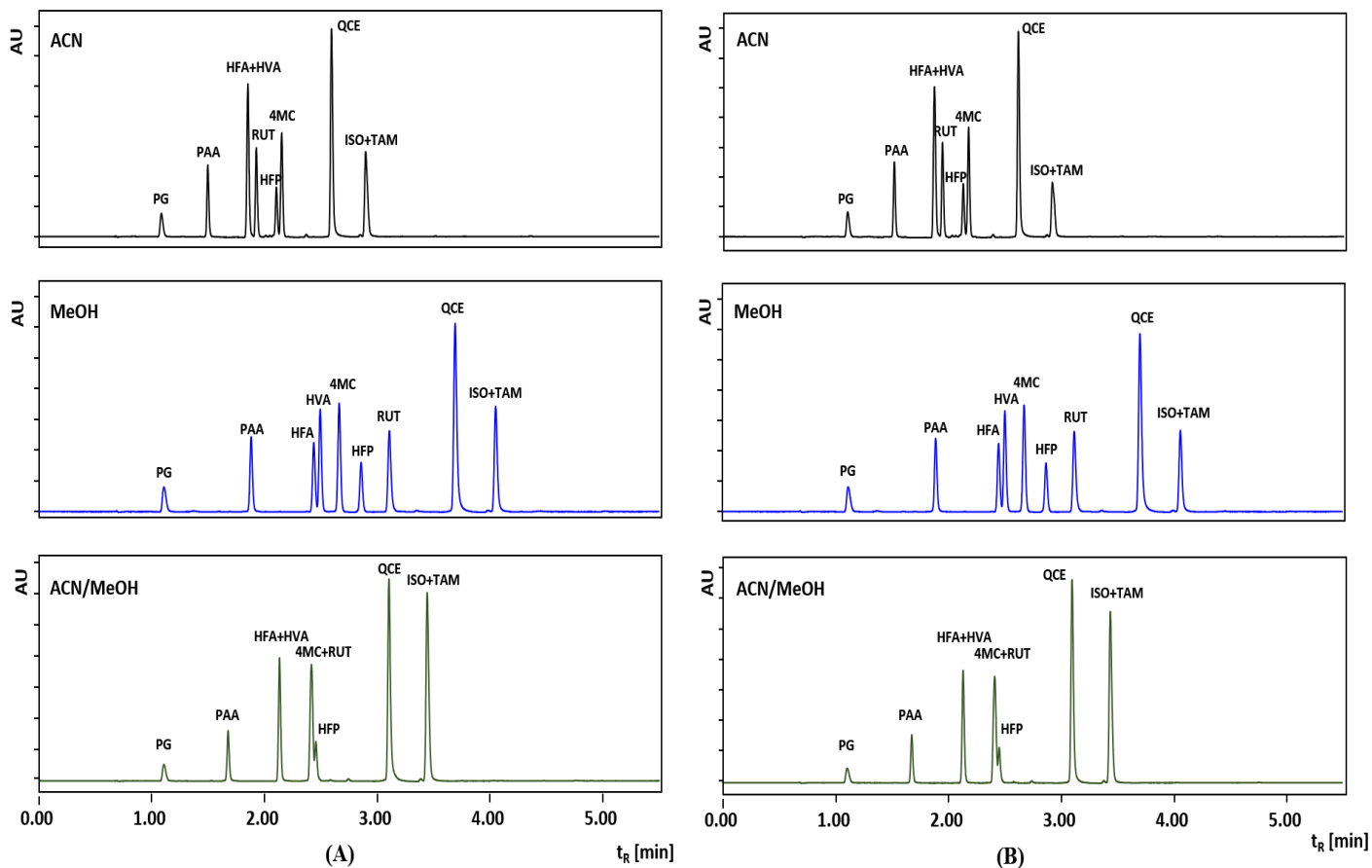
Kolona Ascentis Express RP-Amide byla vybrána pro další optimalizaci jako jedna ze tří nejvhodnější kolon ze všech testovaných stacionárních fází. Nejlepší separace páru TAM a ISO proběhla při použití methanolu. Problémem u methanolu ovšem byly další 2 kritické páry (HFA+HVA a 4MC+HFP), které nebyly dostatečně separovány. Optimální volbou byl tudíž ACN, u kterého bylo separováno všech 10 analyzovaných látek. Výběr kyseliny neměl na výsledek vliv (obrázek 19).



Obrázek 19: UHPLC separace na koloně Ascentis Express RP-Amide, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.

Separace na koloně BEH Phenyl

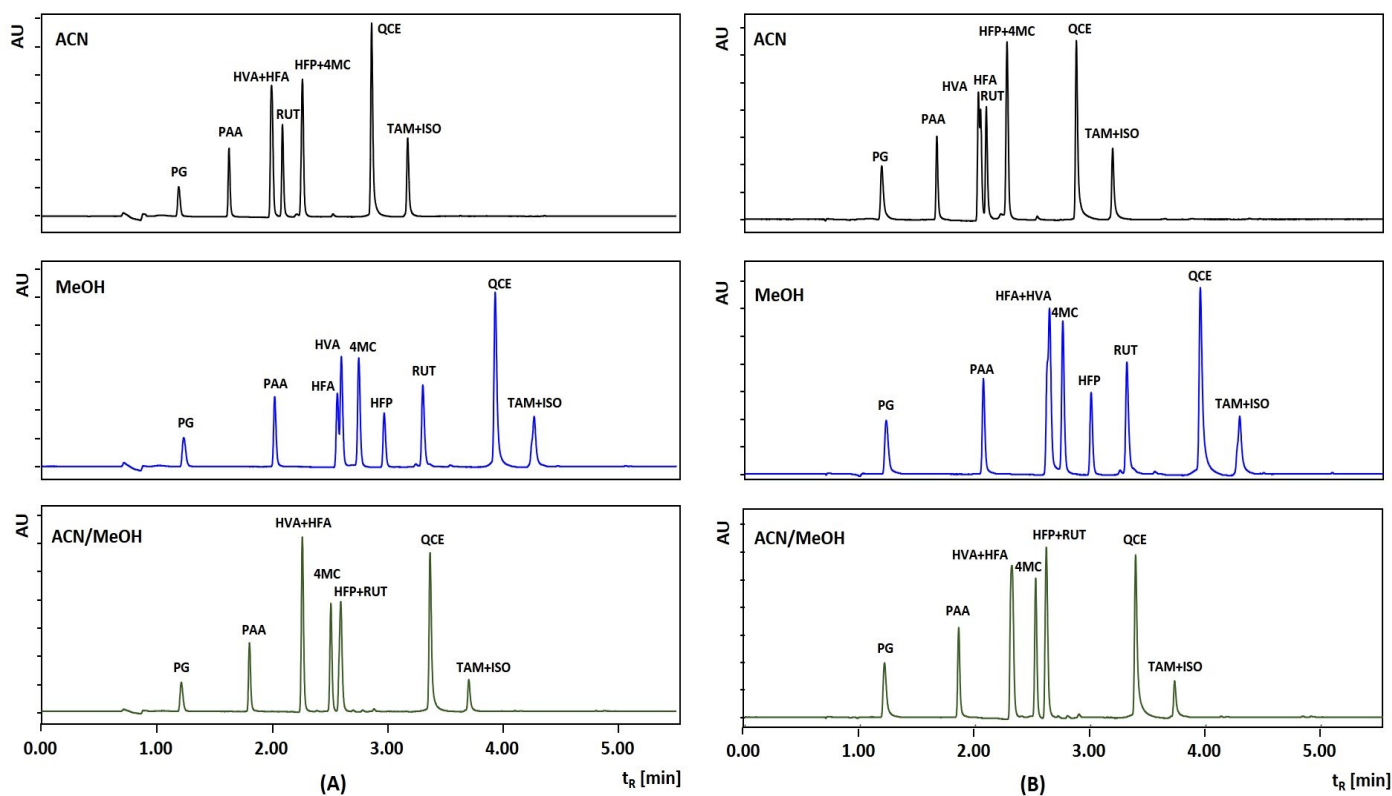
V tomto případě byl nejlepší volbou opět MeOH. S touto MF se oproti ostatním mobilním fázím podařilo rozdělit i kritický pár HVA a HFA. Celkový počet separovaných píků byl 9. Problémem byla ovšem separace kritického páru TAM a ISO, proto tato kolona nebyla zařazena do další optimalizace podmínek. Nejhorší výsledky poskytovala mobilní fáze s ACN/MeOH (1:1), kdy se podařilo rozdělit pouhých 6 píků. Chvostování píků se projevilo výrazněji u látek QCE a TAM+ISO (obrázek 20).



Obrázek 20: UHPLC separace na koloně BEH Phenyl, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.

Separace na koloně CSH Phenyl-Hexyl

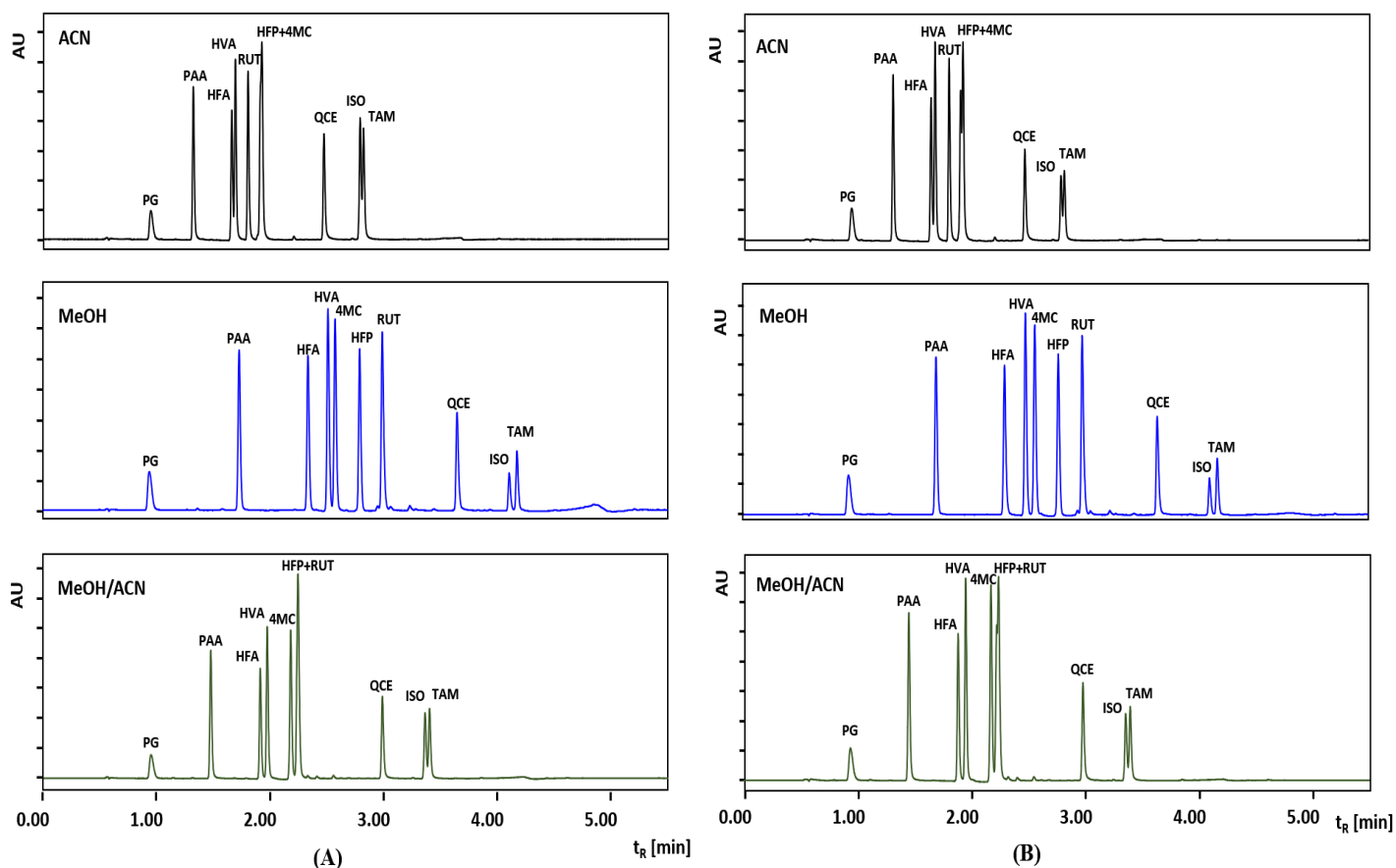
Při použití kolony CSH Phenyl-Hexyl proběhla nejhodnější separace směsi s využitím MeOH a kyseliny mravenčí. Při těchto podmínkách bylo separováno 8,5 píku. Kritický pár TAM a ISO zůstal při všech podmínkách neseparovaný. Problémovým párem byla také dvojice HVA a HFA, kterou se podařilo částečně oddělit pouze při použití kombinace methanolu s kyselinou mravenčí. Při použití kyseliny mravenčí docházelo k chvostování píků QCE a TAM+ISO. Při použití slabší kyseliny octové píky látek chvostovaly a byly široké důsledkem interakce ionizovaných kyselých skupin látek s nabitými skupinami CSH částic stacionární fáze (obrázek 21).



Obrázek 21: UHPLC separace na koloně CSH Phenyl-Hexyl, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH

Separace na koloně Kinetex Biphenyl

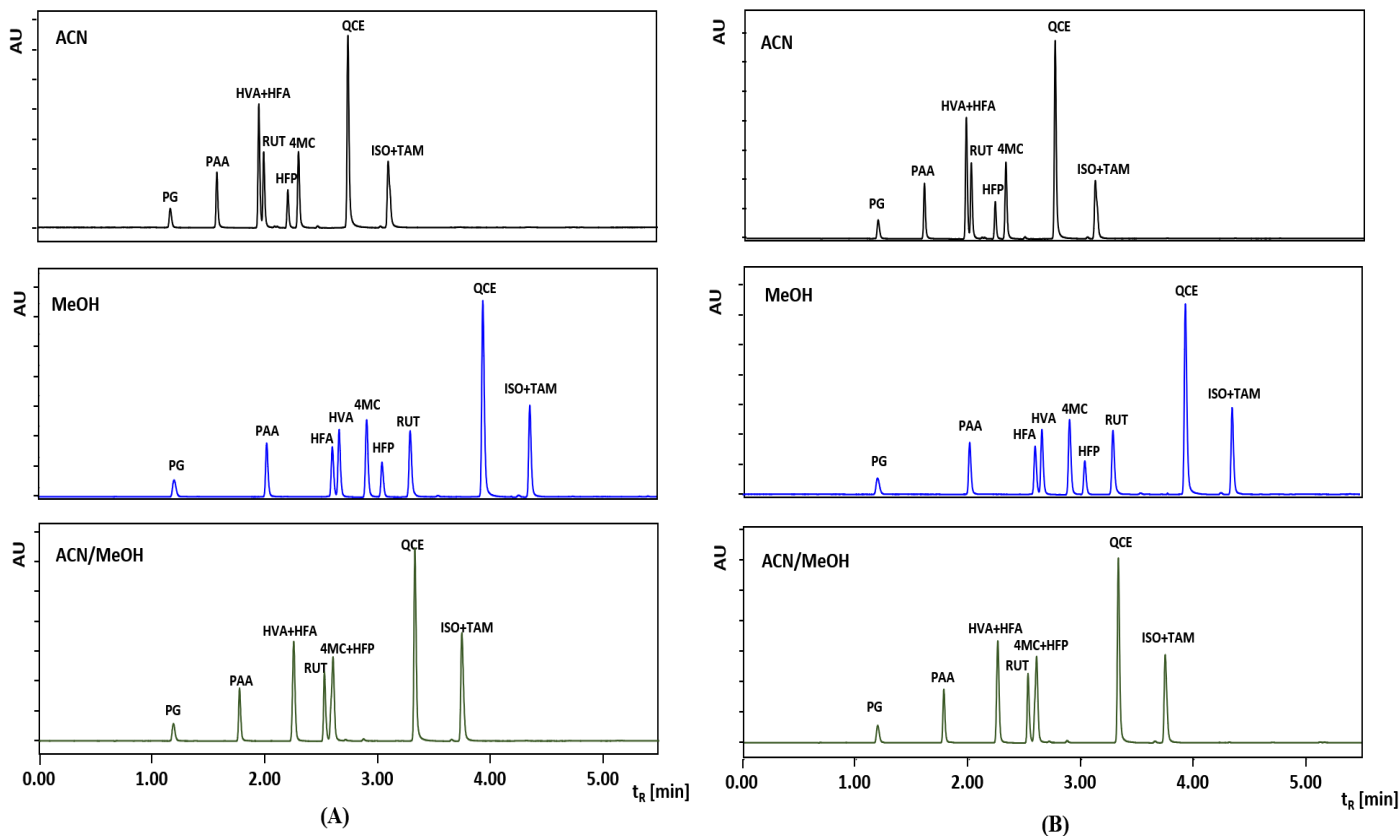
Kolona Kinetex Biphenyl byla vybrána pro další optimalizaci podmínek. Při použití MeOH bylo separováno všech 10 píků. Výhodnější bylo použití kyseliny octové, kdy byly látky HVA a 4MC separovány lépe než v případě kyseliny mravenčí. Při použití mobilní fáze s ACN došlo ke koeluci látek HFP a 4MC a u dvou dalších párů HFA+HVA a ISO+TAM proběhla separace jen částečně. V případě ACN/MeOH v kombinaci s kyselinou mravenčí byl pár ISO+TAM separován pouze částečně a pár HFP+RUT nebyl separován vůbec. V kombinaci ACN/MeOH s kyselinou octovou byl navíc s párem HFP+RUT částečně eluován i 4-methylkatechol. Specifikem této kolony bylo pořadí eluovaného páru TAM a ISO. Při všech podmínkách se isorhamnetin eluoval před tamarixetinem. Na všech ostatních kolonách, u kterých došlo k separaci tohoto páru, proběhla eluce v opačném pořadí (obrázek 22).



Obrázek 22: UHPLC separace na koloně Kinetex Biphenyl, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.

Separace na koloně ACE Excel C18-AR

Na koloně ACE Excel C18-AR se jako nejvhodnější organický modifikátor mobilní fáze ukázal methanol. Při použití methanolu byly separovány všechny píky kromě páru TAM a ISO. Separace tohoto kritického páru nebylo dosaženo při žádné z analýz. Při použití ACN a ACN/MeOH došlo shodně k separaci 8 píků. Problémová byla kromě ISO a TAM také separace páru HVA a HFA. Při všech podmínkách docházelo k mírnému chvostování píků RUT, QCE a TAM+ISO (obrázek 23).

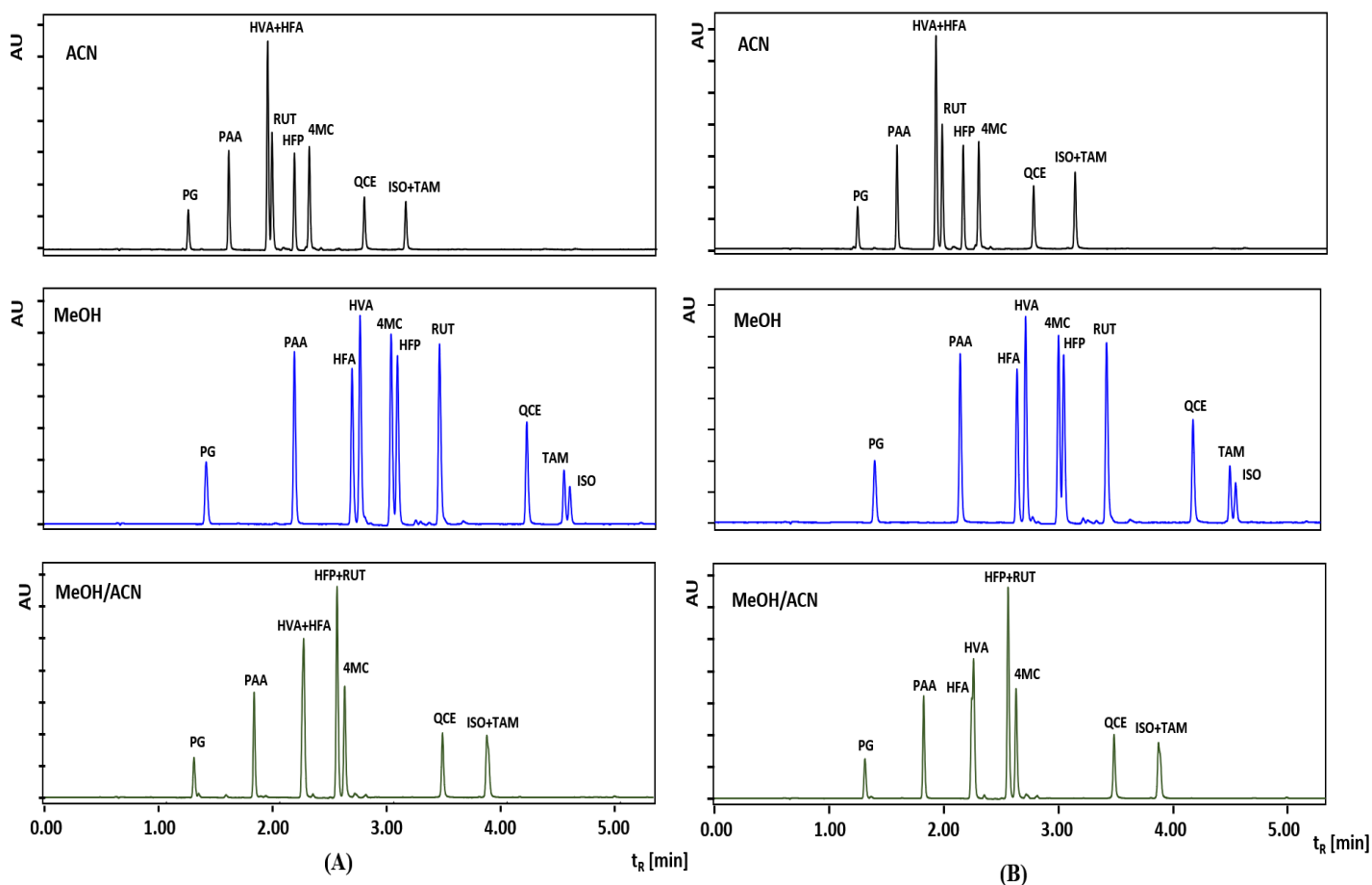


Obrázek 23: UHPLC separace na koloně ACE Excel C18-AR, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.

