

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytickej chémie



**HODNOTENIE OBSAHU FENOLICKÝCH LÁTOK V RASTLINNOM
MATERIÁLI**

Dizertačná práca

Školiteľ: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

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

Hradec Králové 2023

Mgr. Marcela Hollá

Prehlasujem, že práca je mojím autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne pod vedením školiteľa a konzultanta. Literatúra a všetky zdroje z ktorých som pri písaní práce čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Hradec Králové, 5. 10. 2023

Mgr. Marcela Hollá

POĎAKOVANIE

Chcela by som poďakovať svojej školiteľke doc. PharmDr. Hane Sklenářovej, Ph.D za trpezlivosť, odborné vedenie, pomoc a cenné rady počas celej doby môjho štúdia. Taktiež by som rada poďakovala svojim kolegom a priateľom z Katedry analytickej chémie, ktorí pre mňa boli zdrojom cenných skúseností, rád a podpory.

Moje poďakovanie patrí aj RNDr. Anete Bílkovej za mnoho dní stáže, ktoré som mala možnosť stráviť vo VŠÚO v Holovousích a taktiež výskumnej skupine profesorky Garcíe Campaňi z Univerzity Granada, kde som absolvovala zahraničnú stáž.

Veľké ďakujem patrí aj mojim najbližším, ktorí ma vždy podporovali a boli mi oporou po celú dobu štúdia.

V neposlednej rade ďakujem finančnej podpore Grantovej Agentúry Univerzity Karlovej (projekt č. 1466119), Grantovej Agentúre Českej republiky (projekt č. 20-19297S), Technologickej Agentúre Českej republiky (projekty č. TJ02000196 a TJ01000151), taktiež podpore zo Špecifického vysokoškolského výskumu SVV 260 548, SVV 260 662 a projektu Erasmus+ za možnosť absolvovania zahraničnej stáže.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytickej chémie

Kandidát: Mgr. Marcela Hollá

Školiteľ: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

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

Názov dizertačnej práce: Hodnotenie obsahu fenolických látok v rastlinnom materiáli

O výskum prírodných látok sa vždy zaujímal početná vedecká komunita. Hlavnými dôvodmi je obrovská rozmanitosť samotných látok a taktiež ich významný vplyv na zdravie človeka. Vývoj nových analytických a extrakčných metód vrátane moderných postupov úpravy vzorky umožňuje získavanie podrobnejších poznatkov o štruktúre ale aj biologických vlastnostiach rastlinných látok. Dôležitú skupinu tvoria práve látky s antioxidantnými účinkami do ktorej radíme aj fenolické látky, ktoré sú významnou zložkou ľudskej potravy.

Predkladaná dizertačná práca sa venuje problematike stanovenia vybraných skupín prírodných látok z hľadiska špecifických nárokov na chromatografickú separáciu, voľbu detekčnej techniky vzhľadom na selektivitu a citlivosť stanovenia, a taktiež na možnosť aplikácie moderných a zelených/ekologických extrakčných prístupov.

Prvá časť predkladanej práce sa venuje problematike stanovenia vybraných rastlinných látok. Za týmto účelom sa porovnávali výsledky získané meraním sady jablčných odrôd pomocou detektoru diódového poľa a detektoru nabitého aerosólu. Oba detektory umožňovali charakterizovanie sledovaných látok vo vzorkách po kvantitatívnej stránke. Avšak, výsledky porovnania poukázali na významné rozdiely v citlivosti a taktiež selektivitě detekcií, kedy komplexnosť matrice významným spôsobom zvyšovala nároky na účinnosť separácie. Ako doplnková detekčná technika bola v tomto prípade zvolená coulometrická detekcia, ktorá umožnila interpretáciu kvality vzoriek z funkčného hľadiska a to na základe nie len obsahu ale aj aktivity antioxidantných látok.

Ďalšia časť práce sa venovala vývoju separačnej metódy pre stanovenie štruktúrne podobných stéviových glykozidov s použitím detektoru nabitého aerosólu, ktorý umožnil citlivú kvantifikáciu slaboo UV absorbujúcich analytov. Za týmto účelom bolo testovaných niekoľko stacionárnych fáz na báze plne poréznych a povrchovo poréznych častíc, prípadne častíc s modifikáciou pre separáciu polárnych látok. Nakoľko sú stéviové glykozidy z fyzikálne-chemického hľadiska malé a veľmi polárne molekuly, okrem separácie v reverznom móde bol testovaný aj mód hydrofilnej interakčnej chromatografie. Optimalizovaná metóda bola validovaná pre dva typy matric – rastlinný extrakt a komerčné sladidlá.

Validovaná metóda bola využitá na overenie kvality komerčne dostupných stéviových sladidiel a kvantifikáciu stéviových glykozidov priamo v rastlinnom extrakte.

V práci sa diskutuje aj možnosť použitia modernej a „zelenej“ extrakčnej metódy s využitím oxidu uhličitého na extrakciu polárnych fenolických látok. Táto metóda je zároveň porovnávaná s často využívanou sonikačnou extrakciou. Vývoj oboch extrakčných metód prebiehal v niekoľkých krokoch a s využitím dizajnu experimentu pre podrobnú optimalizáciu jednotlivých extrakčných parametrov. Extrakcia sady vzoriek sušených jablák oboma metódami umožnila ich porovnanie nie len vzhľadom na celkovú výťažnosť ale aj ich ekologickosť a praktické aspekty ich použitia v praxi.

Pre potreby jednoduchej, spoľahlivej ale zároveň komplexnej charakteristiky ovocných vzoriek bola spracovaná certifikovaná metodika, ktorá komplexným spôsobom popisuje problematiku analýzy rastlinných vzoriek na príklade stanovenia fenolických látok v jablčných vzorkách. Práca potvrdila význam použitia metód coulometrickej detekcie a ďalších antioxidačných testov, ktoré boli vzájomne komplementárne a poskytujú dôležité údaje o biologickej hodnote vzoriek. Použitie detektora diódového poľa a detektora nabitého aerosólu bolo diskutované vzhľadom na kvantifikáciu vybraných analytov. Senzorická analýza vzoriek bola uskutočnená v rámci pomologického hodnotenia.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Marcela Hollá

Supervisor: assoc. prof. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

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

Title of Doctoral Thesis: Evaluation of phenolic substances content in plant material

Scientific community has always been interested in the research of natural substances. The main reasons are a huge diversity of substances themselves and their significant impact on human health. The development of new analytical and extraction methods, including new approaches for sample preparation, enable obtaining more detailed knowledge about the structure and biological properties of plant substances. A significant group consists of substances with antioxidant effects, such as phenolic compounds, which are an important part of human food.

The presented dissertation thesis deals with determination of selected groups of natural substances from the point of view of specific requirements for chromatographic separation, choice of detection technique with regard to the selectivity and sensitivity of the determination, as well as the possibility of applying modern and green extraction approaches.

The first part of the presented work is devoted to the issue of determination of selected plant substances. For this purpose, the results obtained by measuring a set of apple varieties using a diode array detector and a charged aerosol detector were compared. Both detectors enabled quantitative characterization of the monitored substances in the samples. However, comparison of results provided by both methods confirmed significant differences in the sensitivity and also the selectivity of detections, due to a complexity of sample matrix that significantly increased requirements for separation efficiency. A coulometric detection was applied as an additional detection technique which enabled interpretation of sample quality from a functional point of view, based on the content and activity of substances with antioxidant properties.

Another part of the work was devoted to a development of a separation method for determination of structurally similar stevia glycosides using a charged aerosol detector, which enabled sensitive quantification of weakly UV absorbing analytes. For this purpose, several stationary phases based on fully porous and superficially porous particles, or particles with modification for a separation of polar substances were tested. Since stevia glycosides are small and very polar molecules from a physico-chemical point of view, a separation using hydrophilic interaction chromatography mode was

tested in addition to a reversed phase mode. The optimized method was validated for two types of matrices – plant extract and commercial sweeteners. The validated method was used to verify the quality of commercially available stevia sweeteners and to quantify stevia glycosides directly in the plant extract.

The thesis also discusses the possibility of using a modern and green extraction method applying carbon dioxide for extraction of polar phenolic compounds. This method is also compared with the often-applied sonication extraction. The development of both extraction methods was done in several steps also using design of the experiment for detailed optimization of individual extraction parameters. The extraction of a set of dried apple samples by both methods allowed their comparison not only with regard to the overall yield, but also method greenness and practical aspects.

For the needs of a simple, reliable and at the same time complex characteristic of fruit samples, a certified methodology was developed. The methodology describes in a comprehensive way subject of plant analyses on the example of determining phenolic substances in apple samples. The work confirmed importance of applying coulometric detection method and other antioxidant tests, which were mutually complementary and provided important data on the biological value of the samples. The use of diode array detector and a charged aerosol detector was discussed with respect to the quantification of selected analytes. The sensory analysis of the samples was carried out as a part of pomological evaluation.