Separace na koloně ACE Excel C18-PFP

Na koloně ACE Excel C18-PFP bylo dosaženo nejlepších výsledků ve srovnání se všemi testovanými ACE kolonami a kolonami s obsahem fluoru. Jako nejvhodnější MF se ukázal MeOH, kdy byl separován i kritický pár TAM a ISO. Celkem se podařilo separovat 9,5 píku. Z tohoto důvodu byly tyto chromatografické podmínky dále využity pro další optimalizaci. V případě ostatních MF neproběhla separace kritického páru a celkový počet separovaných píků byl nižší.

V tomto případě měl výběr kyseliny vliv na míru separace. V případě ACN došlo ke zlepšení separace kritického páru HVA a HFA při použití kyseliny octové. Naopak v případě MeOH byla výhodnější kyselina mravenčí, protože došlo ke zlepšení separace páru 4MC a HFP (obrázek 24).

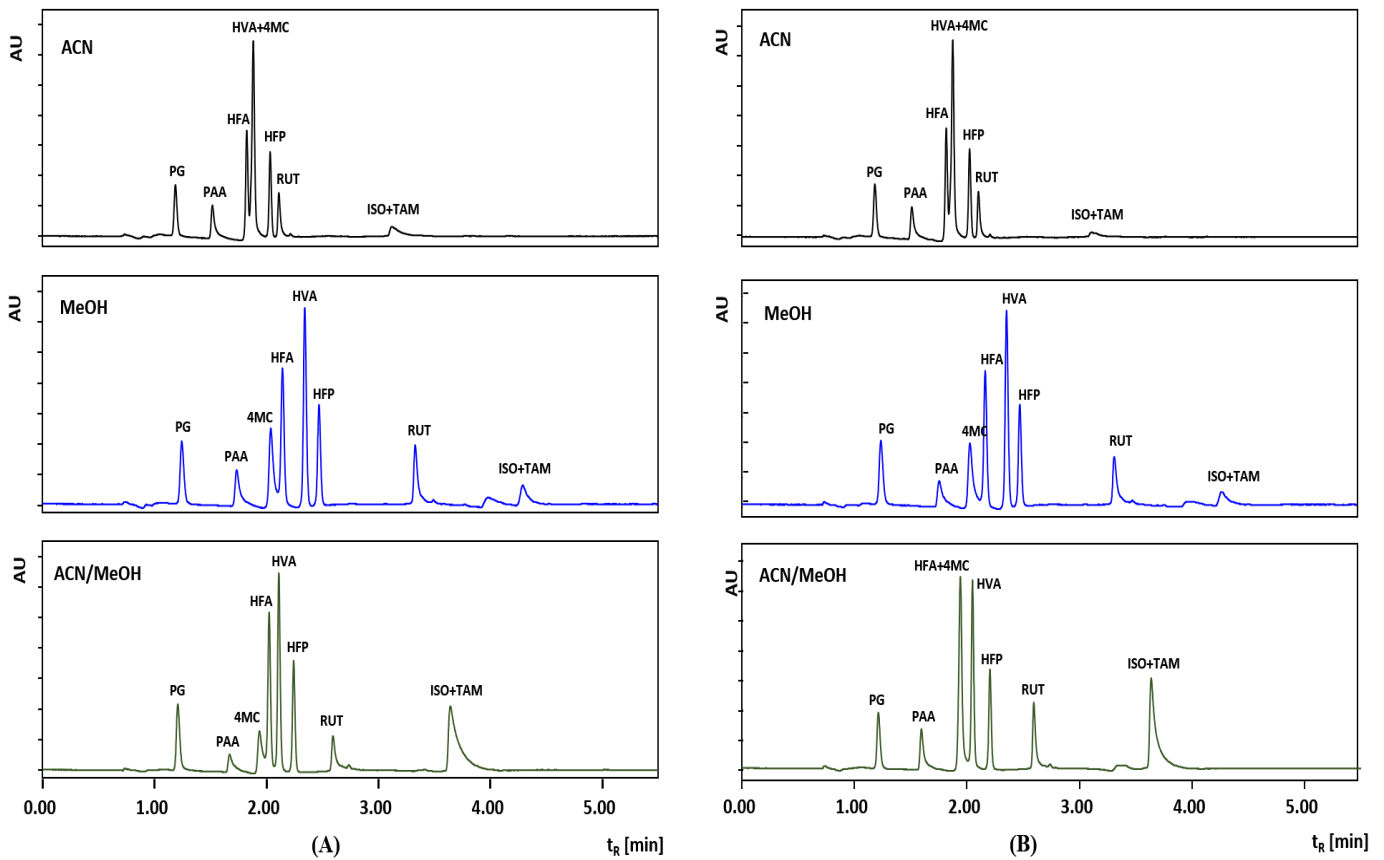


Obrázek 24: UHPLC separace na koloně ACE Excel C18-PFP, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.

Separace na koloně CSH Fluoro-Phenyl

Kolona CSH Fluoro-Phenyl se ukázala pro separaci směsi fenolických látek jako zcela nevhodná. Na koloně proběhla eluce pouze 9 látek, kvercetin se neeluoval. Bylo to pravděpodobně z důvodu příliš silných interakcí kvercetinu s CSH částicemi kolony.

Kritický pár TAM a ISO nebyl separován za žádných podmínek. Nejvhodnějších výsledků bylo dosaženo použitím methanolu a kyseliny octové, kdy bylo separováno 8 píků. Při těchto podmínkách nebyl kromě TAM a ISO separován také pár HFA+4MC. Symetrické píky poskytoval pouze PG, HVA a HFP. Ostatní píky byly v porovnání s ostatními kolonami velmi rozmyté a nesymetrické z důvodu interakce látek s nabitými skupinami kolony. Naopak nejhorších výsledků bylo dosaženo při použití ACN v kombinaci s kyselinou octovou, kdy bylo separováno pouhých 5,5 píku (obrázek 25).

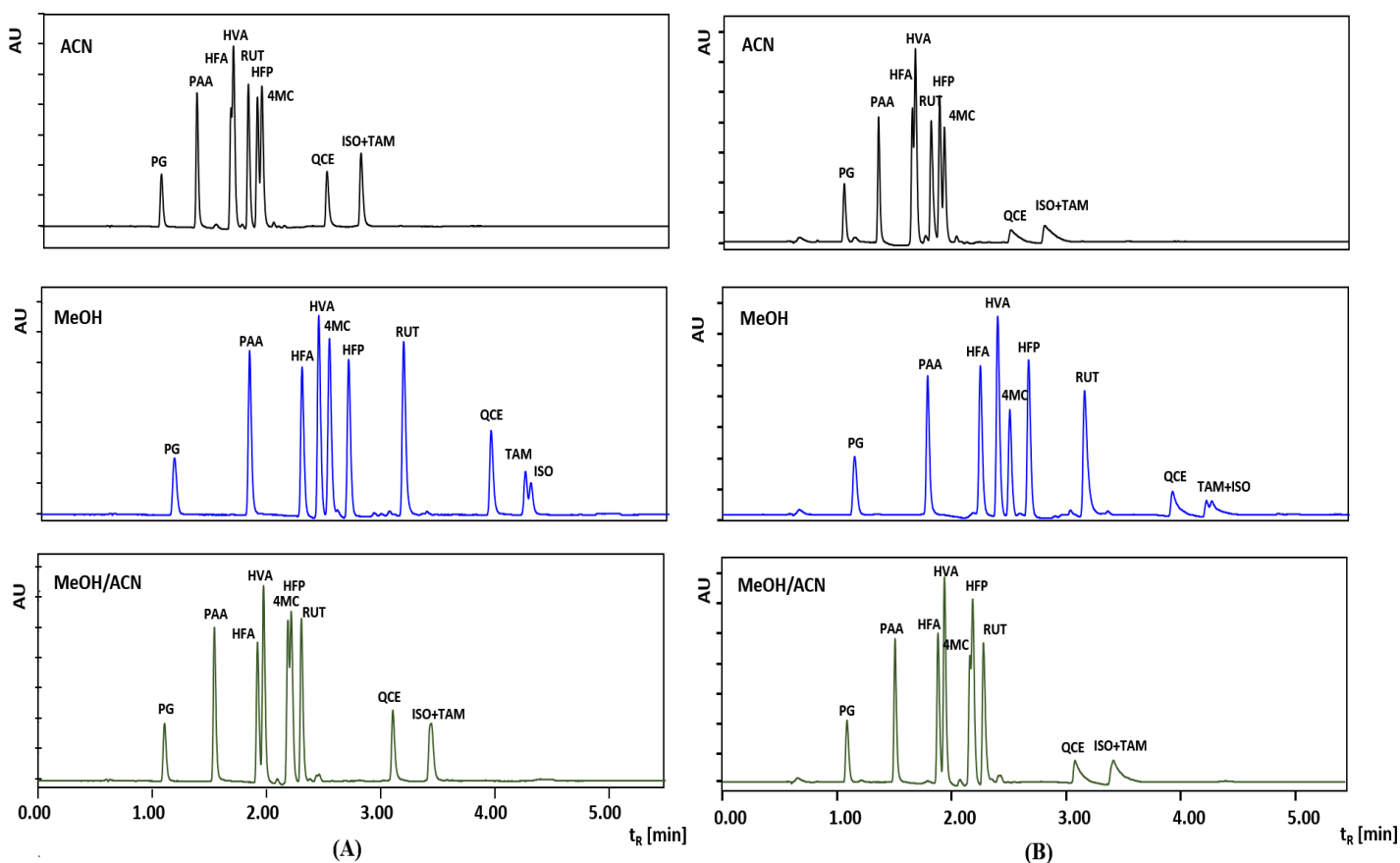


Obrázek 25: UHPLC separace na koloně CSH Fluoro-Phenyl, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH

Separace na koloně Ascentis Express F5

V případě kolony Ascentis Express F5 byl vliv kyseliny významný u všech mobilních fází. Při použití kyseliny octové se projevila deformace tvaru píku především u kvercetinu, tamarixetinu a isorhamnetinu.

Počet separovaných píků se u této kolony lišil v závislosti na použitém organickém rozpouštědle a typu kyseliny. Nejvhodnější separace bylo dosaženo při použití MeOH a kyseliny mravenčí, kdy bylo separováno 9,5 píků. Separace páru TAM a ISO proběhla jen částečně (obrázek 26).

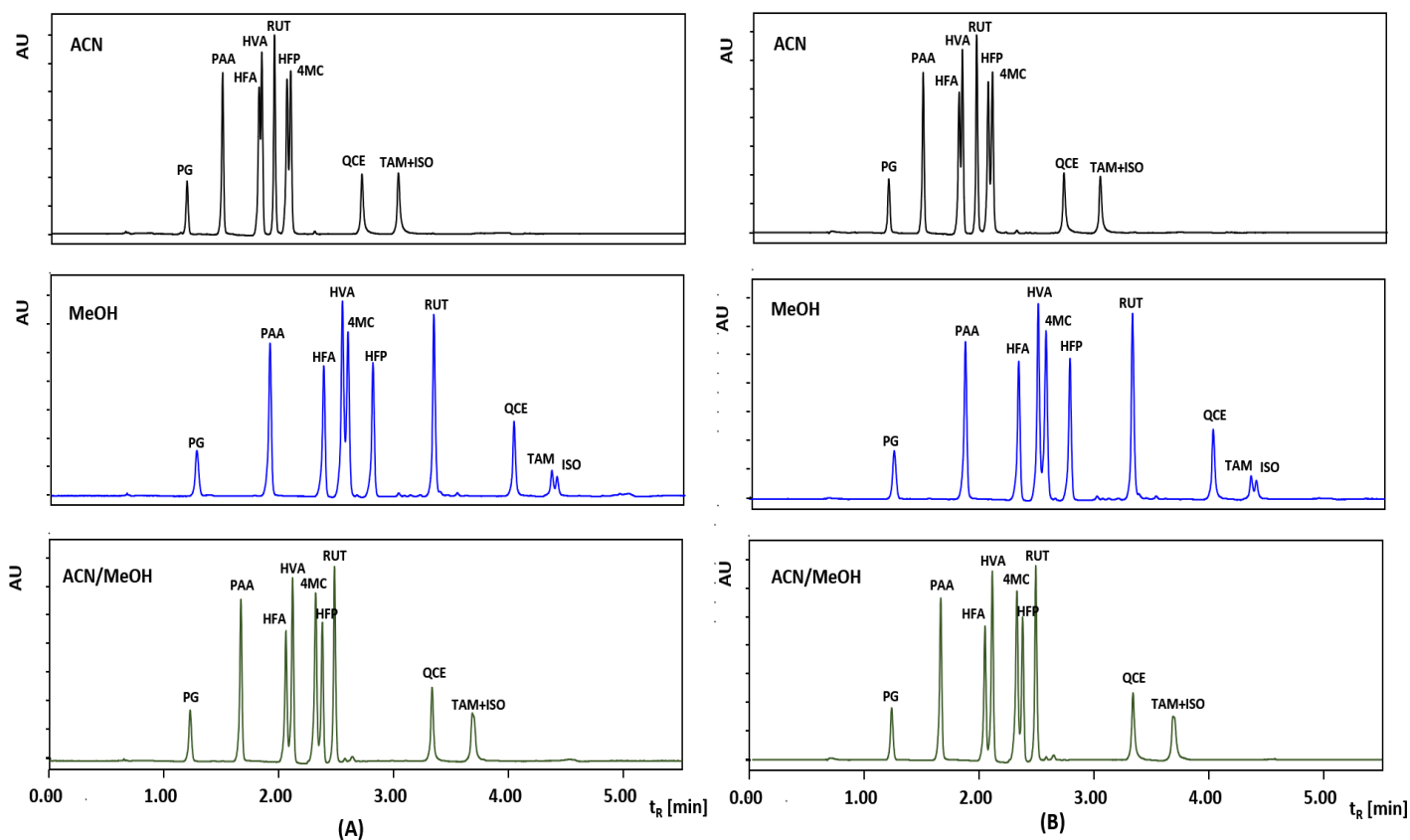


Obrázek 26: UHPLC separace na koloně Ascentis Express F5, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH

Separace na koloně Kinetex PFP

Problémem separace na koloně Kinetex PFP byla nedostatečná symetrie všech separovaných píků. Nejvhodnějších výsledků bylo dosaženo při použití MeOH, kdy proběhla separace celkem 9 píků. Kritický pár TAM a ISO byl však separován jen částečně. Pouze částečně byla separována také dvojice HVA a 4MC.

Vliv typu kyseliny se projevila na míře separace 2 kritických párů při měření s acetonitrilem. V případě použití kyseliny octové bylo dosaženo lepší separace páru HFA+HVA a také páru HFP+4MC (obrázek 27).

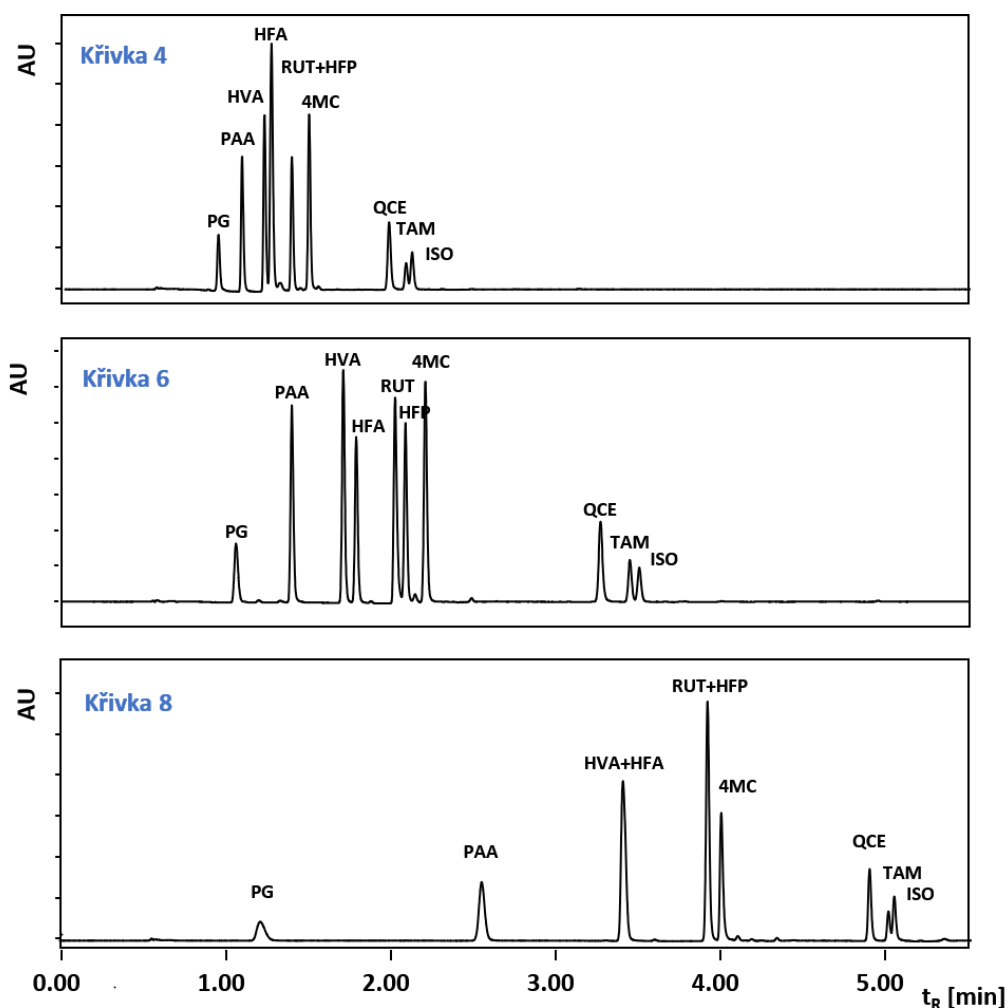


Obrázek 27: UHPLC separace na koloně Kinetex PFP, (A) 0,1% HCOOH, (B) 0,1% CH₃COOH.

5.1.2 Optimalizace podmínek na koloně Ascentis Express RP-Amide

Optimalizace změnou tvaru gradientu

Prvním testovaným parametrem byl vliv tvaru gradientu (gradientových křivek) na separaci. V rámci optimalizace byl srovnáván lineární tvar křivky (křivka 6) s tvarem konvexním (křivka 4) a tvarem konkávním (křivka 8). Žádná ze změn tvaru gradientu ovšem nevedla k lepší separaci, proto byl pro další optimalizaci ponechán lineární tvar gradientu (obrázek 28). Konvexní tvar křivky vedl ke zkrácení retenčních časů všech látek a ke kumulaci píků v přední části chromatogramu. Navíc došlo ke koeluci látek RUT a HFP. V případě konkávního tvaru křivky došlo ke koeluci nejen páru RUT+HFP ale také páru HVA+HFA.



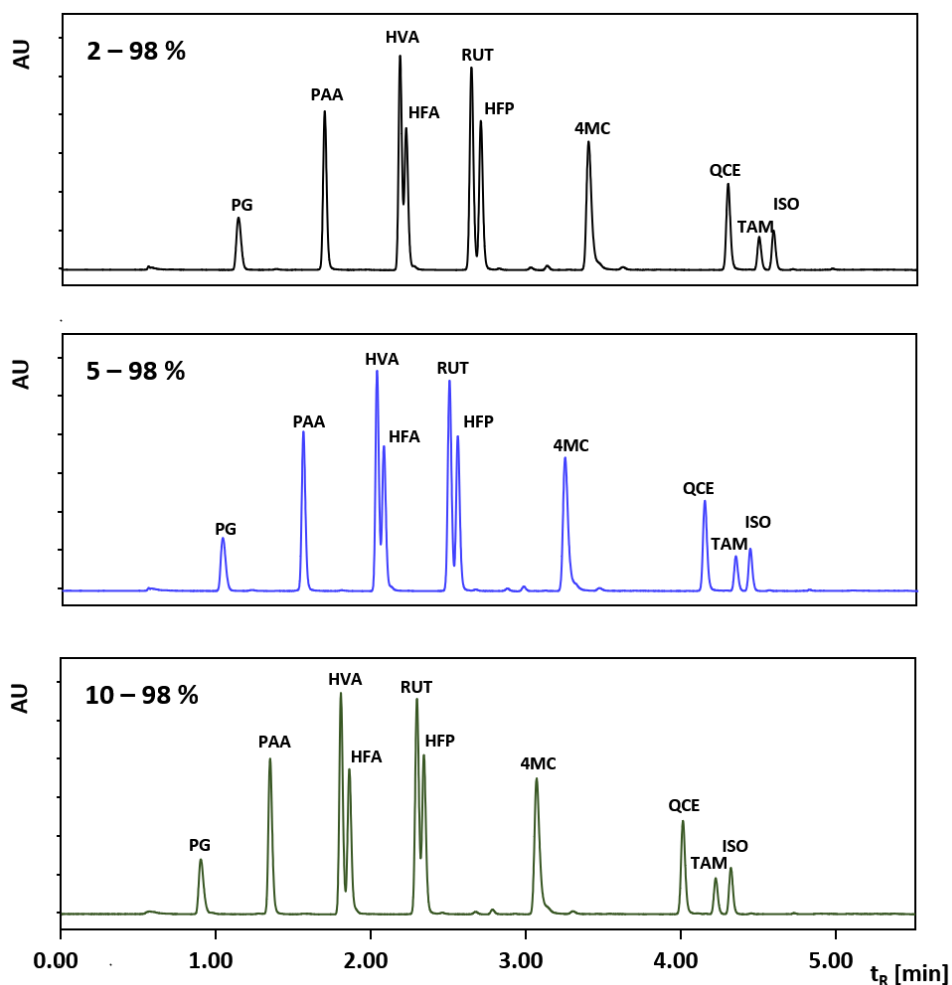
Obrázek 28: UHPLC separace na koloně Ascentis Express RP-Amide s ACN a 0,1% HCOOH, obecný gradientový program (2-98 %), T 40 °C, křivka 4,6 a 8.

Optimalizace nastavení gradientové eluce

Druhým krokem optimalizace byla postupná změna složení mobilní fáze. V případě MeOH i ACN byla testována změna složení na počátku i konci gradientového programu. Výchozími podmínkami byl obecný gradientový program 2-98 %. V případě obou mobilních fází byla zkoušena gradientová eluce 2-95 %, 2-90 %, 5-98 % a 10-98 %. V případě MeOH byl dle výsledků testován dále gradientový program 10-80 %, 10-70 %, 10-60 % a 15-80 %.