OBSAH

ÚVOD	11
1. CIEĽ PRÁCE	12
2. TEORETICKÁ ČASŤ	13
2.1. Metódy extrakcie fenolických látok	13
2.1.1. Extrakcia sonikáciou	15
2.1.2. Mikrovlnná extrakcia	18
2.1.3. Extrakcia rozpúšťadlom za zvýšeného tlaku	19
2.1.4. Extrakcie s využitím CO ₂	21
2.2. Moderné trendy vo vývoji separačných metód	23
2.2.1. Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia UHPLC	24
2.2.2. Stacionárne fázy s povrchovo poréznymi časticami	27
2.2.3. Povrchovo porézne častice s vrstvami	30
2.2.4. Viacvrstvové častice	31
2.3. Detekčné techniky pre stanovenie fenolických látok v rastlinných vzorkách	32
2.3.1. Spektrofotometrická detekcia	33
2.3.2. Fluorescenčná detekcia	35
2.3.3. Univerzálna detekcia na báze aerosólu	36
2.3.4. Elektrochemická detekcia	38
2.3.5. Hmotnostne spektrometrická detekcia	39
3. KOMENTÁRE K PUBLIKOVANÝM PRÁCAM ZAHRNUTÝM V DIZERTAČNEJ PRÁCI	42
3.1. Benefits and Pitfalls of HPLC Coupled to Diode-Array, Charged Aerosol, and Coulometric Detections: Effect of Detection on Screening of Bioactive Compounds in Apples (príloha č. 1)	42
3.2. UHPLC coupled with charged aerosol detector for rapid separation of steviol glycosides in commercial sweeteners and extract of <i>Stevia rebaudiana</i> (príloha č. 2)	47
3.3. Green Solvents in the Extraction of Bioactive Compounds from Dried Apple Cultivars (príloha č. 3)	53
3.4. Certifikovaná metodika: Metodika pre kvalitatívne hodnotenie ovocia a spracovateľských produktov z hľadiska obsahu látok prospešných pre zdravie človeka (príloha č. 4)	57
4. ZÁVER	59
ZOZNAM OBRÁZKOV	61
ZOZNAM TABULIEK	63
5. ZOZNAM CITÁCIÍ	64
6. VÝSTUPY KANDIDÁTKY	79
6.1. Publikácie zahrnuté v dizertačnej práci	79

6.2.	Publikácie nezahrnuté v dizertačnej práci.....	80
6.3.	Prezentácie výsledkov	81
6.4.	Stáže a projekty	83
7.	PRÍLOHY	84

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

APCI	chemická ionizácia za atmosférického tlaku
API	ionizácia za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizácia za atmosférického tlaku
BEH	hybridná stacionárna fáza s etylénovými mostíkmi
CAD	detektor nabitého aerosólu
CD	coulometrický detektor
C18	oktadecylsilikagél (typ modifikácie stacionárnej fázy)
CO₂	oxid uhličitý
DAD	detektor diódového poľa
DoE	dizajn experimentu
ECD	elektrochemická detekcia
EMA	Európska lieková agentúra (European Medicines Agency)
ESI	ionizácia elektrosprejom
F5	pentafluorofenylová modifikácia stacionárnej fázy
FLD	fluorescenčný detektor
FPP	plne porézne častice
GXL	kvapalina obohatená plynom (gas expanded liquid)
GXLE	extrakcia kvapalinou obohatenou plynom
HILIC	hydrofilná interakčná chromatografia
HPLC	vysokoučinná kvapalinová chromatografia
IP	inflexný bod
ISS	isosteviol
LC	kvapalinová chromatografia
LLE	extrakcia z kvapaliny do kvapaliny

LOD	limit detekcie
LOQ	limit kvantifikácie
MAE	mikrovláňná extrakcia
MF	mobilná fáza
MIP	molekulárne vtlačené polyméry
MS	hmotnostný spektrometer
MSⁿ	tandemový hmotnostný spektrometer
PHWE	extrakcia horúcou vodou za zvýšeného tlaku
PLE	extrakcia rozpúšťadlom za zvýšeného tlaku
Q	jednoduchý kvadrupólový analyzátor
QqQ	trojitý kvadrupólový analyzátor
RebA	rebaudiozid A
RebB	rebaudiozid B
RebC	rebaudiozid C
RebD	rebaudiozid D
RP	reverzné fázy (reverzný mód)
SB	steviolbiozid
SCF	superkritická tekutina
SF	stacionárna fáza
SFE	superkritická fluidná extrakcia
SG	stéviové glykozidy
SPE	extrakcia na tuhú fázu
SPP	povrchovo porézne častice
TEAC	stanovenie antioxidačnej kapacity s využitím štandardu Troloxu (Trolox equivalent antioxidant capacity assay)

TOF	analyzátor doby letu
UAE	extrakcia sonikáciou (ultrasound assisted extraction)
UHPLC	ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia
UV	ultrafialové žiarenie
UV-Vis	ultrafialová až viditeľná oblasť žiarenia

ÚVOD

Úspešné hodnotenie fenolických látok je podmienené všetkými fázami analytického procesu. Každá z fáz má svoje nezastupiteľné miesto a zároveň predurčuje kvalitu výsledkov získaných v nasledujúcich fázach. Zásadnou charakteristikou hodnotenia fenolických látok je ich štruktúrna rozmanitosť naprieč triedami a zároveň značná podobnosť v rámci každej triedy.