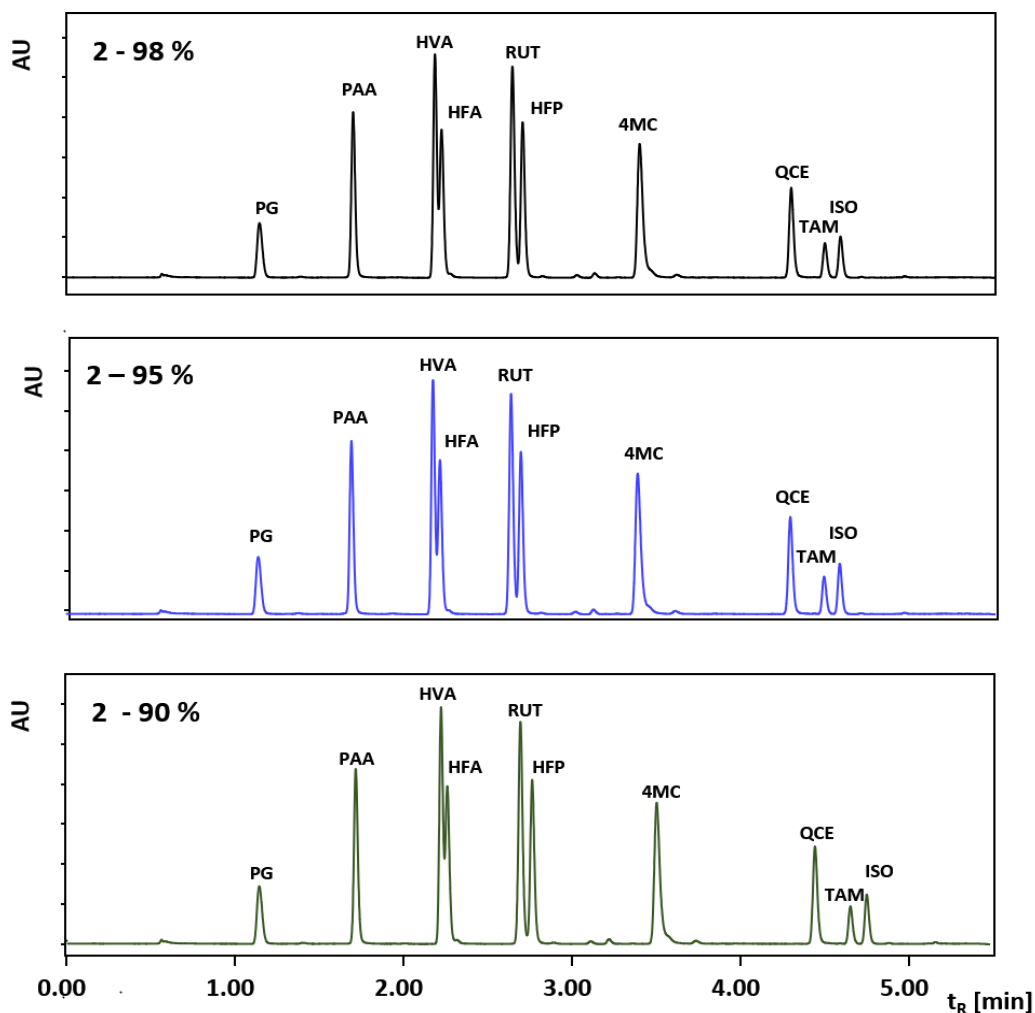
Při použití ACN s 0,1% HCOOH vedlo postupné zvyšování procentuálního zastoupení organické složky na počátku gradientové eluce (2 %, 5 %, 10 %) pouze k mírnému snížení retenčních časů analytů (chromatogramy nejsou uvedeny). Při použití MeOH s 0,1% HCOOH vedlo rostoucí zastoupení methanolu na počátku gradientového

programu ke zlepšení separace páru HFA a HVA, ale současně ke zhoršení separace páru RUT a HFP (obrázek 29).



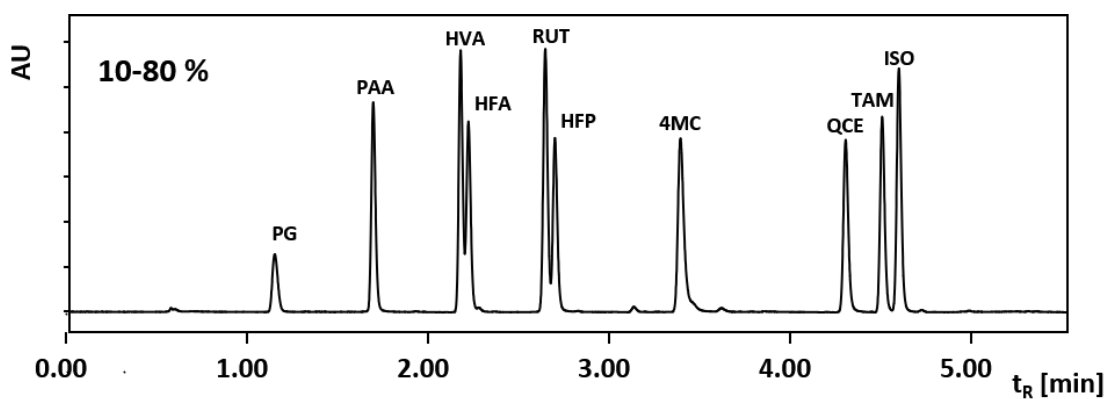
Obrázek 29: UHPLC separace na koloně Ascentis Express RP-Amide s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 2-98 %, 5-98 % a 10-98 %, T 40 °C.

Postupné snižování procentuálního zastoupení ACN na konci gradientové eluce (98 %, 95 %, 90 %) naopak vedlo k mírnému prodloužení retenčních časů analytů a také k horší separaci páru RUT a HFP (chromatogramy nejsou uvedeny). Klesající zastoupení methanolu na konci gradientové eluce se na separaci výrazně neprojevilo (obrázek 30).



Obrázek 30: UHPLC separace na koloně Ascentis Express RP-Amide s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 2-98 %, 2-95 % a 2-90 %, T 40 °C.

Z dalších 4 testovaných gradientových programů (10-80 %, 10-70 %, 10-60 % a 15-80 %) lze nejlepší separaci pozorovat u gradientové eluce 10-80 % (obrázek 31).



Obrázek 31: UHPLC separace na koloně Ascentis Express RP-Amide s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 10-80 %, T 40 °C.

V tabulce 6 je znázorněno srovnání rozlišení analyzovaných látek u nevhodnějších podmínek. Ve všech uvedených případech nesplňovaly 2 látky stanovený minimální limit rozlišení 1,5. Pro další optimalizaci byl zvolen MeOH s gradientovým programem 10-80 %.

Tabulka 6: Porovnání rozlišení analyzovaných látek při nevhodnějších podmínkách na koloně Ascentis Express RP-Amide.

Podmínky	PG	PAA	HVA	HFA	RUT	HFP	4MC	QCE	TAM	ISO
2-98 % ACN	-	9,09	9,84	2,30	7,47	1,34	3,64	27,51	4,58	1,37
10-98 % MeOH	-	8,62	10,25	1,23	9,53	0,96	13,58	17,22	4,41	2,09
10-80 % MeOH	-	11,10	11,68	1,04	9,54	1,20	13,42	17,00	4,29	2,04

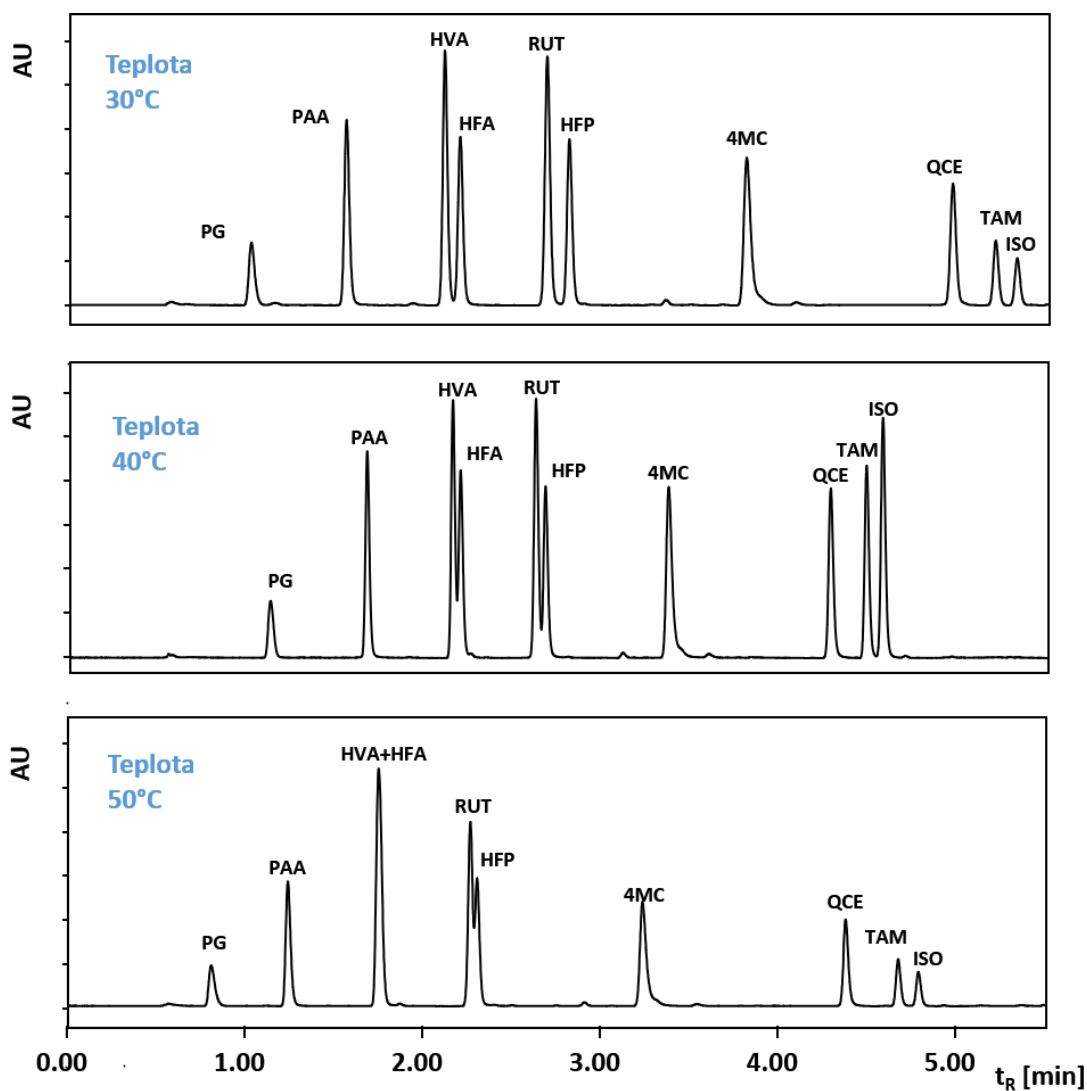
Optimalizace teploty separace

Třetím krokem bylo u zvolených podmínek (MeOH s 0,1% HCOOH, gradientová eluce 10-80 %) ověření vlivu teploty. Výchozími podmínkami byla teplota separace 40 °C. Během optimalizace byla dále testována teplota 30 °C a 50 °C.

Výsledné chromatogramy jsou znázorněny na obrázku 32. Z výsledků vyplývá, že snížením teploty na 30 °C došlo ke zlepšení rozlišení TAM a ISO. Zároveň proběhla separace obou problémových párů HVA+HFA a RUT+HFP. Zvýšením teploty na 50 °C bylo dosaženo nejlepší separace páru TAM a ISO, ovšem u ostatních kritických párů se separace výrazně zhoršila oproti výchozí teplotě. U páru HVA a HFA k separaci vůbec nedošlo. V případě kritického páru RUT a HFP byly látky separovány pouze minimálně. Z testovaných teplot bylo nejlepší separace analyzovaných látek dosaženo při teplotě 30 °C. Rozlišení analytů při testovaných teplotách je znázorněno v tabulce 7.

Tabulka 7: Porovnání rozlišení analyzovaných látek na koloně Ascentis Express RP-Amide při různých teplotách separace.

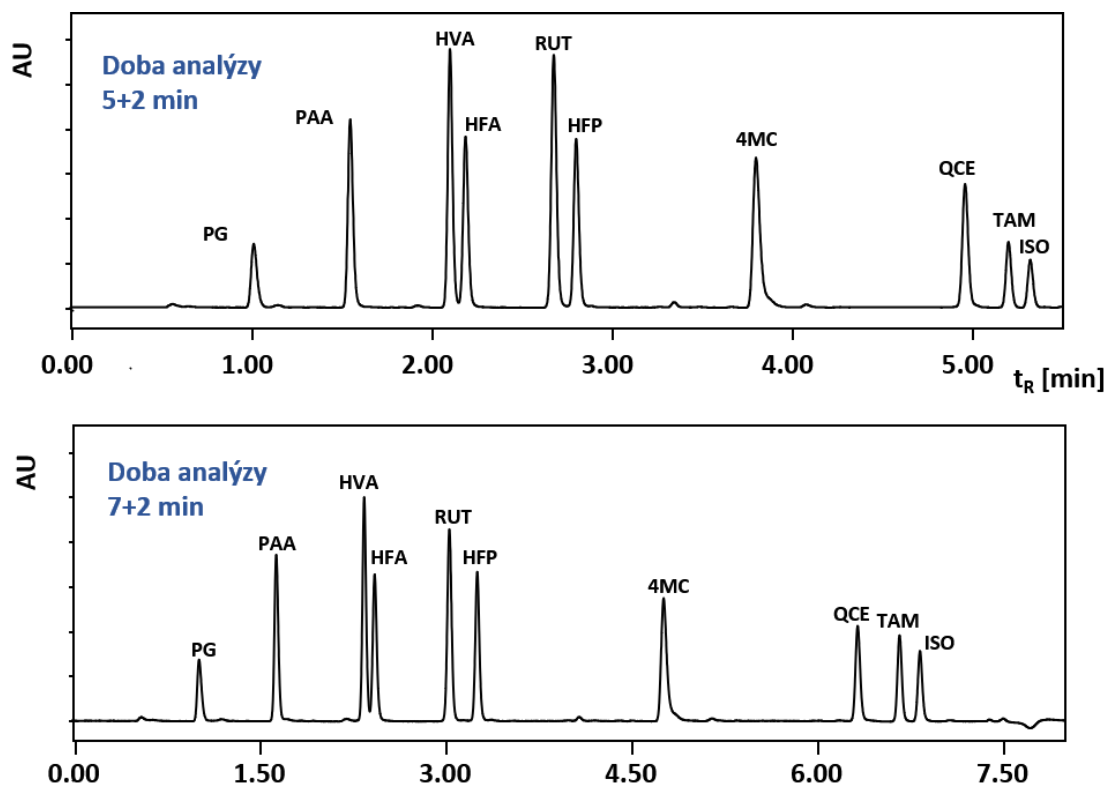
Podmínky	PG	PAA	HVA	HFA	RUT	HFP	4MC	QCE	TAM	ISO
30 °C	-	9,45	10,91	1,71	9,20	2,32	16,21	17,86	4,26	2,24
40 °C	-	11,10	11,68	1,04	9,54	1,20	13,42	17,00	4,29	2,04
50 °C	-	7,70	9,34	-	9,34	-	-	19,72	5,92	2,35



Obrázek 32: UHPLC separace na koloně Ascentis Express RP-Amide s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 10-80 %, teplota separace 30, 40 a 50 °C.

Optimalizace času analýzy

V rámci posledního kroku optimalizace byl u zatím nejlepších dosažených podmínek (MeOH s 0,1% HCOOH, gradientový program 10-80 %, teplota 30°C) testován také vliv prodloužení času analýzy na míru separace. Doba analýzy byla prodloužena z původních 5 min na 7 min (vždy s následnou 2minutovou ekvilibrací) (obrázek 33).



Obrázek 33: UHPLC separace na koloně Ascentis Express RP-Amide s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 10-80 %, T 30 °C, doba analýzy 5 min a 7 min (+2 min ekvilibrace).

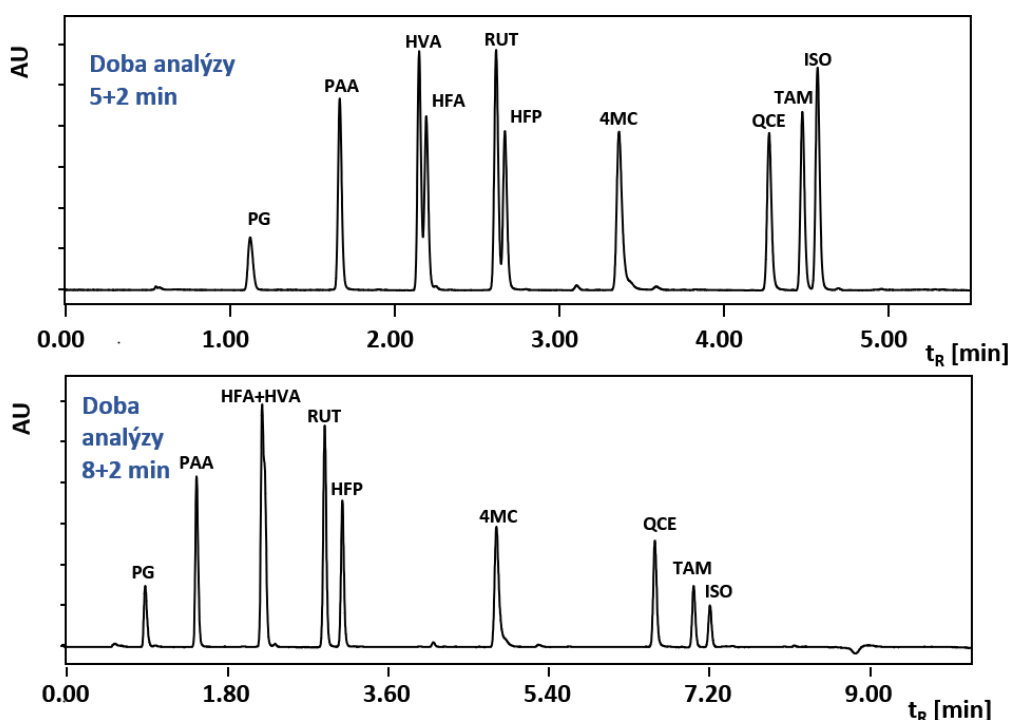
Prodloužení doby analýzy vedlo ke zvýšení retenčních časů analyzovaných látek a k mírnému zlepšení rozlišení a užšímu tvaru píků všech látek kromě HFA. HFA v případě delší analýzy už nesplňovala ani minimální limit rozlišení (1,5). Rozlišení jednotlivých látek je znázorněno v tabulce 8. Sedmiminutová analýza poskytovala vhodnější separaci kritických párů RUT+HFP a TAM+ISO. Kvůli nedostatečnému rozlišení HVA však byla pětiminutová analýza ponechána na této koloně jako finální.

Tabulka 8: Porovnání rozlišení analyzovaných látek na koloně Ascentis Express RP-Amide při různých časech analýzy, při teplotě 30 °C.

Podmínky	PG	PAA	HVA	HFA	RUT	HFP	4MC	QCE	TAM	ISO
Doba analýzy 5+2 min	-	9,45	10,91	1,71	9,20	2,32	16,21	17,86	4,26	2,24
Doba analýzy 7+2 min	-	10,16	12,56	1,46	9,76	3,61	21,07	20,61	4,98	2,50

V rámci optimalizace bylo také testován vliv času analýzy na separaci za podmínek gradientového programu 10-80 % a teploty 40 °C. Doba analýzy byla prodloužena z původních 5 min na 8minutovou separaci (vždy s následnou 2minutovou ekvilibrací).

Prodloužení času analýzy vedlo opět k lepšímu rozdělení kritických párů HFP+4MC a TAM+ISO. Naopak u všech zbylých látek kromě kvercetinu bylo dosaženo nižšího rozlišení v porovnání s 5minutovou analýzou. V případě kritického páru látek HVA a HFA separace změnou podmínek vůbec neproběhla (obrázek 34). Rozlišení látek je znázorněno v tabulce 9.



Obrázek 34: UHPLC separace na koloně Ascentis Express RP-Amide s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 10-80 %, T 40 °C, doba analýzy 5 min a 8 min (+ 2 min ekvilibrace).

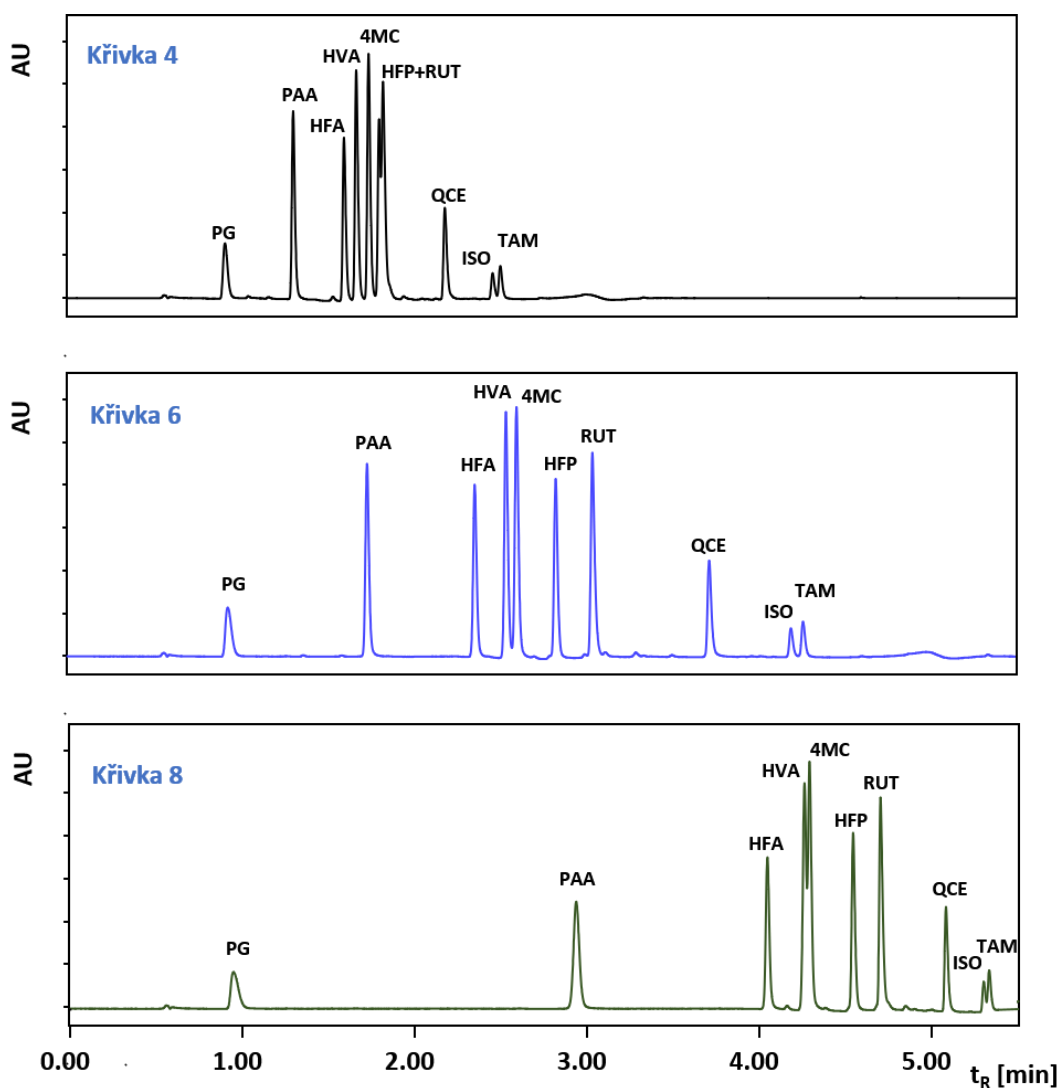
Tabulka 9: Porovnání rozlišení analyzovaných látek na koloně Ascentis Express RP-Amide při různých časech analýzy, při teplotě 40 °C.

Podmínky	PG	PAA	HVA	HFA	RUT	HFP	4MC	QCE	TAM	ISO
Doba analýzy 5+2 min	-	11,10	11,68	1,04	9,54	1,20	13,42	17,00	4,29	2,04
Doba analýzy 8+2 min	-	9,36	9,23	-	8,55	3,19	23,40	22,56	6,69	3,11

5.1.3 Optimalizace podmínek na koloně Kinetex Biphenyl

Optimalizace změnou tvaru gradientu

V prvním kroku optimalizace byl testován vliv gradientových křivek na separaci směsi při teplotě 40 °C a s využitím obecného gradientového programu 2-98 %. Stejně jako u kolony Ascentis Express RP-Amide byla testována křivka 4 a 8. Ani jedna změna tvaru gradientu však nevedla k lepším výsledkům, naopak docházelo v obou případech ke koelucím některých standardních látek a nedostatečnému rozlišení píků. Křivka 4 navíc vedla ke kumulaci píků v přední části chromatogramu. Srovnání vlivu gradientových křivek při použití methanolu je znázorněno na obrázku 35.



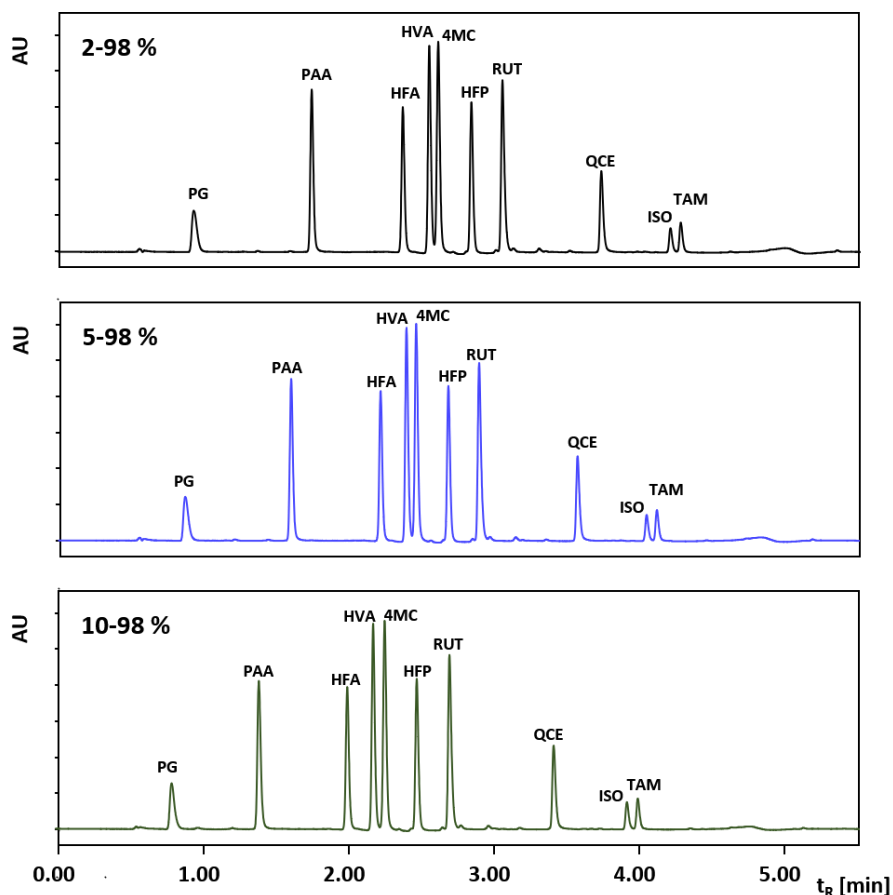
Obrázek 35: UHPLC separace na koloně Kinetex Biphenyl s MeOH a 0,1% HCOOH, obecný gradientový program (2-98 %), T 40 °C, křivka 4,6 a 8.

Optimalizace nastavení gradientové eluce

Druhým krokem optimalizace byla opět postupná změna složení mobilní fáze za stejných podmínek jako v případě předchozí kolony. U obou mobilních fází byl zkoušen gradientový program 2-95 %, 2-90 %, 5-98 % a 10-98 %. V případě MeOH byl dle výsledků testován dále gradientový program 10-80 %, 10-70 %, 15-80 % a 15-98 %.

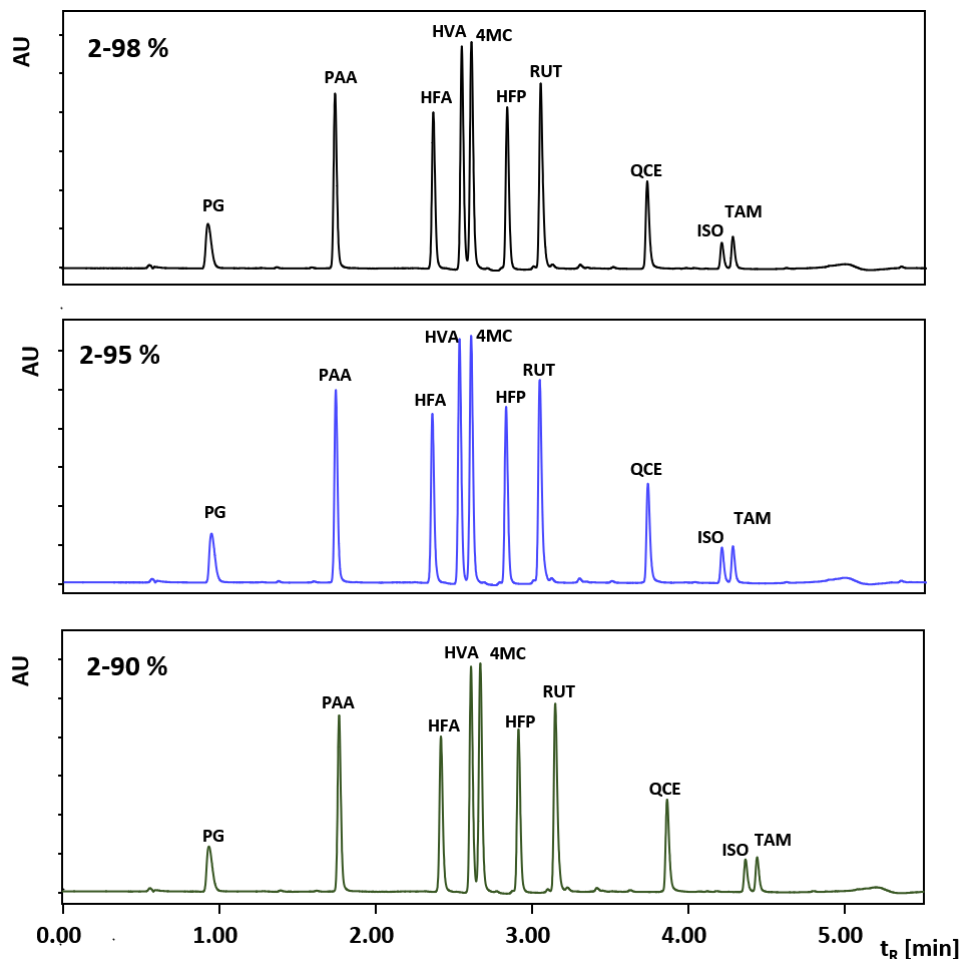
Při použití ACN s 0,1% HCOOH vedlo postupné zvyšování procentuálního obsahu organické složky na počátku gradientové eluce (2 %, 5 %, 10 %) ke zlepšení separace HFP a 4MC, naopak u páru HVA a HFA vedlo k významnému zhoršení. U postupného snižování zastoupení ACN na konci gradientové eluce (98 %, 95 %, 90 %) byla jedinou pozorovatelnou změnou nepatrně lepší separace páru HVA a HFA (chromatogramy nejsou uvedeny).

Při použití MeOH s 0,1% HCOOH se výsledky zlepšily s rostoucím zastoupením organické složky na počátku gradientové eluce. Lepší se především separace kritického páru HVA a 4MC (obrázek 36). Rozlišení 4MC u gradientových programů: 2-98 % (1,62), 5-98 % (1,75) a 10-98 % (2,03).



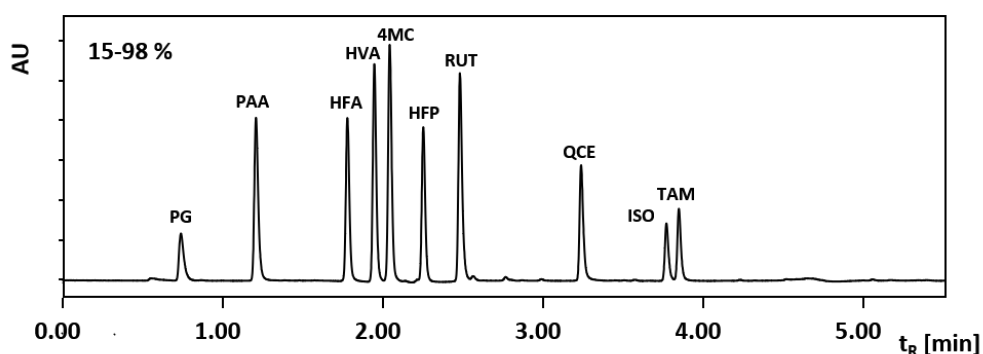
Obrázek 36: UHPLC separace na koloně Kinetex Biphenyl s MeOH a 0,1% HCOOH, T 40 °C, s gradientovou elucí 2-98 %, 5-98 % a 10-98 %.

Změna složení MF na konci gradientové eluce se taktéž projevila na separaci kritického páru HVA+4MC. Nejvyššího rozlišení 4MC (1,97) bylo dosaženo při 95 % zastoupení methanolu na konci gradientového programu (obrázek 37).



Obrázek 37: UHPLC separace na koloně Kinetex Biphenyl s MeOH a 0,1% HCOOH, T 40 °C, s gradientovou elucí 2-98 %, 2-95 % a 2-90 %.

Z dalších 4 testovaných gradientových programů (10-80 %, 10-70 %, 15-80 % a 15-98 % MeOH) lze nejlepší separaci pozorovat u gradientového programu 15-98 % (obrázek 38).



Obrázek 38: UHPLC separace na koloně Kinetex Biphenyl s MeOH a 0,1% HCOOH, T 40 °C, gradientový program 15-98 %.

V tabulce 10 je znázorněno rozlišení píků analyzovaných látek u nejvhodnějších podmínek na koloně Kinetex Biphenyl. Jako nejvhodnější byl pro další optimalizaci zvolen MeOH s gradientovým program 15-98 %, který poskytoval dostatečné rozlišení všech testovaných látek. Výsledky za těchto podmínek dosahovaly dostatečného rozlišení zejména u problémového TAM a 4MC.

Tabulka 10: Porovnání rozlišení analyzovaných látek při nejvhodnějších podmínkách na koloně Kinetex Biphenyl.

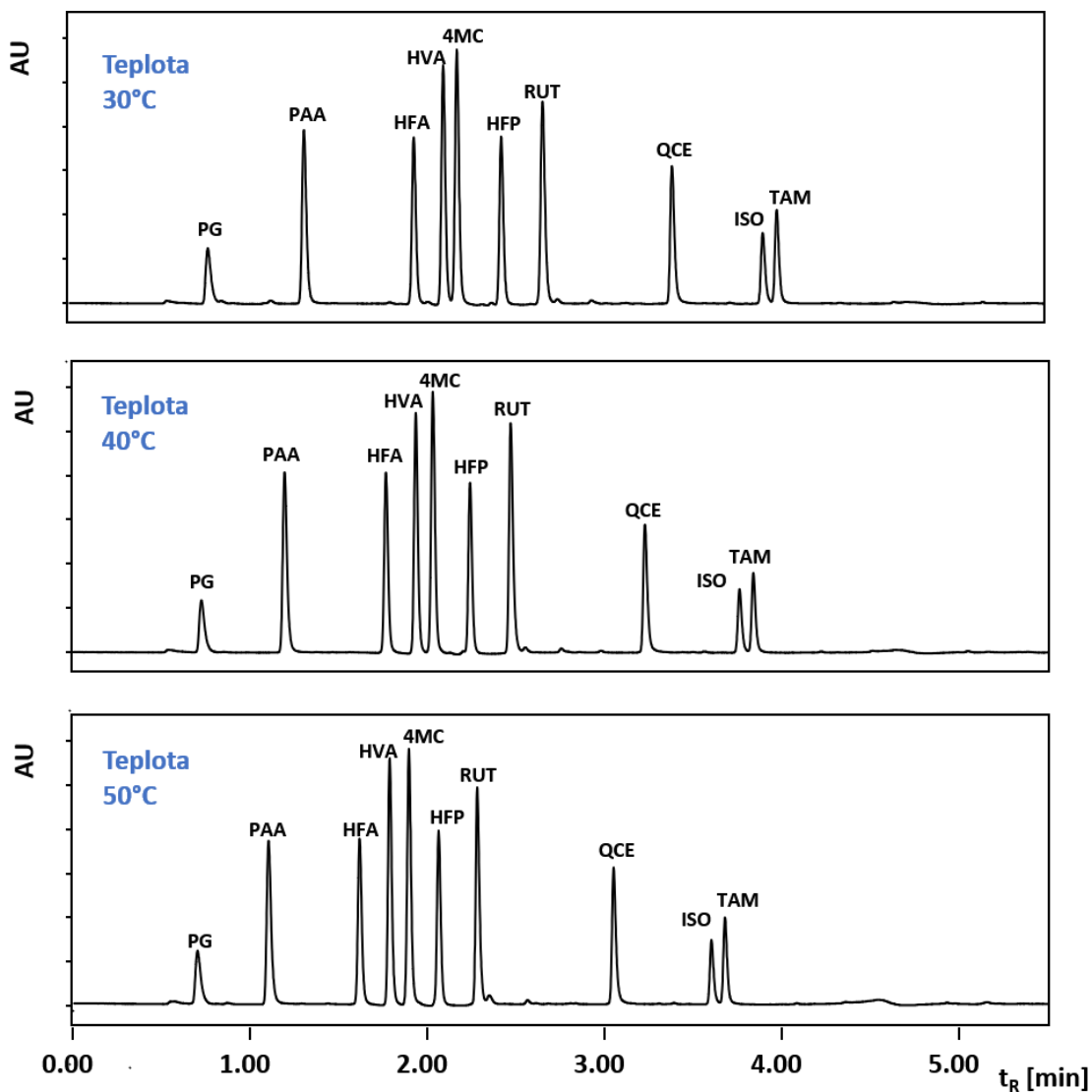
Podmínky	PG	PAA	HFA	HVA	4MC	HFP	RUT	QCE	ISO	TAM
2-95 % MeOH	-	15,41	16,66	4,70	1,97	5,85	5,51	17,09	11,81	1,78
10-98 % MeOH	-	12,18	15,01	4,62	2,03	5,64	5,65	17,39	12,43	1,89
15-98 % MeOH	-	9,60	13,68	4,29	2,43	5,32	5,75	18,38	12,90	1,91

Optimalizace teploty separace

Dalším krokem byla u zvolených podmínek (MeOH s 0,1% HCOOH, gradientový program 15-98 %) ověření vlivu teploty. Stejně jako v předchozím případě byla výchozí teplotou separace teplota 40 °C. Testovány byly teploty 30 °C a 50 °C.

Výsledné chromatogramy jsou znázorněny na obrázku 39. Snížením teploty na 30 °C došlo k mírnému zhoršení rozlišení všech obou kritických párů HVA+4MC a ISO+TAM. Hodnoty rozlišení jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce 11. Při teplotě 50 °C dosahovalo rozlišení podobných hodnot, ovšem u látek PAA, HVA a 4MC docházelo

k mírnému chvostování píků. Jako nejvhodnější byla proto vybrána separace při teplotě 40 °C.



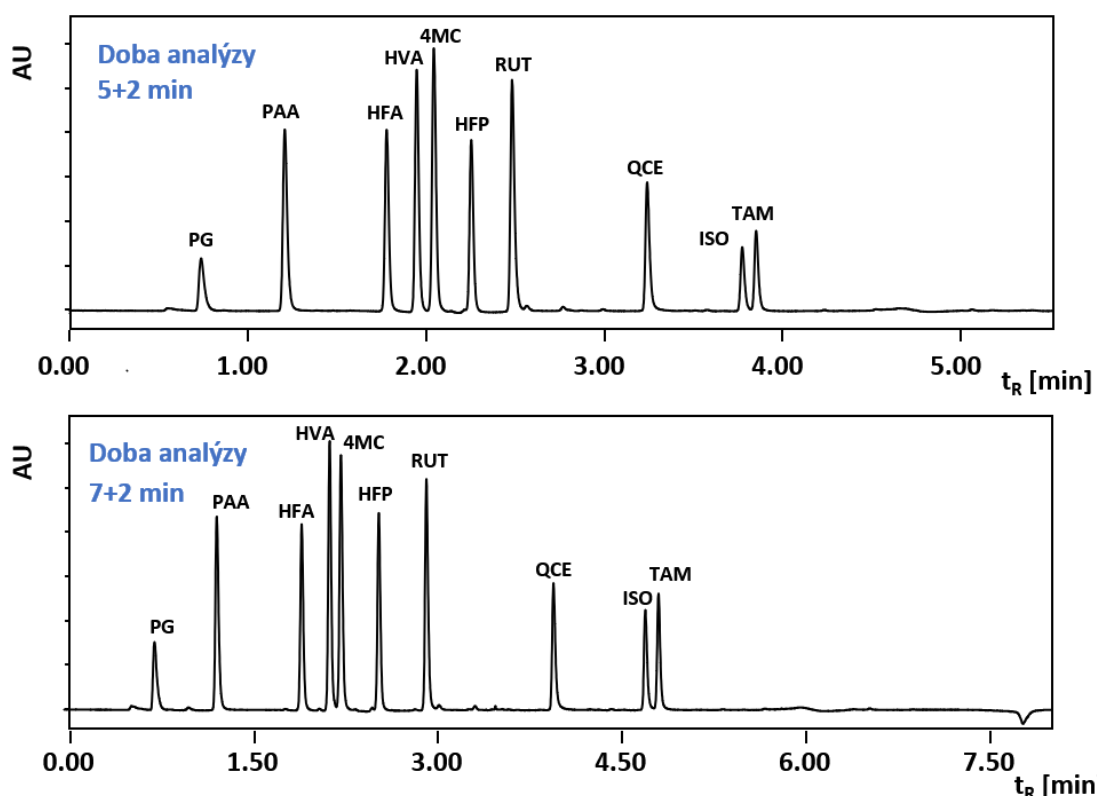
Obrázek 39: UHPLC separace na koloně Kinetex Biphenyl s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 15-98 %, s teplotou separace 30, 40 a 50 °C.

Tabulka 11: Porovnání rozlišení analyzovaných látek na koloně Kinetex Biphenyl při různých teplotách separace.

Podmínky	PG	PAA	HFA	HVA	4MC	HFP	RUT	QCE	ISO	TAM
30 °C	-	11,12	14,58	4,05	1,87	6,04	5,48	16,72	11,82	1,85
40 °C	-	9,60	13,68	4,29	2,43	5,32	5,75	18,38	12,90	1,91
50 °C	-	8,08	12,22	4,36	2,78	4,31	5,72	19,69	12,88	1,87

Optimalizace času analýzy

U dosud získaných nejlepších podmínek (MeOH s 0,1% HCOOH, gradientový program 15-98 %, teplota 40°C) byla otestováno prodloužení doby analýzy z původních 5 min na 7 min (vždy s následnou 2min ekvilibrací). Výsledné chromatogramy jsou uvedeny na obrázku 40. Prodloužení času analýzy vedlo k lepší separaci páru TAM a ISO, rozlišení 4MC se naopak zhoršilo. Hodnoty rozlišení analyzovaných fenolických látek jsou uvedeny v tabulce 12.



Obrázek 40: UHPLC separace na koloně Kinetex Biphenyl s MeOH a 0,1% HCOOH, teplota 40 °C, gradientový program 15-98 %, čas analýzy 5 min a 7 min (+2 min ekvilibrace).

Tabulka 12: Porovnání rozlišení analyzovaných látek na koloně Kinetex Biphenyl, při různých časech analýzy.

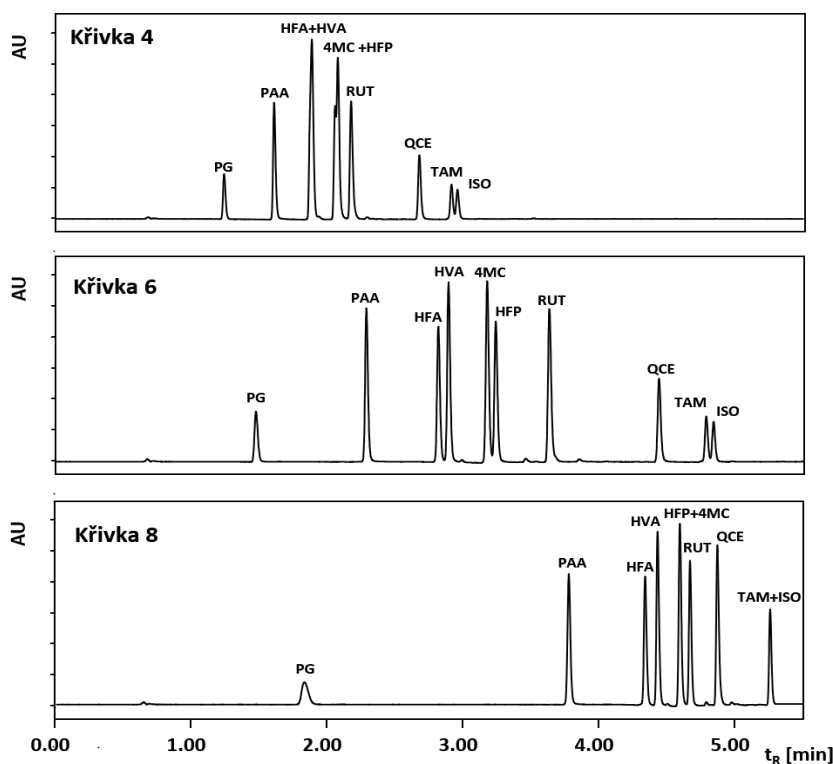
Podmínky	PG	PAA	HFA	HVA	4MC	HFP	RUT	QCE	ISO	TAM
Doba analýzy 5+2 min	-	9,60	13,68	4,29	2,43	5,32	5,75	18,38	12,90	1,91
Doba analýzy 7+2 min	-	9,81	15,12	5,20	2,08	6,96	8,77	22,56	16,07	2,34

Otestována byla také 7minutová analýza (s následnou 2minutovou ekvilibrací) s gradientovou elucí 15-80 %, kdy došlo k ještě lepší separaci páru TAM a ISO. Bohužel však rozlišení 4MC se zhoršilo na hodnotu 1,77 (data nejsou uvedena). Proto byl jako finální podmínky pro kolonu Kinetex Biphenyl zvolen gradientový program 15-98 % s časem analýzy 7 minut (+2 min). Při těchto podmínkách proběhla separace všech 10 látek.