Prvou z fáz je samotná extrakcia analytov, kedy je potrebné zvoliť typ extrakčnej metódy nie len na základe fyzikálne-chemickej povahy analytov ale taktiež na základe typu matrice. V tomto kroku zohráva dôležitú úlohu aj samotná predúprava vzorky, ako napríklad drvenie a sušenie, ktorá ovplyvňuje mieru prístupnosti extrakčného rozpúšťadla k matrici s analytmi. Nasleduje štúdium vplyvu extrakčných parametrov na výťažnosť extrakcie a identifikácia tých, ktoré majú zásadný vplyv na výťažnosť metódy. V súčasnosti sa pri výbere a optimalizácii extrakčnej metódy kladie dôraz aj na jej ekologickosť v podobe využívania zelených, netoxických rozpúšťadiel a celkove minimalizovania objemov organických rozpúšťadiel. Z dôvodu štruktúrnej podobnosti fenolických látok a tiež komplexnosti matrice rastlinných vzoriek je tento krok menej špecifický. Výsledkom je zväčša extrakcia širokého spektra fenolických látok vrátane zložiek matrice. Menej často je extrakcia dedikovaná na užšiu skupinu látok.

Z dôvodu komplexnosti extraktov sú kladené vysoké nároky na separačnú metódu, ktorej úlohou je zaistiť primeranú separáciu nie len analytov ale aj zložiek matrice, tak aby nedochádzalo k ovplyvneniu signálu cieľových analytov počas detekcie. Za týmto účelom sa najčastejšie využívajú separácie v móde reverzných fáz v kombinácii s gradientovou elúciou. Ďalšie zvýšenie účinnosti separácie umožňuje zapojenie moderných typov UHPLC kolón so špecifickou modifikáciou stacionárnych fáz, dedikovanou pre konkrétne typy analytov. Princípy zelenej chémie sú reflektované predovšetkým obmedzením používania toxických rozpúšťadiel a vhodnou optimalizáciou gradientovej metódy, čím sa prispieva k zníženiu spotreby organických rozpúšťadiel.

Separované analyty sú následne detekované detektorom. Jeho výber musí zohľadňovať nie len fyzikálno-chemické vlastnosti analytu ale aj poskytovať potrebnú mieru citlivosti a selektivity stanovenia. Z dôvodu prítomnosti chromóforov v štruktúre fenolických látok je časté zapojenie spektrofotometrických detektorov. Pre analýzy vyžadujúce vysokú citlivosť a selektivitu stanovenia, prípadne identifikáciu a confirmáciu, sa naopak najčastejšie využívajú hmotnostne spektrometrické detektory. Prítomnosť redukčných skupín fenolických látok predurčuje ich antioxidačné vlastnosti a teda elektroaktivitu molekúl. To umožňuje zapojenie špecifických a citlivých elektrochemických detektorov, ako napríklad ampér metrických prípadne coulometrických.

1. CIEĽ PRÁCE

Táto dizertačná práca je zameraná na hodnotenie prírodných látok s dôrazom na analýzu fenolických látok typických pre ovocné vzorky. V práci je táto téma podľa zamerania rozdelená do troch celkov – extrakcia (i), separácia (ii) a detekcia (iii).

(i) V práci bola skúmaná vhodnosť použitia sonikačnej extrakcie a extrakcie kvapalinou obohatenou plynom (CO₂). Pre vývoj extrakčných metód bol použitý dizajn experimentu, ktorý umožnil identifikáciu hlavných parametrov, ktoré majú zásadný vplyv na výťažnosť extrakcií, a ich následnú optimalizáciu. Vhodnosť metód bola porovnaná na základe výťažností extrakcie obsahových látok u sady sušených jablčných vzoriek. Pomocou voľne dostupného softvéru bola porovnaná aj ekologickosť metód na základe 12 princípov zelenej chémie.

(ii) Práca bola ďalej zameraná na vývoj separačnej metódy pre hodnotenie 6 hlavných stéviových glykozidov v komerčných sladidlách a rastlinných extraktoch *Stevia rebaudiana*. V práci sú popísané typické problémy spojené s vývojom separačnej metódy, ako je štruktúrna podobnosť separovaných analytov a zároveň ich vysoká polarita. Vývoj metódy prebiehal v móde HILIC a reverznej chromatografie. Celkovo bolo testovaných 5 chromatografických kolón z toho 4 v móde RP. Bol testovaný vplyv aditív a zloženie mobilnej fázy, izokratický a gradientové separačné módy, teplota separácie, rýchlosť prietoku mobilnej fázy, objem nástreku. Optimalizovaná metóda bola validovaná na základe požiadaviek EMA a využitá na kvalitatívne hodnotenie komerčných a rastlinných vzoriek.

(iii) Vhodnosť použitia DAD, CAD a CD detekcie na hodnotenie vybraných fenolických látok v jablkách bola preskúmaná v ďalšej práci. Validované metódy s tandemovým zapojením DAD a CAD detektorov boli porovnané na základe výsledkov validačných parametrov s dôrazom na selektivitu a citlivosť detekčných metód. Metódy boli použité na vyhodnotenie obsahu fenolických látok sady vzoriek rôznych jablčných odrôd. Rozdielnosti získaných výsledkov boli interpretované vzhľadom na odlišnosť princípov metód. CD detekcia bola použitá ako doplnková detekčná metóda, ktorá sledovala antioxidačné parametre hodnotených vzoriek. Výsledky získané všetkými tromi metódami boli vzájomne korelované a boli zhrnuté odporúčenia pre výber detekčných metód pre komplexné hodnotenie fenolických látok v jablčných vzorkách.

2. TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Metódy extrakcie fenolických látok

Fenolické látky, ktorých bolo doposiaľ popísaných viac ako 8000 druhov, vynikajú svojou štruktúrnou rozmanitosťou a radia sa medzi sekundárne metabolity rastlín. Fenolické látky sa môžu vyskytovať v podobe glykozidov prípadne aglykónov, môžu byť voľné alebo viazané na maticu rastlinného materiálu, nachádzať sa vo forme monomérov až polymérov. Typicky sa v ich štruktúre nachádza jeden prípadne viac aromatických kruhov na ktoré sú viazané hydroxylové skupiny. Medzi fenolické látky radíme taníny, lignany, stilbeny, flavonoidy a fenolické kyseliny. V najjednoduchšej podobe sa vyskytujú ako fenolické kyseliny a ich komplexnú formu predstavujú taníny. V ľudskej strave sú z pomedzi fenolických látok najzastúpenejšie flavonoidy [1–3].

Fenolické látky sú predmetom mnohých štúdií a to predovšetkým z dôvodu antioxidantných vlastností a úlohy v prevencii ochorení spôsobených oxidatívnym stresom [4]. Ich rozmiestnenie v rastlinných orgánoch je častokrát nerovnomerné a výťažnosť extrakcie značne podmieňuje ich stabilita (oxidácia, termolabilita, enzymatické štiepenie, prchavosť). Výber vhodnej extrakčnej metódy je dôležitý pre dosiahnutie potrebnej výťažnosti cieľového analytu a jeho voľba je do veľkej miery ovplyvňovaná fyzikálno-chemickou povahou cieľového analytu prípadne skupiny analytov. Vo všeobecnosti môžeme využívané extrakčné metódy rozdeliť na konvenčné a nekonvenčné (moderné) [1–3]. Štruktúrne rozdielnosti fenolických látok ovplyvňujú ich polaritu, konjugáciu a mieru interakcie s maticou vzorky. Všetky tieto vlastnosti následne podmieňujú ich rozpustnosť a extrakčné vlastnosti. Napríklad, fenolické látky s vysokou molekulovou hmotnosťou sú v dôsledku štruktúrneho zloženia často nerozpustné. V súčasnosti neexistuje jednotná metóda na extrakciu všetkých fenolických látok, avšak pri výbere vhodnej metódy je potrebné zvážiť nasledovné:

- typ vzorky a cieľové analyty (celkové fenolické látky/špecifická skupina/špecifická fenolická látka),
- metóda kvantifikácie/identifikácie látok,
- dostupná technická inštrumentácia [1].

Vzhľadom na komplexnosť vzoriek, výber metódy úpravy vzorky taktiež výrazným spôsobom ovplyvňuje výsledok samotnej extrakcie. Medzi najčastejšie používané metódy úpravy vzorky patrí sušenie, homogenizácia, filtrácia a mletie. V prípade potreby uvoľnenia analytov viazaných na maticu vzorky sa používa hydrolýza. Samotné extrakty sa najčastejšie pripravujú metódou extrakcie rozpúšťadlom, avšak táto extrakcia môže byť podporená aj pôsobením teploty, sonikácie, mikrovln, prípadne zvýšeného tlaku rozpúšťadla. Takéto extrakty obsahujú zvyčajne široké spektrum analytov

a balastných látok ako sú pigmenty, terpény a tuky, ktoré boli použitím daného typu rozpúšťadla extrahované. Preto častokrát nasleduje ešte ďalší krok, ktorým dochádza k prečisteniu extraktu a izolácii len vybranej skupiny cieľových analytov. Na takéto účely sa používa najčastejšie metóda extrakcie na tuhú fázu (solid phase extraction, SPE) aj s použitím vysoko selektívneho sorbentu molekulárne vtačených polymérov (molecularly imprinted polymers, MIP), extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE), prípadne preparatívna chromatografia [1, 5].