5.1.4 Optimalizace podmínek na koloně ACE Excel C18-PFP

Optimalizace změnou tvaru gradientu

Optimalizace byla zahájena testováním vlivu gradientových křivek na separaci za využití obecného gradientového programu 2-98 % a teploty 40 °C. Byl testován konvexní tvar (křivka 4) a konkávní tvar gradientu (křivka 8). Stejně jako u předchozích kolon bylo nejlepší separace dosaženo použitím lineárního gradientu. Porovnání vlivu křivek na separaci při využití methanolu jako mobilní fáze je znázorněn na obrázku 41. Při použití křivky 6 je separováno všech 10 látek. U křivky 4 dochází ke koelucím a celkový počet separovaných píků je snížen na 7,5. V případě křivky 8 je celkem separováno píků 8, protože dochází ke koelucím látek TAM+ISO a HFP+RUT.

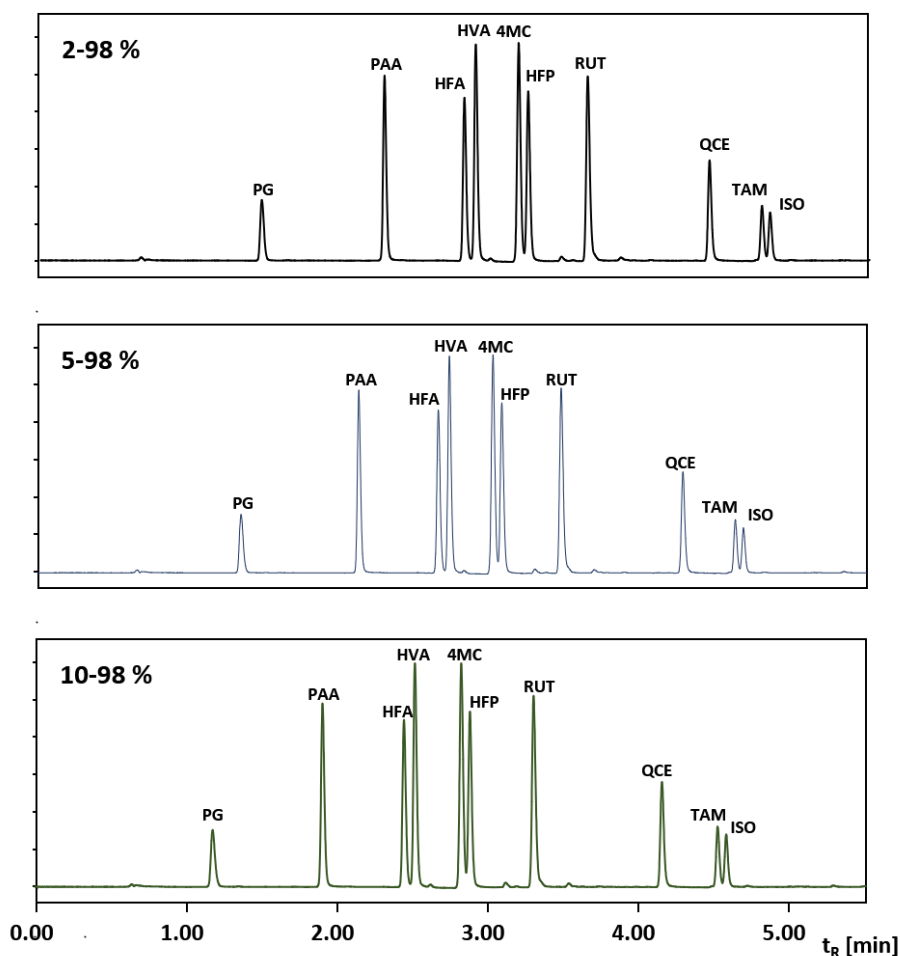


Obrázek 41: UHPLC separace na koloně ACE Excel C18-PFP s MeOH a 0,1% HCOOH, obecný gradientový program (2-98 %), T 40 °C, křivka 4,6 a 8.

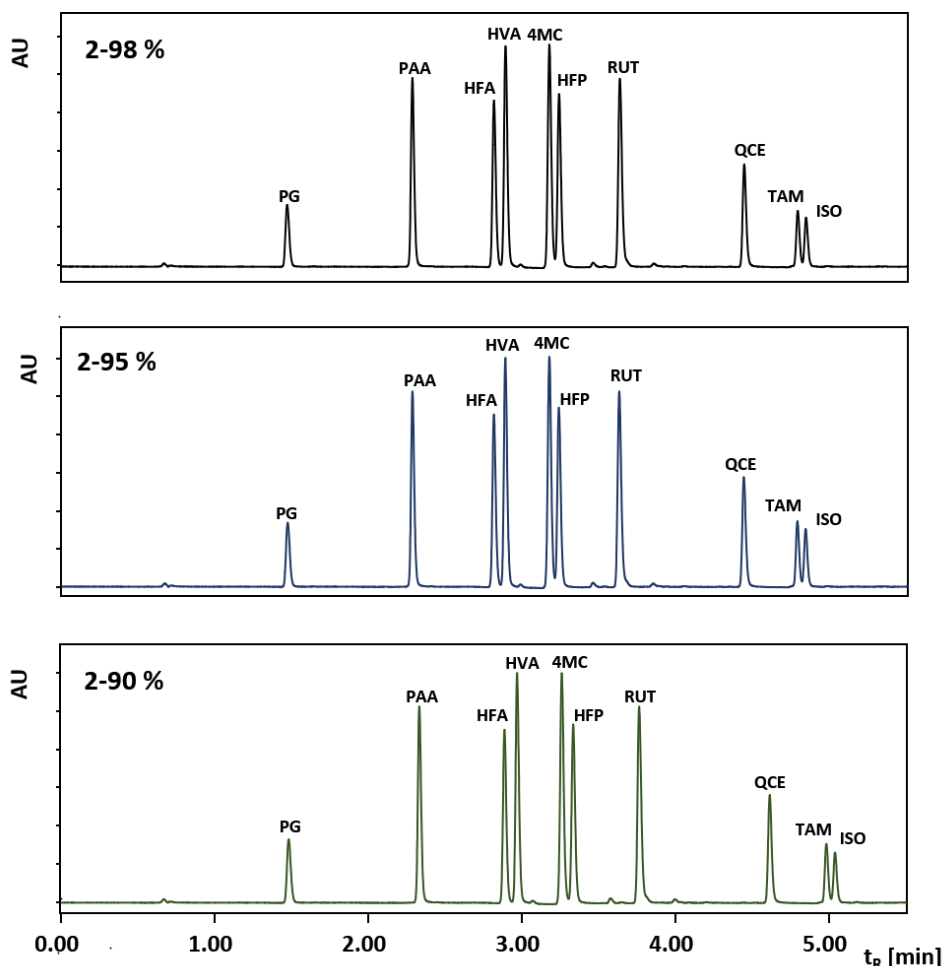
Optimalizace nastavení gradientové eluce

Druhým krokem optimalizace podmínek bylo testování vhodného gradientového programu za použití ACN s 0,1% HCOOH a MeOH s 0,1% HCOOH jako mobilní fáze. Testován byl u obou MF opět gradientový program 2-95 %, 2-90 %, 5-98 % a 10-98 % organické složky.

Jak vyplývá z výsledků screeningu, použití ACN na koloně ACE Excel C18-PFP vedlo ke koelucím několika kritických párů. Oproti tomu MeOH poskytl rozdělení všech 10 píků. Rostoucí zastoupení methanolu na počátku gradientového programu je znázorněno na obrázku 42. Pokles procentuálního zastoupení methanolu na konci gradientového programu je zobrazen na obrázku 43. Postupným zvyšováním organické složky na počátku gradientové eluce se mírně zhoršovala separace kritického páru 4MC+HFP. Rozlišení HFP: gradientový program 2-98 % (1,53), 5-98 % (1,42) a 10-98 % (1,37). Klesající zastoupení methanolu na konci gradientového programu nemělo na separaci vliv.



Obrázek 42: UHPLC separace na koloně ACE Excel C18-PFP s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 2-98 %, 5-98 % a 10-98 %.

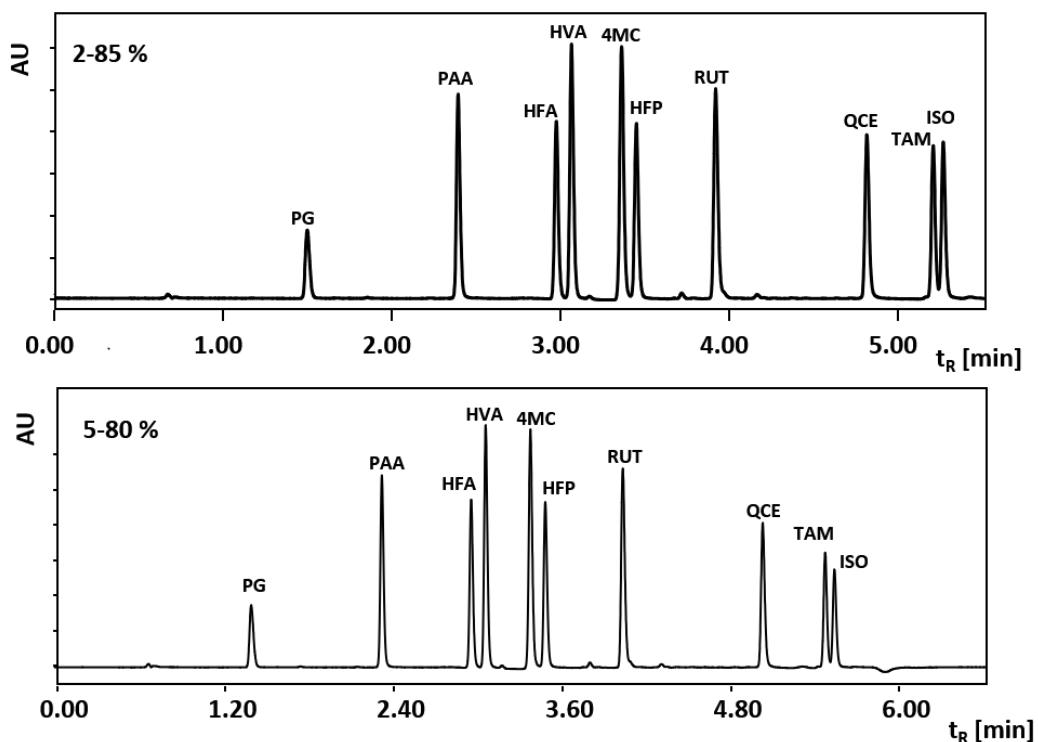


Obrázek 43: UHPLC separace na koloně ACE Excel C18-PFP s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 2-98 %, 2-95 % a 2-90 %.

Na základě dosažených výsledků byl dále otestován gradientový program 5-80 %, 2-80 % a 2-85 % MeOH, které rovněž dosahovaly dobrých výsledků. Gradientová eluce 5-80 % a 2-85 % je znázorněna na obrázku 44. Dostatečného rozlišení u všech látek však dosahovala pouze gradientová eluce 5-80 % MeOH. Tento gradientový program byl tudíž zvolen pro další optimalizaci separace pomocí teploty a času analýzy. V tabulce 13 je znázorněno rozlišení píků analyzovaných látek u nevhodnějších gradientových programů.

Tabulka 13: Porovnání rozlišení analyzovaných látek při nevhodnějších podmínkách na koloně ACE Excel C18-PFP.

Podmínky	PG	PAA	HFA	HVA	4MC	HFP	RUT	QCE	TAM	ISO
2-90 % MeOH	-	19,81	13,99	2,02	7,06	1,75	9,96	19,44	8,95	1,44
5-80 % MeOH	-	19,75	15,06	2,42	7,24	2,37	12,11	21,35	9,84	1,50
2-85 % MeOH	-	20,43	14,51	2,21	7,08	2,04	10,79	20,16	9,21	1,44



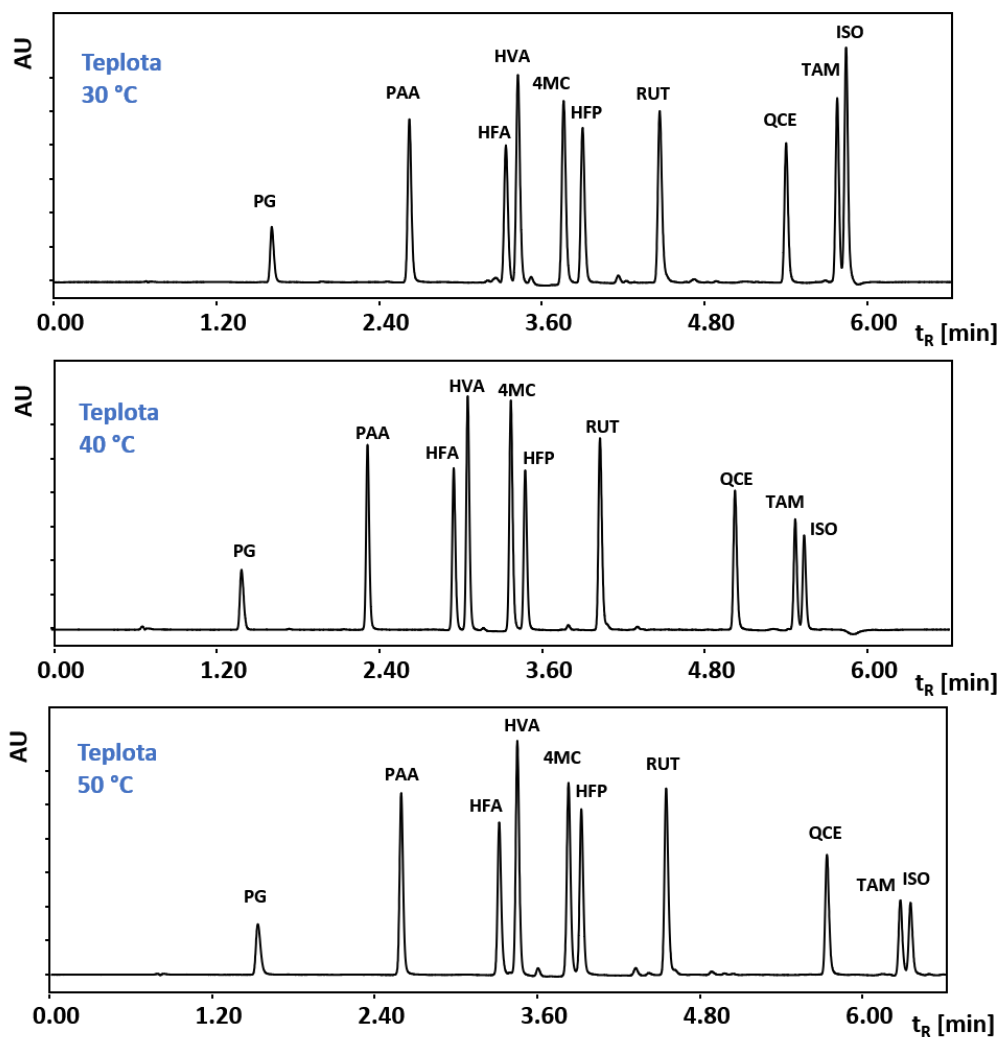
Obrázek 44: UHPLC separace na koloně ACE Excel C18-PFP s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 2-85 % a 5-80 %.

Optimalizace teploty separace

Zvolené podmínky (MeOH s 0,1% HCOOH, gradientový program 5-80 %) byly dále optimalizovány testováním vlivu teploty na separaci. Testovány byly teploty 30 a 50 °C. Vliv změny teploty na separaci je znázorněn na obrázku 45. Rozlišení jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce 14. Z tabulky vyplývá, že zvýšení i snížení teploty separace vedlo ke snížení rozlišení isorhamnetinu pod minimální hranici 1,5. Teplota proto byla ponechána na 40 °C.

Tabulka 14: Porovnání rozlišení analyzovaných látek na koloně ACE Excel C18-PFP při 3 různých teplotách separace, gradientový program 5-80 % MeOH.

Podmínky	PG	PAA	HFA	HVA	4MC	HFP	RUT	QCE	TAM	ISO
30 °C	-	20,30	13,77	1,68	6,32	2,61	10,54	17,75	7,79	1,38
40 °C	-	19,75	15,06	2,42	7,24	2,37	12,11	21,35	9,84	1,50
50 °C	-	18,98	14,98	2,76	7,59	1,86	12,27	22,75	10,58	1,47



Obrázek 45: UHPLC separace na koloně ACE Excel C18-PFP s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 5-80 %, s teplotou separace 30, 40 a 50 °C.

Teplota byla dále testována na gradientovém programu 2-90 % methanolu. Z tabulky 15 ovšem vyplývá, že isorhamnetin nedosahoval v žádné z analýz minimálního rozlišení 1,5.

Tabulka 15: Porovnání rozlišení analyzovaných látek na koloně ACE Excel C18-PFP při 3 různých teplotách separace, gradientový program 2-90 % MeOH.

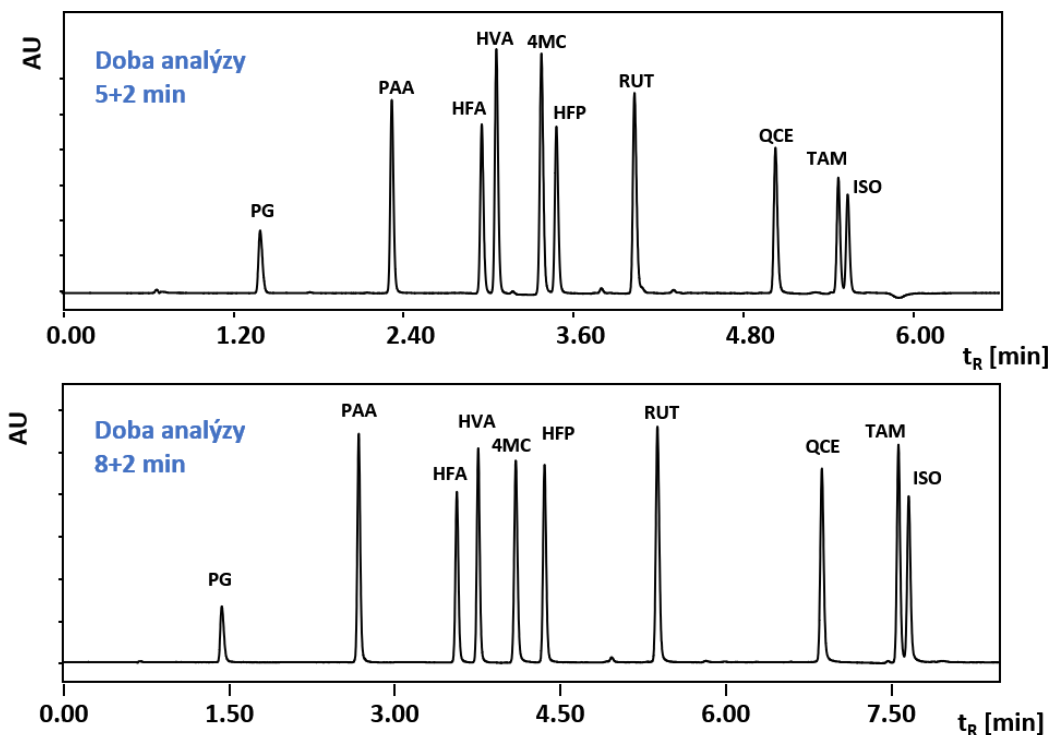
Podmínky	PG	PAA	HFA	HVA	4MC	HFP	RUT	QCE	TAM	ISO
30 °C	-	20,33	13,26	1,53	6,30	2,17	9,62	17,53	7,90	1,44
40 °C	-	19,81	13,99	2,02	7,06	1,75	9,96	19,44	8,95	1,44
50 °C	-	18,55	14,33	2,59	7,54	1,19	10,38	21,19	9,90	1,39

Optimalizace času analýzy

U získaných podmínek (MeOH s 0,1% HCOOH, gradientový program 5-80 %, teplota 40 °C) byla dále testována doba analýzy. Separace byla prodloužena z původních 5 minut na 8minutovou analýzu (+2 minuty ekvibrace). Prodloužení analýzy pomohlo k dosažení lepšího rozlišení kritických látek HVA, HFP a ISO (tabulka 16). Rozlišení se prodloužením analýzy zvýšilo také u látek PAA, HFA, RUT, QCE a TAM. Srovnání chromatogramů s různou délkou analýzy je znázorněno na obrázku 46.

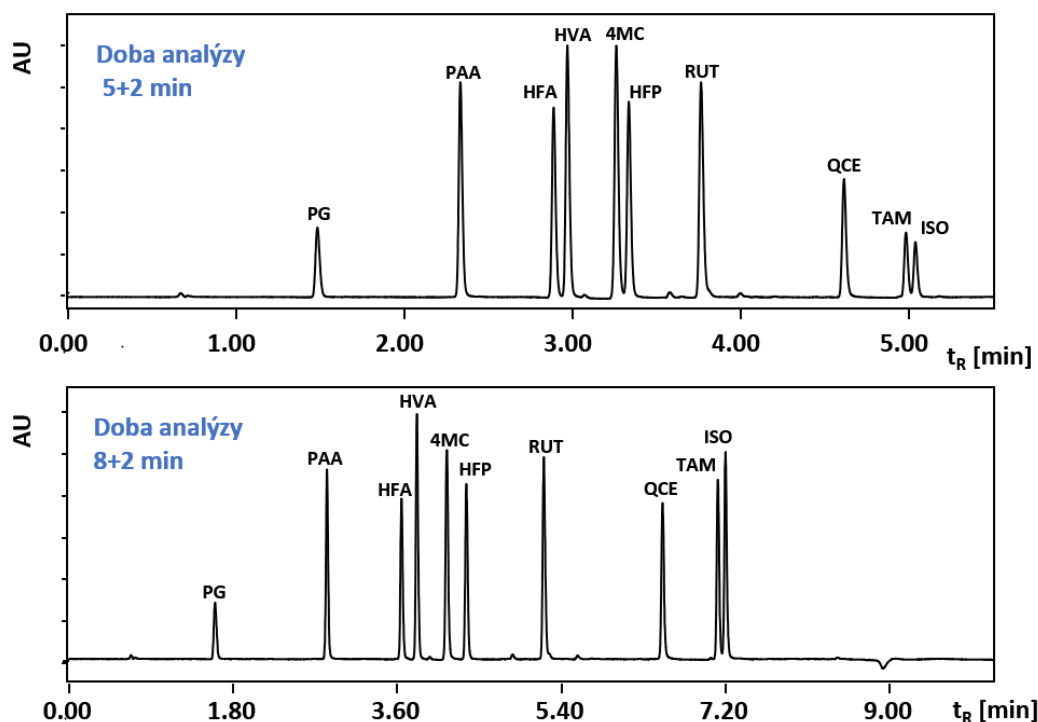
Tabulka 16: Porovnání rozlišení analyzovaných látek na koloně ACE Excel C18-PFP při různých časech analýzy, při teplotě 40 °C, gradientový program 5-80 %.

Podmínky	PG	PAA	HFA	HVA	4MC	HFP	RUT	QCE	TAM	ISO
Doba analýzy 5+2 min	-	19,75	15,06	2,42	7,24	2,37	12,11	21,35	9,84	1,50
Doba analýzy 8+2 min	-	22,95	18,17	3,91	6,56	4,84	18,56	26,07	12,48	1,69



Obrázek 46: UHPLC separace na koloně ACE Excel C18-PFP s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 5-80 %, T 40 °C, čas analýzy 5 min a 8 min (+ 2 min ekvibrace).

Vliv času analýzy na separaci byl opět testován také u gradientového programu 2-90 % MeOH. Rozlišení dosahovalo lepších hodnot oproti kratší analýze (obrázek 47 a tabulka 17). Nejlepších výsledků bylo však stále dosaženo při gradientovém programu 5-80 % MeOH, teplotě 40 °C a čase analýzy 8 minut (+2 min ekvilibrace). Tyto podmínky se tudíž staly pro tuto kolonu podmínkami finálními.



Obrázek 47: UHPLC separace na koloně ACE Excel C18-PFP s MeOH a 0,1% HCOOH, gradientový program 2-90 %, T 40 °C, čas analýzy 5 min a 8 min (+ 2 min ekvilibrace).

Tabulka 17: Porovnání rozlišení kritických párů na koloně ACE Excel C18-PFP při různých časech analýzy, T 40 °C, gradientový program 2-90 % MeOH.

Podmínky	PG	PAA	HFA	HVA	4MC	HFP	RUT	QCE	TAM	ISO
Doba analýzy 5+2 min	-	19,81	13,99	2,02	7,06	1,75	9,96	19,44	8,95	1,44
Doba analýzy 8+2 min	-	24,34	17,97	3,60	6,84	4,29	16,90	25,19	11,97	1,67

5.1.5 Výsledné podmínky chromatografické separace

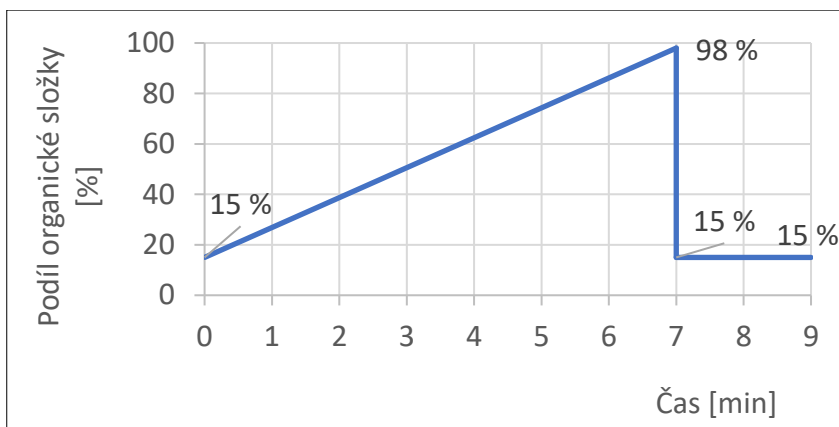
Výsledné podmínky separace byly stanoveny na základě srovnání chromatogramů optimalizovaných podmínek a rozlišení analyzovaných látek na koloně Ascentis Express RP-Amide, Kinetex Biphenyl a ACE Excel C18-PFP. Podmínky na kolonách jsou shrnuty v tabulce 18. Jako nejvhodnější byla dle výsledků stanovena kolona Kinetex Biphenyl.

Tabulka 18: Shrnutí nejvhodnějších optimalizovaných podmínek pro separaci směsi fenolických látek.

Kolona	MF	Gradient	Teplota separace	Doba analýzy
Ascentis Express RP-Amide	MeOH + 0,1% HCOOH	10-80 %	30 °C	5+2 min
Kinetex Biphenyl	MeOH + 0,1% HCOOH	15-98 %	40 °C	7+2 min
ACE Excel C18-PFP	MeOH + 0,1% HCOOH	5-80 %	40 °C	8+2 min

Výsledné podmínky optimalizace chromatografické separace:

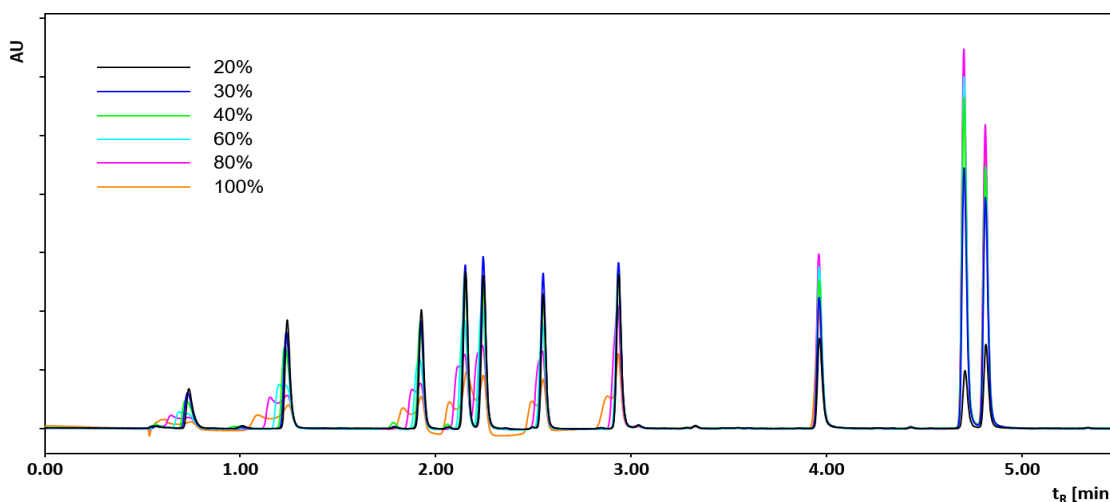
Analytická kolona: Kinetex Biphenyl
Mobilní fáze: A: MeOH
B: 0,1% HCOOH
Gradientový program: 15-98 % během 7 minut
Teplota separace: 40 °C
Teplota v autosampleru: 15 °C
Nástřikový objem: 5 µl
Průtok: 0,4 ml/min
Doba analýzy: 7 min (+2 min ekvilibrace)



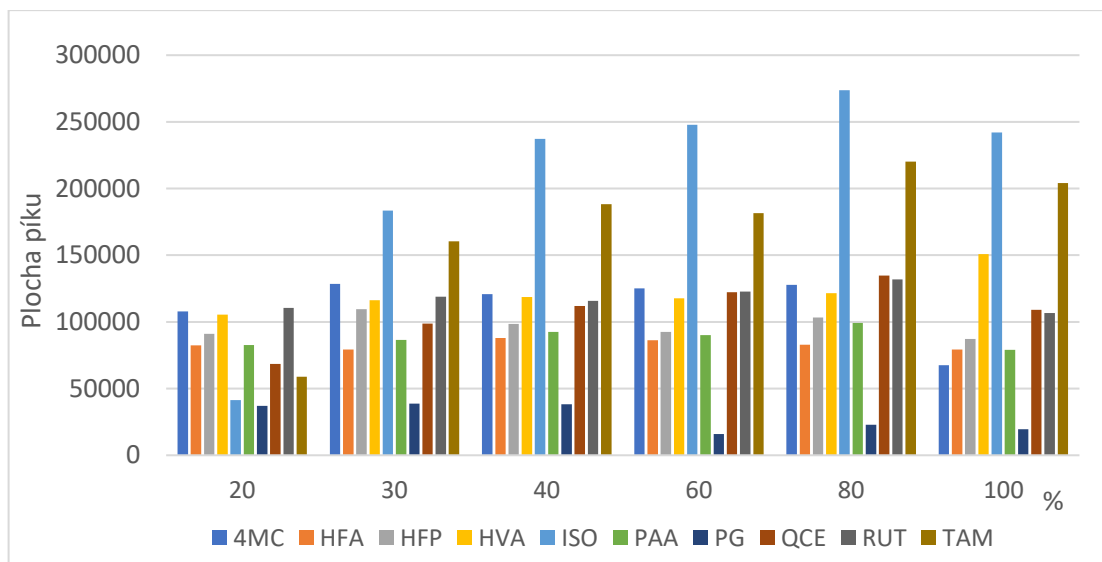
Obrázek 49: Průběh optimalizované gradientové eluce u finálních podmínkách - kolona Kinetex Biphenyl, teplota separace 40 °C, gradientový program 15-98 %, doba analýzy 7 min (s následnou 2minutovou ekvilibrací).

5.2 Studie krátkodobé stability

U všech deseti standardních látek byla zjišťována jejich krátkodobá stabilita po dobu 24 hodin. Látky byly měřeny ve vodě s HCOOH a ve 20% MeOH s HCOOH, který byl zvolen na základě srovnání vlivu rozpouštědla na tvar píku (obrázek 50) a závislosti plochy píku na typu rozpouštědla (grafu 1).



Obrázek 50: Srovnání vlivu rozpouštědla (20, 30, 40, 60, 80 a 100% MeOH s 0,1% HCOOH) na tvar píku - kolona Kinetex Biphenyl, teplota separace 40 °C, gradientový program 15-98 %, doba analýzy 7 min (s následnou 2minutovou ekvilibrací).



Graf 1: Závislost plochy píku na typu rozpouštědla (20, 30, 40, 60, 80 a 100% MeOH s 0,1% HCOOH)

Postup měření krátkodobé stability je uveden v kapitole 4.7.4. Výsledky byly převedeny do grafu, kde jsou plochy píku vztaženy k ploše prvního nástřiku v procentech. Za kritérium stability je považována minimální hranice 95 %. Bylo také hodnoceno srážení roztoků (viz kapitola 4.7.5), čímž se dá vysvětlit případný pokles koncentrace některých látek v roztoku. Výsledky srážení jsou zaznamenány v tabulce 19.

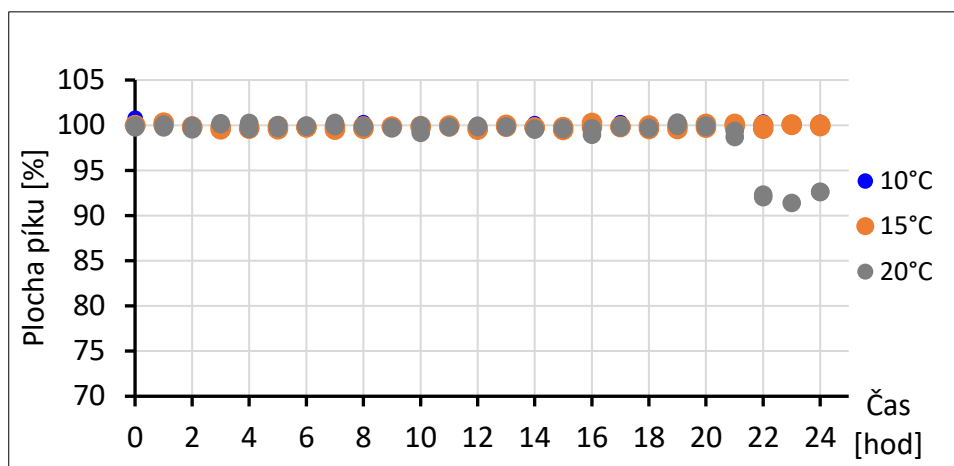
Tabulka 19: Srážení látek v 0,1% HCOOH ve vodě a v 20% MeOH při různých teplotách.

	0,1% HCOOH ve vodě			0,1% HCOOH v 20% MeOH		
	10°C	15°C	20°C	10°C	15°C	20°C
PG	-	-	-	-	-	-
PAA	-	-	-	-	-	-
HFA	-	-	-	-	-	-
HVA	-	-	-	-	-	-
RUT	-	-	-	-	-	-
4MC	-	-	-	-	-	-
HFP	-	-	-	-	-	-
QCE	+	+	+	-	-	-
ISO	+	+	+	+	+	+
TAM	+	+	+	-	-	-

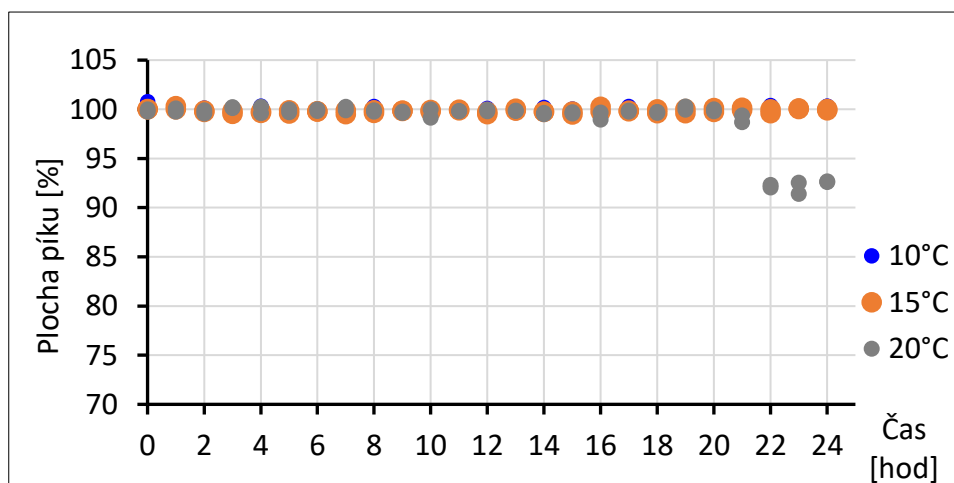
+ látka se sráží

- sraženina nebyla vizuálně pozorována

HFA se projevila jako látka stabilní. V obou rozpouštědlech i při všech testovaných teplotách zůstala koncentrace látky konstantní po dobu 20 hodin. Při teplotě 20 °C ovšem poté došlo v obou rozpouštědlech k poklesu HFA v roztoku pod limitní hranici na hodnotu 92 %. Při teplotě 10 i 15 °C se koncentrace látky pohybovala v rozmezí hodnot 99-101 % po celou dobu měření (graf 2 a 3).



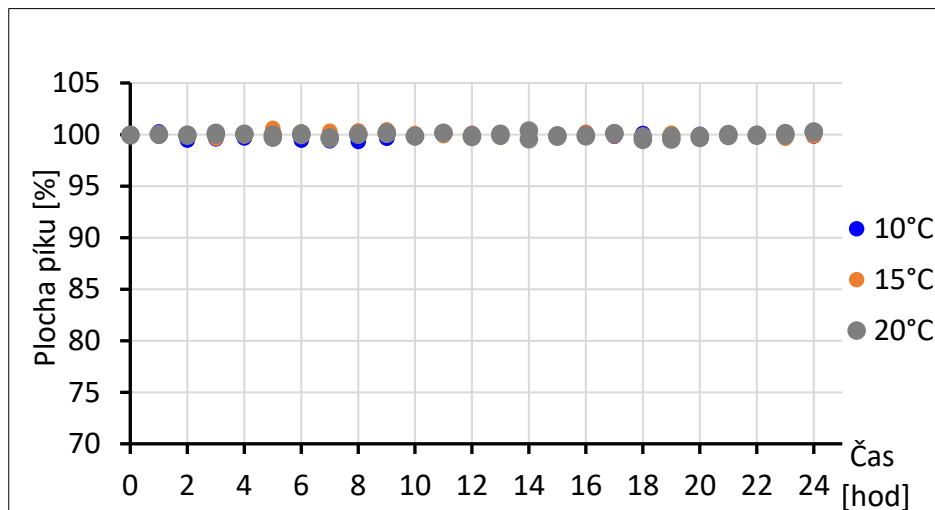
Graf 2: Stabilita 3,4-dihydroxyfenylactové kyseliny (HFA) ve vodě s 0,1% HCOOH při různých teplotách.



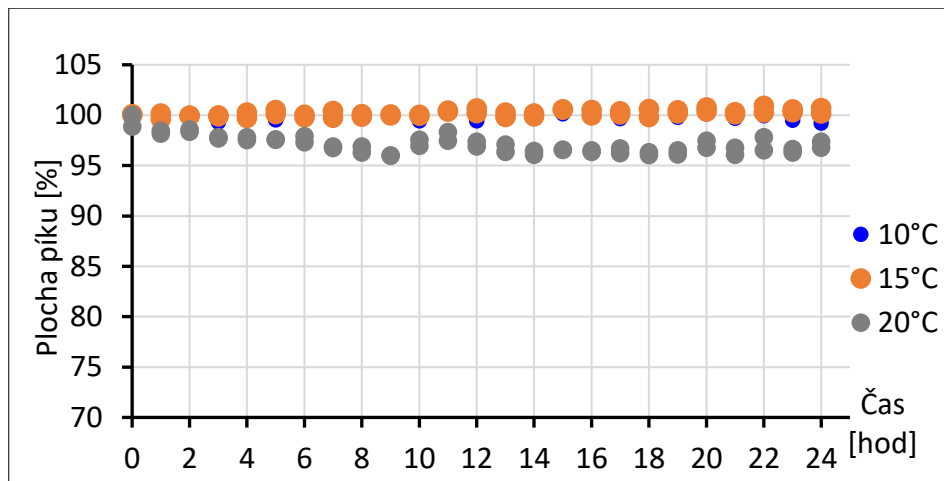
Graf 3: Stabilita 3,4-dihydroxyfenylactové kyseliny (HFA) v 20% MeOH s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

Látka PAA byla po rozpuštění ve vodě s 0,1% HCOOH stabilní při všech testovaných teplotách (hodnoty v rozmezí 99,4 až 100,4 %). Měření v roztoku 20% MeOH s 0,1% HCOOH docházelo při teplotě 20 °C k mírné degradaci látky, což se projevilo nepatrným poklesem koncentrace v čase. Všechny hodnoty však přesto

přesahovaly 95 %. Při nižších teplotách zůstávala PAA stabilní. Při teplotě 15 °C se koncentrace pohybovala v rozmezí 97,2 až 101,5 %, při teplotě 10 °C v rozmezí 97,3-102,1 % (graf 4 a 5).



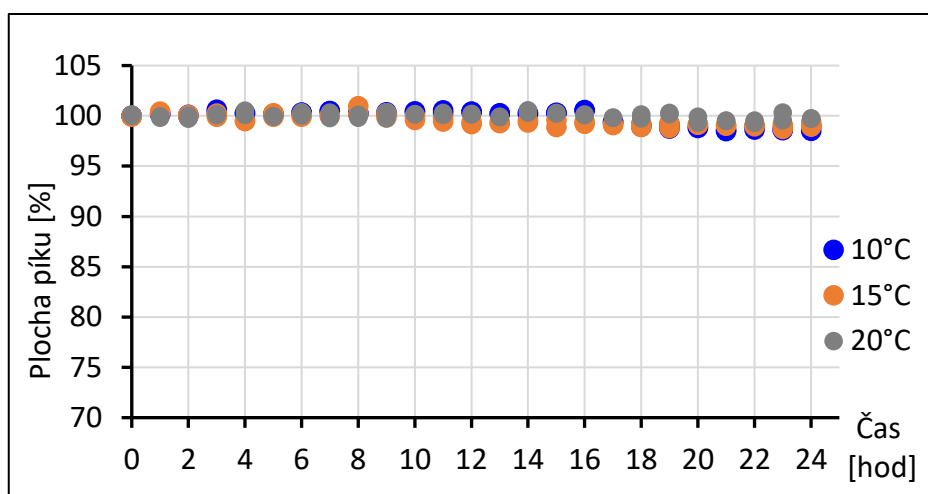
Graf 4: Stabilita 3-hydroxyfenyloctové kyseliny (PAA) ve vodě s 0,1% HCOOH při různých teplotách.



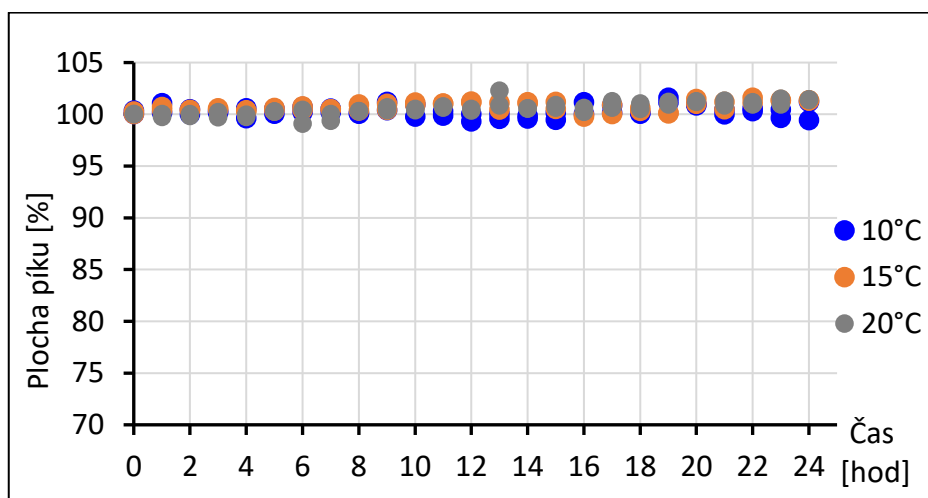
Graf 5: Stabilita 3-hydroxyfenyloctové kyseliny (PAA) v 20% MeOH s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

4-methylcatechol je látka stabilní při všech testovaných teplotách i rozpouštědlech. Koncentrace látky v roztoku se pohybovala po celou dobu měření kolem 100 %. Nejnižší hodnoty dosahovaly ve vodě s HCOOH koncentrace 98,5 %, v 20%

methanolu s HCOOH 99,4 % (graf 6 a 7). Nejvyšší hodnoty dosahovaly ve vodě s HCOOH koncentrace 101,0 % a v 20% methanolu s HCOOH 102,3 %.