Konvenčné metódy používané na extrakciu vzoriek sa vyznačujú používaním väčších objemov extrakčných rozpúšťadiel a zvýšenou mierou manuálnej práce potrebnej k prevedeniu extrakcie, čo spôsobuje zníženie konzistentnosti výsledkov extrakcie. Konvenčné metódy sú v laboratóriách cenené predovšetkým pre jednoduchosť prevedenia a nízku cenu. Medzi konvenčné metódy využívané na extrakciu fenolických látok radíme napríklad extrakciu rozpúšťadlom, Soxhletovu extrakciu, perkoláciu, dekokciu, extrakciu z kvapaliny do kvapaliny, maceráciu. Práve nevýhody ako chýbajúca možnosť automatizácie, nižšia selektivita, vysoká spotreba rozpúšťadiel a nižšia účinnosť extrakcie viedli k vývoju nových nekonvenčných metód. Medzi nekonvenčné metódy extrakcie fenolických látok môžeme radiť napríklad extrakciu kvapalinou za zvýšeného tlaku (PLE), superkritickú fluidnú extrakciu (SFE), extrakciu pomocou mikrovln (MAE), SPE, extrakciu sonikáciou (UAE) [6].

Dizertačná práca sa bližšie zameriava na extrakčné metódy, ktoré tematicky korešpondujú so zameraním prác publikovaných počas doktorandského štúdia, a to hodnotenie fenolických látok prítomných v matici jablák, prípadne sladivých molekúl stéviových glykozidov (SG) v komerčných sladidlách a rastlinných extraktoch. Spoločnou charakteristikou týchto molekúl je ich prevažne polárny charakter, relatívne malá veľkosť molekúl, značná štruktúrna podobnosť v rámci tried a taktiež podobný charakter matrice. V samotných publikáciách sa venujeme extrakcii s využitím sonikácie a extrakcii s využitím CO₂. Avšak, na základe rešerše, patrí medzi často využívané extrakcie fenolických látok aj MAE a PLE. Nakoľko sa menované metódy radia medzi nekonvenčné extrakčné metódy, pre lepšie porovnanie je prehľad je doplnený aj o vybrané konvenčné metódy.

Konvenčné metódy

Macerácia predstavuje jednoduchú metódu kedy sa rozdrvená vzorka namáča pri laboratórnej teplote vo vhodnom rozpúšťadle v uzavretom systéme, pričom dochádza k neustálemu alebo len občasnému premiešavaniu. Zvyčajne nasleduje proces filtrácie, kedy sa oddelia pevné časti vzorky od macerátu. Napriek jednoduhosti prevedenia je hlavnou nevýhodou dlhá doba extrakcie a používanie veľkých objemov rozpúšťadiel [7, 8]. Dekokcia predstavuje metódu kedy je vzorka na krátky čas vystavená varu a preto je vhodná na extrakciu termostabilných analytov. Perkolácia je svojim prevedením podobná macerácii, kedy je vzorka spolu s rozpúšťadlom umiestnená v uzatvorenom

systeme, ale s tým rozdielom, že filtráciu pevných častíc od extraktu zabezpečuje perkolačné zariadenie s filtrami. Podobne ako macerácia, aj perkolácia je časovo náročná a so zvýšenou spotrebou rozpúšťadiel [9, 10]. Pre extrakciu Soxhletovou metódou sa využíva priepustná patróna, ktorá obsahuje drvenú vzorku. Rozpúšťadlo v destilačnej banke sa neustále zahrieva, pričom následne v chladiči dochádza ku kondenzácii jeho pár a kondenzát prekvapkáva cez patrónu so vzorkou kde prebieha extrakcia. Po dosiahnutí úrovne prepadu dochádza k prečerpaniu extraktu do destilačnej banky a celý proces sa opakuje. Výhodou je skrátenie času extrakcie, menšie množstvo potrebného extrakčného rozpúšťadla. Avšak, proces je potrebné udržiavať pod kontrolou aby nedochádzalo nadbytočným teplom ku degradácii analytov [7, 8].

Nekonvenčné metódy

Dlhá doba extrakcie konvenčných metód, znížená výťažnosť, horšia reprodukovateľnosť, a zvýšená spotreba rozpúšťadiel viedli k vývoju novších nekonvenčných extrakčných metód. Nasledujúce kapitoly preto budú venované sonikačnej extrakcii, MAE, PLE a extrakciám s využitím CO₂.

2.1.1. Extrakcia sonikáciou

Sonikačná metóda bola najčastejšie využívanou extrakčnou metódou pri experimentálnych prácach počas doktorandského štúdia. Metóda UAE predstavuje jednoduchú extrakčnú techniku, kedy sa využíva sila ultrazvukových vĺn, ktoré vytvárajú v extrakčnom roztoku mikrobublinky a tie následne narušujú celistvosť povrchu vzorky. To vedie k zvýšenému prenikaniu extrakčného rozpúšťadla do materiálu vzorky, čím dochádza k zefektívneniu a urýchleniu uvoľňovania analytov z matrice vzorky do rozpúšťadla. Úspešnosť aplikácie metódy UAE na extrakciu fenolických látok závisí od procesu jej optimalizácie. Správnou optimalizáciou metódy sa predchádza plytvaniu materiálu a rozpúšťadiel, zvyšuje sa výťažnosť extrakcie a zachovávajú sa biologické vlastnosti extraktov. Výťažnosť extrakcie UAE ovplyvňujú parametre ako čas extrakcie, frekvencia, výkon, teplota, pomer rozpúšťadla a vzorky [11]. Aby dochádzalo k prenikaniu extrakčného rozpúšťadla cez bunkovú membránu, zvyčajne sa používajú frekvencie 20 – 2000 kHz. Avšak, niektoré štúdie poukazujú na to, že pri použití vyšších frekvencií nad 20 kHz po dobu viac ako 40 min, dochádza ku spomaleniu difúzie v dôsledku zvýšenia difúzných vzdialeností. Takéto podmienky tiež môžu viesť k nechceným zmenám, ako je rozklad menej stabilných látok, prípadne k tvorbe voľných radikálov [12].

V závislosti na uložení zdroja ultrazvukových vĺn môžeme inštrumentáciu rozdeliť na priamu a nepriamu. V prípade priameho kontaktu zdroja ultrazvukových vĺn (ultrazvukovej sondy) a extrakčného média hovoríme o priamej UAE. V prípade nepriameho kontaktu, čo je typické pre ultrazvukové vane, hovoríme o nepriamej UAE. Priami kontakt ultrazvukových vĺn a extrakčného

rozpúšťadla zvyšuje kavitačný efekt a poskytuje vyšší účinok extrakcie. Avšak, nevýhodou priamej UAE je zvýšené riziko kontaminácie extraktu znečistenou próbou, prípadne jej vyššia náchylnosť ku korózii. Pri nepriamej UAE prechádzajú ultrazvukové vlny cez dve médiá – vodnú kúpeľ a nádobu so vzorkou. Tým dochádza ku zníženiu intenzity kavitácie a rýchlosti extrakcie. Avšak, na rozdiel od priamej UAE je tu riziko kontaminácie vylúčené [11].

Ďalším parametrom, ktorý ovplyvňuje extrakciu je rozsah extrakčnej frekvencie, ktorý sa naprieč spektrom zariadení líši [13]. Na účely extrakcie sa zvyčajne používajú frekvencie v rozmedzí 20 – 100 kHz. Avšak rozmedzie frekvencií zariadení na ultrazvukový kúpeľ sa zvyčajne nachádza v rozmedzí 20 – 40 kHz. Pri použití nízkych frekvencií dochádza k formovaniu veľkých kavitačných bublín, ktoré vedú k väčšej degradácii (narušeniu) bunkových membrán extrahovaného materiálu, teda k lepšej penetrácii extrakčného rozpúšťadla do vzorky a rýchlejšej extrakcii. V prípade, že zariadenie umožňuje reguláciu frekvencie, je vhodné zahrnúť do optimalizácie extrakčnej metódy aj vplyv použitej frekvencie pre konkrétne špecifické extrakčné podmienky [14]. Zvýšenie účinnosti extrakcie je možné doceliť aj použitím kombinácie rôznych frekvencií, kedy zmenou frekvencie dochádza k ovplyvneniu kavitačného efektu [13].

Ďalšou možnosťou je použitie vhodnej kombinácie frekvencie a výkonu zariadenia. Diagnostické a vysokofrekvenčné ultrazvuky typicky využívajú vysokú frekvenciu a nízky výkon. V porovnaní s vysokofrekvenčnými ultrazvukmi je frekvencia diagnostických ešte omnoho vyššia. Vysokofrekvenčný ultrazvuk má síce nízky kavitačný efekt, avšak separácia častíc z biologického materiálu prebieha efektívnejšie. Tento typ ultrazvuku bol z dôvodu vysokej schopnosti extrahovať látky použitý napríklad na extrakciu olivového oleja [15]. Nevýhodou jeho použitia je, že v dôsledku vysokej frekvencie ultrazvuku dochádza ku negatívnemu ovplyvneniu aj iných extrahovaných látok s biologickým účinkom, ako sú napríklad fenolické látky. To sa prejavuje znížením ich antioxidačného účinku v dôsledok tvorby voľných radikálov [16, 17].