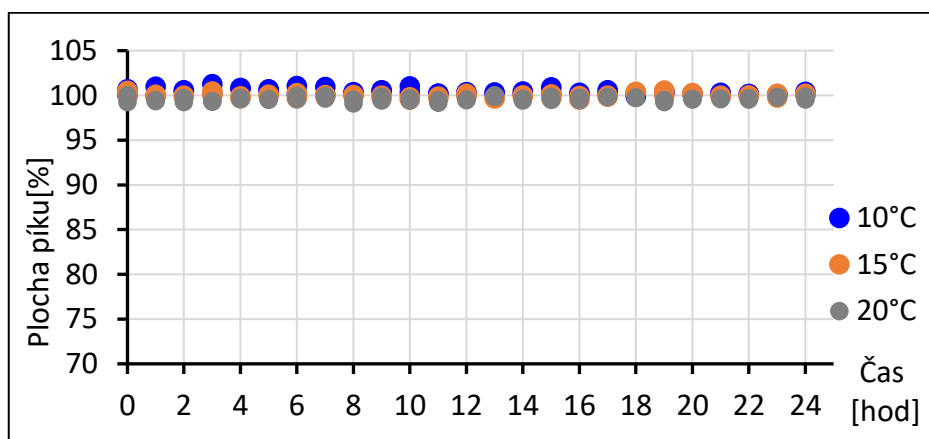


Graf 6: Stabilita 4-methylcatecholu (4MC) v 20% MeOH s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

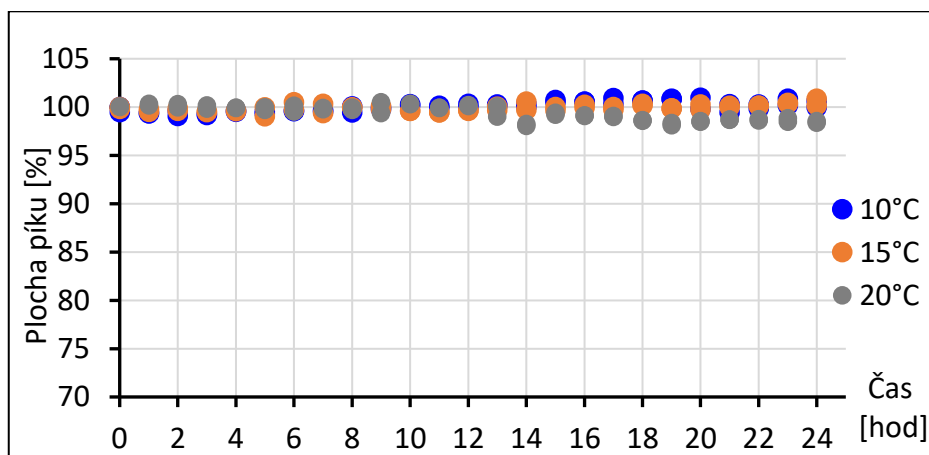


Graf 7: Stabilita 4-methylcatecholu (4MC) ve vodě s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

Látka HFP byla při rozpuštění ve vodě stabilní po dobu 24 hodin při všech testovaných teplotách (graf 8). Koncentrace látky nepoklesla na méně než 99,1 %. Po rozpuštění HFP ve 20% methanolu s HCOOH zůstala HFP stabilní po celou dobu měření při teplotě 10 a 15 °C (99,5 až 101,0 %). V případě nejvyšší teploty došlo od 14. hodiny měření k nepatrnému poklesu koncentrace látky na hodnotu 98,0 % (graf 9).

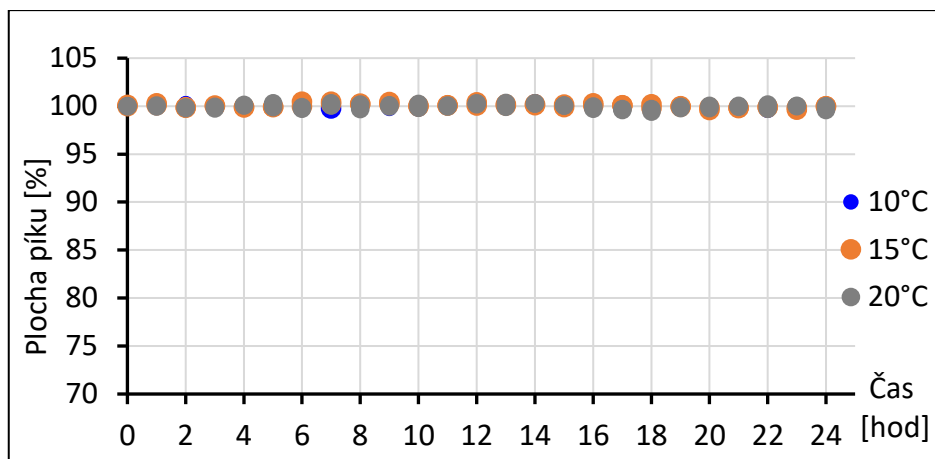


Graf 8: Stabilita 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny (HFP) ve vodě s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

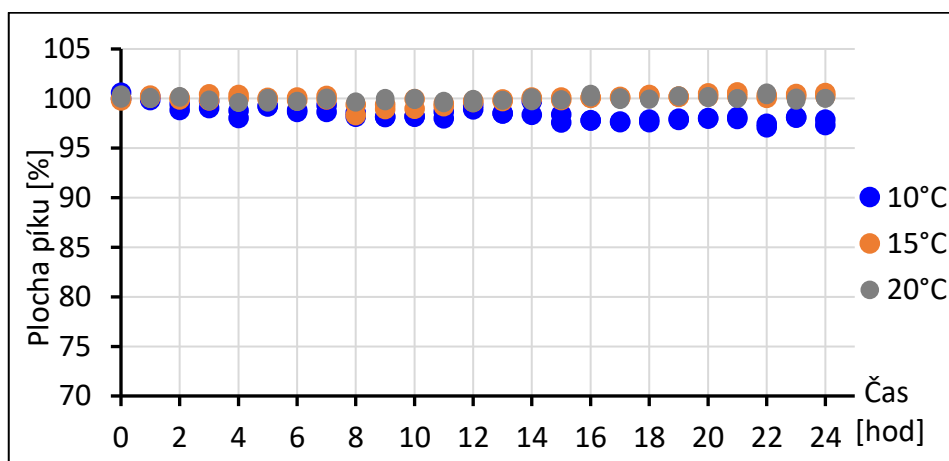


Graf 9: Stabilita 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny (HFP) v 20% MeOH s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

Látka HVA během měření ve vodném roztoku HCOOH vykazovala stabilitu při všech zkušebních teplotách. Nejnižší zaznamenanou hodnotou byla koncentrace 99,4 % (graf 10). Stejně tak v roztoku 20% methanolu s HCOOH byla HVA stabilní. Všechny hodnoty přesahovaly 99,5 %. Maximální naměřenou hodnotou byla koncentrace 100,4 %. Výjimkou byla teplota 10 °C, při které docházelo k nepatrnému poklesu koncentrace na 97 % původního množství látky v roztoku (graf 11).

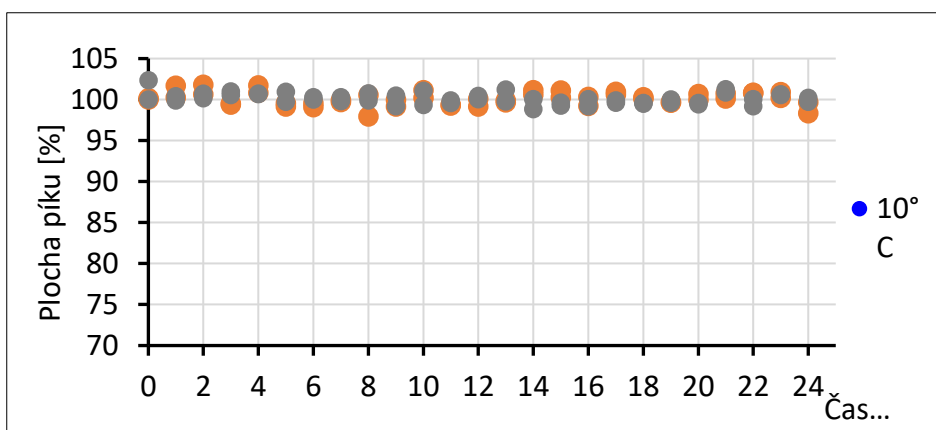


Graf 10: Stabilita homovanilínové kyseliny (HVA) ve vodě s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

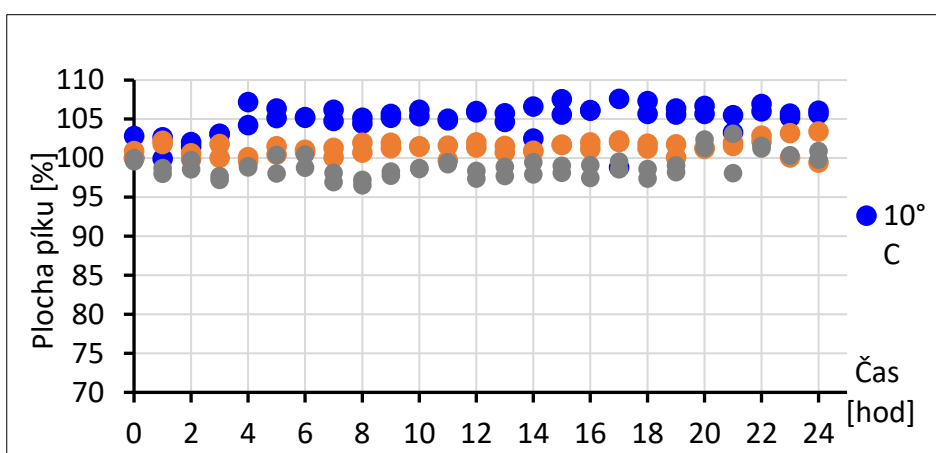


Graf 11: Stabilita homovanilínové kyseliny (HVA) v 20% MeOH s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

Floroglucinol je po dobu 24 hodin stabilní při rozpuštění ve vodném roztoku HCOOH při všech testovaných teplotách (10, 15 i 20 °C) (graf 12). Koncentrace látky ve vodě s HCOOH se pohybovala po celou dobu v rozmezí 97-102 %. V případě 20% MeOH s HCOOH je látka také stabilní při všech teplotách, ale hodnoty koncentrace látky v čase se měnily dle dané teploty. Z grafu 13 vyplývá, že při teplotě 10 °C se hodnota koncentrace pohybovala většinu měřené doby mezi hodnotami 104 a 107 %. Nejlepších výsledků dosahovala látka při teplotě 15 °C, kdy se koncentrace pohybovala mezi 99-103 %. Naopak při teplotě 20 °C stabilita mírně klesá, protože koncentrace floroglucinolu poklesla až na hodnotu 96 %.



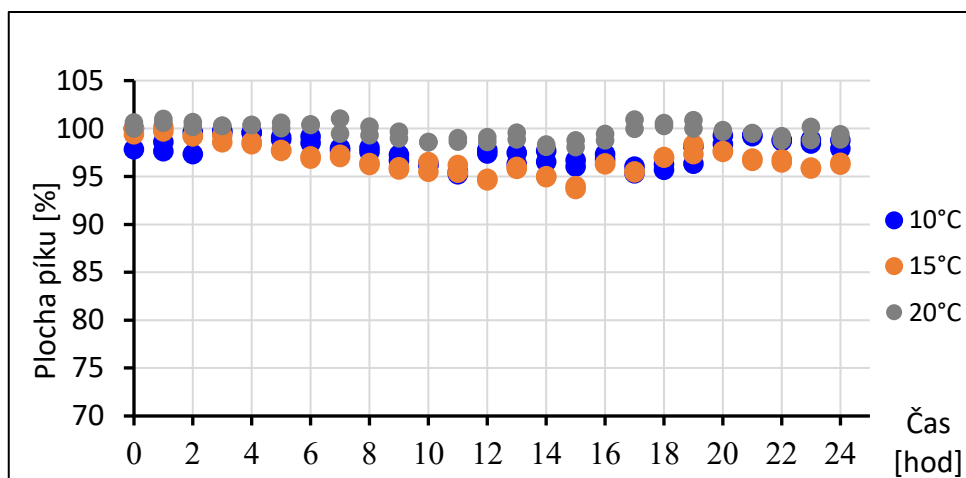
Graf 12: Stabilita floroglucinolu (PG) ve vodě s 0,1% HCOOH při různých teplotách.



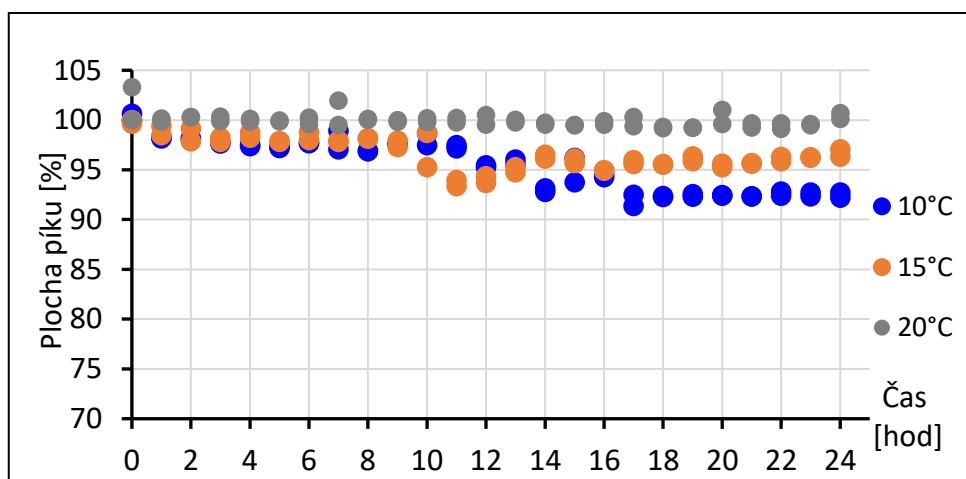
Graf 13: Stabilita floroglucinolu (PG) v 20% MeOH s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

Rutin je z testovaných teplot nejstabilnější v obou rozpouštědlech při teplotě 20 °C (rozmezí koncentrací rutinu ve vodném roztoku HCOOH bylo 98-101 %, v 20 % MeOH s HCOOH 99-102 %) (graf 14 a 15). Při měření rutinu ve vodě s HCOOH byla látka stabilní také při teplotě 10 °C (maximální pokles na hodnotu 95 %), ovšem při teplotě 15 °C došlo ve 12. a 15. hodině měření k poklesu koncentrace pod stanovený limit. Ostatní naměřené hodnoty neklesly pod 95 %. V roztoku 20% MeOH s HCOOH je rutin stabilní po celou dobu měření pouze při nejvyšší teplotě 20 °C. S klesající teplotou klesala také koncentrace látky v roztoku. Při teplotě 15 °C zůstala látka stabilní po dobu 10 hodin, poté došlo k poklesu koncentrace pod limitní hranici na hodnotu 93 %. Při teplotě 10 °C byla látka stabilní po dobu 11 hodin, poté došlo k poklesu koncentrace až na 91 %. Z tabulky 19 vyplývá, že ke srážení roztoku nedocházelo za žádných podmínek.

Z testovaných podmínek je rutin nejvíce stabilní při teplotě 20 °C po rozpuštění ve 20% methanolu s HCOOH.



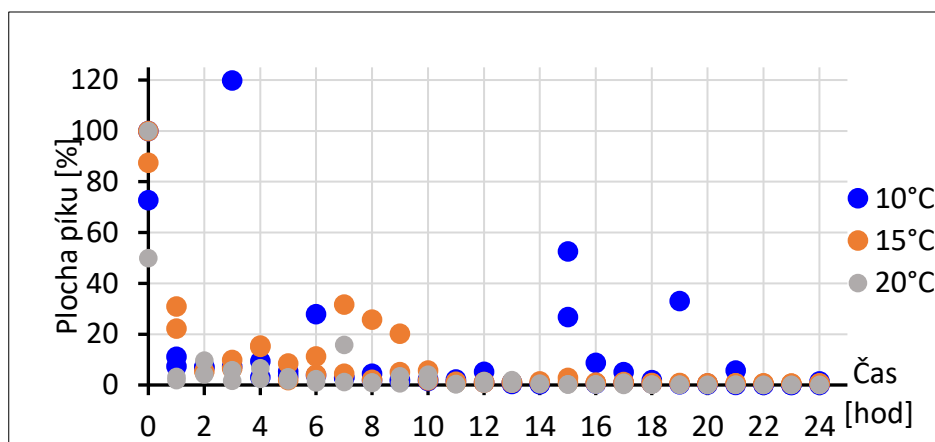
Graf 14: Stabilita rutinu (RUT) ve vodě s 0,1% HCOOH při různých teplotách.



Graf 15: Stabilita rutinu (RUT) v 20% MeOH s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

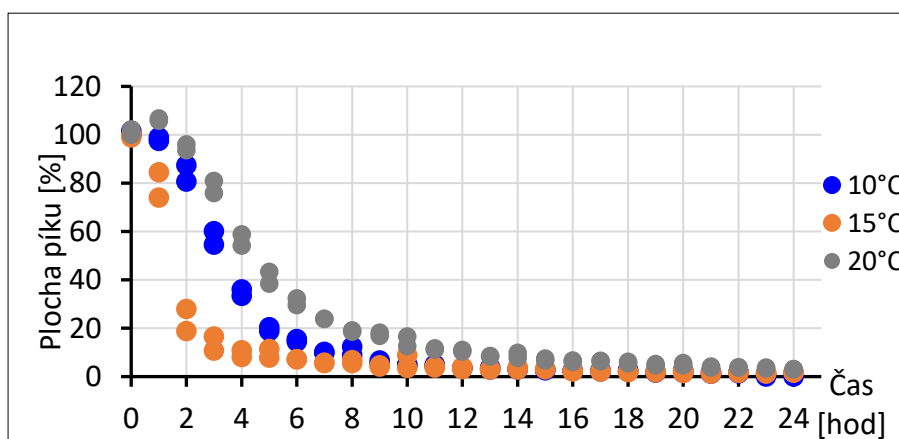
Stabilita isorhamnetinu byla měřena pouze v 20% MeOH s HCOOH z důvodu jeho velmi špatné rozpustnosti ve vodném roztoku. Z tabulky 19 vyplývá, že isorhamnetin byl jedinou látkou, která se srážela v 20% methanolu s HCOOH a to při všech třech teplotách. Během měření krátkodobé stability docházelo pravděpodobně k opakovanému srážení a rozpouštění látky zejména při nejnižší teplotě 10 °C, což vedlo k velmi nahodilému uspořádání bodů v grafu (graf 16). Při teplotě 20 °C došlo již během první hodiny měření k poklesu koncentrace isorhamnetinu k hodnotě 5 %. Pro zjištění jeho stability by bylo potřeba provést experiment v jiném rozpouštědle. Během

screeningu a optimalizace podmínek separace byla látka ředěna v čistém methanolu s HCOOH.

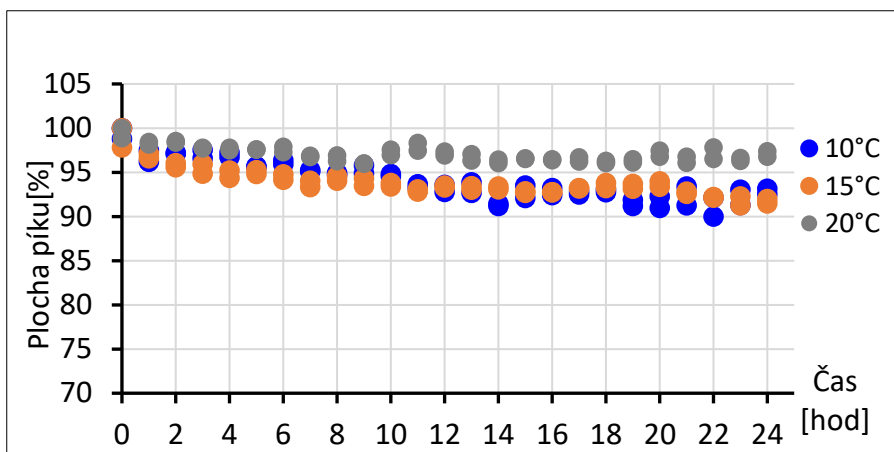


Graf 16: Stabilita isorhamnetinu (ISO) v 20% MeOH s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

Chování kvercetinů velmi závisí na typu rozpouštědla a je znázorněno v grafu 17 a 18. Jak vyplývá z tabulky 19, po rozpuštění ve vodném roztoku HCOOH se kvercetin sráží při všech teplotách, což se projeví jeho nízkou koncentrací v roztoku. Naopak v roztoku 20% MeOH s HCOOH nebyla sraženina vizuálně pozorována. Kvercetin je v 20% methanolu s HCOOH stabilní po celou dobu měření pouze při teplotě 20 °C. Při této teplotě koncentrace látky poklesla maximálně na 96 %. Při teplotě 15 °C poklesla koncentrace pod 95% hranici již ve 3. hodině měření. Nejnižší koncentrací byla hodnota 91 %. Při teplotě 10 °C došlo k poklesu koncentrace pod limit stability v 11. hodině a koncentrace poklesla až na hodnotu 89 %.

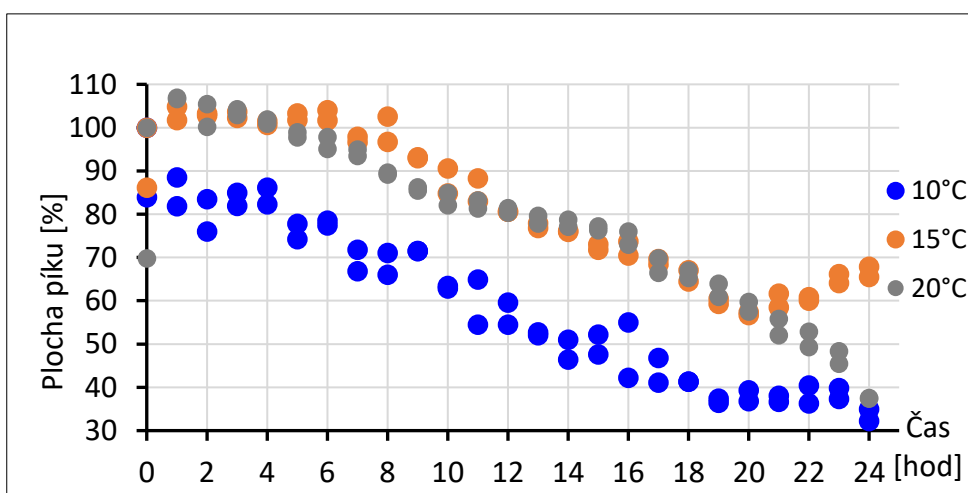


Graf 17: Stabilita kvercetinů (QCE) ve vodě s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

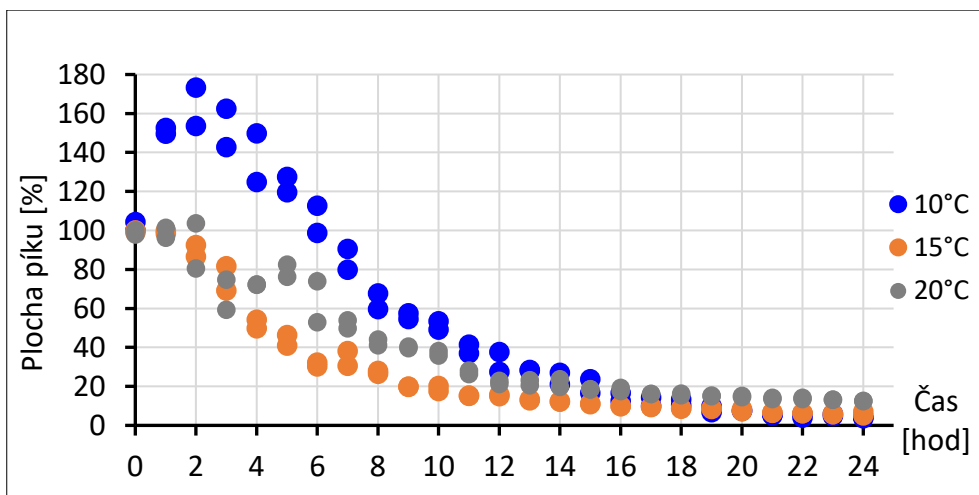


Graf 18: Stabilita kvercetinu (QCE) v 20% MeOH s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

Tamarixetin se projevil jako jedna z problémových látek. Koncentrace látky v roztoku v obou rozpouštědlech prudce klesala již během prvních hodin testování (graf 19 a 20). V případě měření látky ve vodném roztoku HCOOH bylo příčinou poklesu koncentrace srážení látky v roztoku, ke kterému docházelo při všech teplotách (tabulka 19). Při nejnižší teplotě 10 °C se látka sráží nejrychleji, což se projevilo nejstrmějším poklesem látky v roztoku. V případě 20% roztoku methanolu s HCOOH nebyla vizuálně pozorována sraženina, ale vzhledem k vyšším koncentracím při teplotě 20 °C oproti teplotě 15 °C nelze srážení vyloučit. Při teplotě 10 °C docházelo k významným výkyvům až k hodnotě 173 %, tudíž bude třeba tento experiment zopakovat.



Graf 19: Stabilita tamarixetinu ve vodě s 0,1% HCOOH při různých teplotách.



Graf 20: Stabilita tamarixetinu v 20% MeOH s 0,1% HCOOH při různých teplotách.

6 ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byly optimalizovány podmínky pro separaci směsi 10 vybraných fenolických látek pomocí metody UHPLC/PDA. Po screeningu a optimalizaci podmínek byla jako nejvhodnější zvolena kolona Kinetex Biphenyl. Jako mobilní fáze byl použit methanol v kombinaci s 0,1% kyselinou mravenčí ve vodě. Separace byla provedena při teplotě 40 °C, s průtokem mobilní fáze 0,4 ml/min, gradientovým programem 15-98 % organické složky během 7 min a s využitím lineární gradientové křivky. Čas analýzy byl optimalizován na 7 min s následnou dvouminutovou ekvilibrací kolony, čímž byl splněn požadavek na rychlou analýzu. Optimalizací podmínek se podařilo zajistit separaci celé směsi fenolických látek s minimálním rozlišením 1,5 včetně kritického páru izomerů tamarixetinu a isorhamnetinu.

Dále byla změřena krátkodobá stabilita jednotlivých fenolických látek za různých teplotních podmínek. Látky byly měřeny po rozpuštění ve vodě a v 20% methanolu, v obou případech s přídavkem 0,1% HCOOH. Jako kritérium stability byla stanovena hranice 95 % původního množství látky v roztoku.

Bylo zjištěno, že fenolické látky PAA, 4MC, HFP a HVA zůstaly stabilní při všech testovaných podmínkách. U těchto látek nebyl po dobu měření zaznamenán pokles koncentrace pod 95 %. U PAA došlo oproti nižším teplotám k mírnému poklesu koncentrace při teplotě 20 °C při použití 20% MeOH s HCOOH. PG byl stabilní při všech testovaných podmínkách kromě teploty 10 °C po rozpuštění ve vodě s HCOOH. Při těchto podmínkách došlo k navýšení koncentrace v roztoku až k hodnotě 107 %. Látka HFA byla stabilní při teplotě 10 i 15 °C. Při teplotě 20 °C ovšem došlo v obou rozpouštědlech ve 20. hodině měření k poklesu koncentrace na 92 %. Rutin byl stabilní v obou rozpouštědlech při teplotě 20 °C a při měření látky ve vodě s HCOOH také při teplotě 15 °C. Při všech ostatních podmínkách však nedosahoval limitu 95 %.

Hodnoceno bylo také srážení látek při měřených teplotách a rozpouštědlech. Srážení mělo totiž významný vliv na pokles koncentrace látek v roztoku během měření stability. Bylo zjištěno, že při rozpuštění látek ve vodě s 0,1% HCOOH dochází ke srážení kvercetinu a tamarixetinu, v roztoku 20% MeOH s 0,1% HCOOH se srážel pouze isorhamnetin.

Problémové chování vykazoval tamarixetin, kvercetin a isorhamnetin. Koncentrace tamarixetinu prudce klesala v obou rozpouštědlech již během prvních hodin měření. Při rozpuštění látky ve vodě s přídavkem HCOOH byl pokles koncentrace ovlivněn srážením látky v roztoku. V případě rozpuštění v 20% MeOH s HCOOH nebyla vizuálně pozorována sraženina, ale vzhledem k vyšším koncentracím při teplotě 20 °C oproti teplotě 15 °C nelze srážení vyloučit. Experiment při teplotě 10 °C bude třeba zopakovat vzhledem k významným výkyvům koncentrací až k hodnotě 173 %. Chování kvercetinu záviselo zejména na typu rozpouštědla. Po rozpuštění ve vodě s HCOOH docházelo ke srážení látky, tudíž koncentrace rychle klesala. V roztoku 20% MeOH s HCOOH zůstal kvercetin stabilní po dobu měření pouze při teplotě 20 °C. Nejvíce problémovou látkou byl isorhamnetin, u něž nebylo možné provést měření ve vodném roztoku HCOOH kvůli jeho velmi špatné rozpustnosti. Během měření koncentrace při rozpuštění v 20% roztoku methanolu s HCOOH docházelo pravděpodobně k opakovanému srážení a rozpouštění, což se projevilo velmi nahodilým uspořádáním bodů v grafu. Pro zjištění jeho stability by bylo potřeba provést experiment v jiném rozpouštědle, například v čistém methanolu.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Veronika Pilařová, Kateřina Plachká, Lucia Chrenková, Iveta Najmanová, Přemysl Mladěnka, František Švec, Ondřej Novák, Lucie Nováková, Simultaneous determination of quercetin and its metabolites in rat plasma by using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta* 185 (2018) 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.03.033>
- [2] Waters (2020). https://www.waters.com/waters/en_BE/UPLC---Ultra-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=134803622&locale=en_BE (online 24.10.2020)
- [3] Eva Háková (2012). <https://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/pokroky-v-modernich-separacnich-metodach/ultra-performance-liquid-chromatography-uplc/> (online 26.10.2020)
- [4] Karolína Benešová, Helena Pluháčková, Sylvie Běláková, Kateřina Vaculová, Renata Mikulíková, Jaroslava Ehrenbergerová, Natálie Březinová Belcredi, Využití moderní separační techniky UPLC ke stanovení vitamínu E v zrně ječmene, *Chemické listy* 106 (2012) 672-676. http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_07_672-676.pdf (online 26.10.2020)
- [5] http://www.hplc.cz/Tip/band_spred.htm (online 26.10.2020)
- [6] Merck KGaA (2020). <https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/water-purification/learning-centers/applications/organic-analysis/uhplc/fWyb.qB.QgcAAAFHDUENFtk,nav> (online 31.10.2020)
- [7] Josef Cvačka (2011). Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. <file:///C:/Users/Zuzana%20Jandorov%C3%A1/Desktop/obr%C3%A1zky%20diplomka/hplc1.pdf> (online 31.10.2020)
- [8] Martina Bolechová, Využití hmotnostní spektrometrie ke stanovení markeru oxidativního stresu a mykotoxinu, Brno 2014. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická. Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí.

- [9] Český lékopis 2017 - Doplněk 2020, Grada Publishing, Praha 2020. ISBN 978-80-271-1757-4
- [10] Davy Guillaume, Jean-Luc Veuthey, Guidelines for the use of UHPLC Instruments, University Geneva.
https://www.hplc.eu/Downloads/UHPLC_Guide.pdf (online 31.10.2020)
- [11] Lubor Urbánek, Vývoj a validace nových HPLC metod pro stanovení specifických analytů v biologickém materiálu, Hradec Králové 2009. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie.
file:///C:/Users/Zuzana%20Jandorov%C3%A1/Downloads/IPTX_0_0_11160_0_333969_0_96803.pdf (online 31.10.2020)
- [12] HPLC.CZ (1999-2020). <http://www.hplc.cz/> (online 31.10.2020)
- [13] Lucie Nováková, Michal Douša a kolektiv, Moderní HPLC separace v teorii a praxi I. Praha: Europrint, 2013, s. 102-128. ISBN: 978-80-260-4243-3
- [14] HPLC.CZ (1999-2020). http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html#_2_Oxid (online 6.4.2021)
- [15] Waters (2020) https://www.waters.com/waters/fr_FR/HSS-%28High-Strength-Silica%29-Technology/nav.htm?cid=134618105&locale=fr_FR (online 16.11.2020)
- [16] Petr Kozlík (n.d.).
http://web.natur.cuni.cz/~kozlik/Prednasky/2_prednaska.pdf (online 1.11.2020)
- [17] Waters (2020) https://www.waters.com/waters/fr_FR/CSH-%28Charged-Surface-Hybrid%29-Technology/nav.htm?cid=134618101&locale=fr_FR (online 1.11.2020)
- [18] Likrom (2013). <http://www.likrom.com/products/columns/csh-charged-surface-hybrid-technology> (online 31.10.2020)
- [19] Josef Cvačka (2018). <https://docplayer.cz/97461943-Uvod-do-vysokocinne-kapalinove-chromatografie.html> (online 1.11.2020)
- [20] Waters (2020).
<https://www.waters.com/waters/partsList.htm?cid=134771861&locale=en>

_US&filter=columnsystem|000000000070__UPLC%2FUHPLC&locale=en_US (online 25.10.2020)

- [21] Waters corporation, Acquity UPLC and Acquity Premier BEH Columns, (2020).
<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715001371.pdf>
(online 25.10.2020)
- [22] Waters corporation, Acquity UPLC CSH and Xselect HPC Columns, (2011).
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003928en.pdf>
(online 25.10.2020)
- [23] VWR International (2020). <https://cz.vwr.com/store/category/kolony-chromatograficke/549309> (online 25.10.2020)
- [24] Merck KGaA (2020). <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/hplc/columns/ascentis-express.html> (online 25.10.2020)
- [25] Chromservis (n.d.) <https://www.chromservis.eu/p/arion-plus-c18-uhplc-column-1-7-m-100-mm-2-1-mm?lang=CZ> (online 25.10.2020)
- [26] Phenomenex, Kinetex (2009).
<https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/42265be0-10f0-40f9-8155-08366dc8d819.pdf> (online 25.10.2020)
- [27] Showa Denko K.K. (2006) <https://www.shodex.com/en/kouza/f.html#!>
(online 2.11.2020)
- [28] Lucie Nováková, Michal Douša a kolektiv, Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. Praha: Europrint, 2013, s. 37-39. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [29] Igor Otavio Minatel, Cristine Vanz Borges, Maria Izabela Ferreira, Hector Alonzo Gomez Gomez, Chung-Yen Oliver Chen and Giuseppina Pace Pereira Lima, Phenolic Compounds: Functional Properties, Impact of Processing and Bioavailability, *IntechOpen*, DOI: 10.5772/66368.
Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/phenolic-compounds-biological-activity/phenolic-compounds-functional-properties-impact-of-processing-and-bioavailability>
- [30] Milena Morandi Vuolo, Verena Silva Lima, Mário Roberto Maróstica Junior, Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power,

Bioactive Compounds Health Benefits and Potential Applications (2019) 33-50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5>

- [31] Maria de Lourdes Reis Giada, Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants, *IntechOpen* (2013). DOI: 10.5772/51687.
Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/food-phenolic-compounds-main-classes-sources-and-their-antioxidant-power>
- [32] Laura A.de la Rosa, Jesús Omar Moreno-Escamilla, Joaquín Rodrigo-García, Emilio Alvarez-Parrilla, Phenolic Compounds, *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (2019) 253-271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>
- [33] Romana Štýblová, Změna obsahu fenolických kyselin během skladování ječmene jarního, Brno 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a technologií. https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=100627 (online 5.5.2021)
- [34] Lenka Grycová, Flavonoidy – rozmanité struktury se širokým využitím, *PharmaNEWS* (2015). <http://www.pharmanews.cz/clanek/flavonoidy-rozmanite-struktury-se-sirokym-vyuzitim/> (online 11.10.2020)
- [35] Chemaxon, (2020). <https://chemicalize.com/#/> (online 27. 9. 2020).
- [36] L. H. Yao, Y. M. Jiang, J. Shi, F. A. Tomas-Barber, , N. Datta, R. Singanusong, S. Chen, Flavonoids in Food and Their Health Benefits, *Plant Foods for Human Nutrition* 59 (2004) 113–122. doi: 10.1007/s11130-004-0049-7
- [37] Kelly Samara de Lira Mota, Guilherme Eduardo Nunes Dias, Meri Emili Ferreira Pinto, Ânderson Luiz-Ferreira, Alba Regina Monteiro Souza-Brito, Clélia Akiko Hiruma-Lima, José Maria Barbosa-Filho, Leônia Maria Batista, Flavonoids with Gastroprotective Activity, *Molecules* (2009) 979–1012. doi: 10.3390/molecules14030979
- [38] Mari Kawai, Toru Hirano, Shinji Higa, Junsuke Arimitsu, Michiru Maruta, Yusuke Kuwahara, Tomoharu Ohkawara, Keisuke Hagihara, Tomoki

- Yamadori, Yoshihito Shima, Atsushi Ogata, Ichiro Kawase, Toshio Tanaka, Flavonoids and Related Compounds as Anti-Allergic Substances, *Allergology International* 56 (2007) 113-123. <https://doi.org/10.2332/allergolint.R-06-135>.
- [39] Aleksandra Kozłowska, Dorota Szostak-Węgierek, Flavonoids-food sources and health benefits, *Rocz Panstw Zakl Hig.* 65 (2014) 79-85. PMID: 25272572.
- [40] Augustin Scalbert, Gary Williamson, Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *The Journal of Nutrition* 130 (2000) 2073S-2085S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>
- [41] M. Harwood, B. Danielewska-Nikiel, J.F. Borzelleca, G.W. Flamm, G.M. Williams, T.C. Lines, A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties, *Food and Chemical Toxicology* 45 (2007) 2179–2205. doi: 10.1016/j.fct.2007.05.015
- [42] American Chemical Society, (2020). <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> (online 27. 9. 2020).
- [43] PubChem, (n.d.). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (online 27.9.2020)
- [44] Merck KGaA (2020). <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html> (online 28.9.2020)
- [45] HU Ping, ZHANG Hong-Yang, MAO Dong-Yan, NING Fang-Hong, WANG Rui-Juan, WANG Yue-Rong, ZHANG Min, Determination of Homovanilic Acid in Human Urine by Weak Anion-Exchange Hypercrosslinked Polymer Resin-Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection Method, *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 40 (2012) 1175–1180. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(11\)60563-X](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(11)60563-X)
- [46] Elias Ranjbari, Pourya Biparva, Mohammad Reza Hadjmohammadi, Utilization of inverted dispersive liquid–liquid microextraction followed by HPLC-UV as a sensitive and efficient method for the extraction and determination of quercetin in honey and biological samples, *Talanta* 89 (2012) 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.079>

- [47] Mi-Hee Choi, Soon-Mi Shim, Gun-Hee Kim, Phenolic acids and quercetin from Korean black raspberry seed protected against acetaminophen-induced oxidative stress in mice, *Journal of Functional Foods* 19 (2015) 404-416. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.052>
- [48] João Gonçalves, Berta Mendes, Catarina L. Silva, José S. Câmara, Development of a novel microextraction by packed sorbent-based approach followed by ultrahigh pressure liquid chromatography as a powerful technique for quantification phenolic constituents of biological interest in wines, *Journal of Chromatography A* 1229 (2012), 13-23. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.01.023>
- [49] Adel Mahfoudhi, Francesco Pio Prencipe, Zine Mighri, Federica Pellati, Metabolite profiling of polyphenols in the Tunisian plant *Tamarix aphylla* (L.) Karst, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 99 (2014) 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.07.013>.
- [50] Yong Wang, Xihuang Lin, Zongze Shao, Dapeng Shan, Guizhen Li, Angelidaki Irimi, Comparison of Fenton, UV-Fenton and nano-Fe₃O₄ catalyzed UV-Fenton in degradation of phloroglucinol under neutral and alkaline conditions: Role of complexation of Fe³⁺ with hydroxyl group in phloroglucinol, *Chemical Engineering Journal* 313 (2017) 938–945. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.133>
- [51] Jun Hu, Yunan Zhao, Chao Ma, Weiyu Wang, Dongming Xing, Lijun Du, Acid Hydrolytic Method for Determination of *Ginkgo Biloba* Total Flavonoids in Rat Plasma by HPLC for Pharmacokinetic Studies, *Tsinghua Science & Technology* 15 (2010) 452-459. [https://doi.org/10.1016/S1007-0214\(10\)70087-0](https://doi.org/10.1016/S1007-0214(10)70087-0)
- [52] Anna Marchelak, Monika Anna Olszewska, Aleksandra Owczarek, Simultaneous quantification of thirty polyphenols in blackthornflowers and dry extracts prepared thereof: HPLC-PDA method development and validation for quality control, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 184 (2020) 113121. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113121>
- [53] Kun-Chang Wu, Chun-Pin Kao, Yu-Ling Ho, Yuan-Shiun Chang, Quality Control of the Root and Rhizome of *Helminthostachys zeylanica* (Daodi-

- Ugon*) by HPLC Using Quercetin and Ugonins as Markers, *Molecules* 22 (2017), 1115. <https://doi.org/10.3390/molecules22071115>
- [54] Hai Peng Liu, Xiao Feng Shi, You Cheng Zhang, Zhong Xin Li, Lin Zhang, Zhe Yuan Wang, Quantitative analysis of quercetin in *Euphorbia helioscopia* L by RP-HPLC, *Cell Biochemistry and Biophysics* 61 (2011) 59-64. doi: 10.1007/s12013-011-9161-0.
- [55] Vishal Sharad Chaudhari, Roshan M. Borkar, Upadhyayula Suryanarayana Murty, Subham Banerjee, Analytical method development and validation of reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for simultaneous quantifications of quercetin and piperine in dual-drug loaded nanostructured lipid carriers, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 186 (2020) 113325 <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113325>.
- [56] Akari Ishisaka, Satomi Ichikawa, Hiroyuki Sakakibara, Mariusz K. Piskula, Toshiyuki Nakamura, Yoji Kato, Mikiko Ito, Ken-ichi Miyamoto, Akira Tsuji, Yoshichika Kawai, Junji Terao, Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats, *Free Radical Biology & Medicine* 51 (2011) 1329-1336. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.017>
- [57] Xiumin Fu, Sihua Cheng, Yinyin Liao, Bingzhi Huang, Bing Du, Wei Zeng, Yueming Jiang, Xuewu Duan, Ziyin Yang, Comparative analysis of pigments in red and yellow banana fruit, *Food Chemistry* 239 (2018) 1009-1018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.046>
- [58] FumiTatsuzawa, Flavonol glycosides in the purple flowers of *Hesperis matronalis* L. (Brassicaceae), *Biochemical Systematics and Ecology* 50 (2013), 19-22. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.03.008>
- [59] Montserrat Dueñas, Susana González-Manzano, Ana González-Paramás, Celestino Santos-Buelga, Antioxidant evaluation of *O*-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin, *Analysis* 51 (2010), 443-449. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.04.007>
- [60] Xianglai Li, Xiaolin Shen, Jia Wang, Hyon Il Ri, Chang Yong Mi, Yajun Yan, Xinxiao Sun, Qipeng Yuan, Efficient biosynthesis of 3, 4-

- dihydroxyphenylacetic acid in *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology* 294 (2019) 14-18. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.019>
- [61] Agnieszka Szopa, Anna Starzec, Halina Ekiert, The importance of monochromatic lights in the production of phenolic acids and flavonoids in shoot cultures of *Aronia melanocarpa*, *Aronia arbutifolia* and *Aronia × prunifolia*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 179 (2018) 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.01.005>
- [62] Agnieszka Szopa, Adam Kokotkiewicz, Marcelina Bednarz, Maria Luczkiewicz, Halina Ekiert, Studies on the accumulation of phenolic acids and flavonoids in different in vitro culture systems of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using a DAD-HPLC method, *Phytochemistry Letters* 20 (2017) 462-469. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2016.10.016>.
- [63] Qi Zhou, Kemin Mu, Meng Xu, Xueying Ma, Zhouxian Ni, Jianwen Wang, Lian Xu, Variation in the Concentrations of Major Secondary Metabolites in *Ginkgo* Leaves from Different Geographical Populations. *Forests* 8 (2017) 266. <https://doi.org/10.3390/f8080266>
- [64] Benjamin Bomastyk, Igor Petrovic, Peter C. Hauser, Absorbance detector for high-performance liquid chromatography based on light-emitting diodes for the deep-ultraviolet range, *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 3750-3756. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.04.039>