Rovnako bolo pozorované že zvýšenie kavitačného efektu a teda aj výťažnosti extrakcie nastáva aj pri použití vyššieho výkonu UAE [18]. Avšak, v prípade vysokého obsahu vodnej zložky v extrakčnom rozpúšťadle pri zvýšení výkonu, bol okrem nárastu výťažnosti pozorovaný aj nárast tvorby hydroxidových radikálov. Tie sú zodpovedné za degradačné reakcie fenolických skupín [19]. Podobný efekt bol pozorovaný aj v enologickej štúdií, kedy bol pri použití ultrazvuku s vysokým výkonom zaznamenaný výrazný pokles polyfenolov a antokyánov [20]. Teda s použitím vyššej frekvencie dochádza aj k nárastu výťažnosti extrakcie. Avšak, pri použití vysokej frekvencie ultrazvuku bola pozorovaná tvorba voľných radikálov, ktoré degradujú fenolické látky a spôsobujú pokles biologickej aktivity extraktu. Z týchto dôvodov je dôležité zvážiť typ a fyzikálne-chemické vlastnosti

analytov ktoré sú cieľom extrakcie, predovšetkým pri použití extrakčných rozpúšťadiel s vysokým podielom vody [19, 21].

Vďaka jednoduchosti a dostupnosti zariadení je sonikačná extrakcia veľmi často využívaná na extrakciu polárnych analytov. Jej vývoj je jednoduchý a výťažnosť pomerne vysoká [22–24]. Avšak, na obsah fenolických látok v získanom extrakte výrazne vplyvajú aj faktory mikroprostredia extrakcie ako zloženie extrakčného rozpúšťadla a jeho teplota, pomer vzorky a rozpúšťadla, a čas extrakcie. Vo všeobecnosti výsledky publikovaných štúdií dokumentujú, že so zvýšením extrakčnej teploty dochádza ku zvýšeniu výťažnosti extrakcie. Zvýšením teploty dochádza ku zvýšeniu porozity materiálu, prenosu hmoty a lepšej solvatácii. Zároveň, zvýšením teploty dochádza ku zníženiu viskozity rozpúšťadla a tiež zníženiu povrchového napätia zmesi vzorky a rozpúšťadla. Vďaka tomu dochádza k lepšiemu prenikaniu rozpúšťadla do matrice vzorky a zvýšeniu rýchlosti extrakcie medzi roztokom a vzorkou [18, 25, 26]. Nevýhodou použitia vyšších extrakčných teplôt je možnosť degradácie termolabilných látok vplyvom hydrolýzy a oxidácie pri aplikácii vyšších extrakčných teplôt a predovšetkým v kombinácii s dlhými extrakčnými časmi. Štúdie poukazujú na to, že celková výťažnosť extrakcie klesá už pri teplotách nad 60 °C a pri teplotách nad 70 °C je proces degradácie ešte výraznejší. Miera degradácie pri použití vyšších teplôt závisí taktiež od typu fenolických látok (fyzikálno-chemické vlastnosti) a tiež interakcie medzi vzorkou a rozpúšťadlom. Preto je vhodnejšie zaradiť do vývoja metódy aj testovanie vplyvu teploty extrakcie na výťažnosť extrakcie analytov [26, 27].

Ďalším dôležitým parametrom pre zvýšenie výťažnosti UAE je vhodný výber extrakčného rozpúšťadla. Pri výbere vhodného rozpúšťadla sa zohľadňuje jeho polarita, bod topenia a varu, hustota, afinita k cieľovým analytom, vplyv na čistotu a aktivitu získaného extraktu [28]. Biochemické a fyzikálno-chemické vlastnosti extrakčného rozpúšťadla sú dôležité, nakoľko interagujú s extrahovaným materiálom a cieľovými analytmi a akékoľvek zmeny v extrakčnom rozpúšťadle môžu mať významný vplyv na stabilitu extrahovaných látok a výťažnosť extrakcie. Na extrakciu fenolických látok sa najčastejšie používajú kombinácie organických rozpúšťadiel ako je etanol, metanol, acetón prípadne isopropanol s vodnou zložkou v rôznom pomere [29]. Výnimočne boli na extrakciu použité aj 100% organické prípadne vodné extrakčné rozpúšťadlá. Prídavok kyseliny do extrakčného rozpúšťadla navyše znižuje degradáciu fenolických látok vplyvom oxidácie. Pridávaním kyseliny do roztoku extrakčného rozpúšťadla dochádza k zvýšeniu koncentrácie H⁺ iónov, ktoré stabilizujú voľné radikály vznikajúce počas UAE [30]. Pomer organického a vodného rozpúšťadla je volený na základe afinity cieľových analytov. V prípade polárnych látok bude podiel obsahu vodnej zložky väčší, v prípadne nepolárneho analytu bude postup opačný [11].

Použitie správneho pomeru rozpúšťadla a vzorky má nie len ekonomickú relevanciu ale taktiež ovplyvňuje aj efektívnosť extrakcie a v prípade niektorých organických rozpúšťadiel môže mať aj ekologický zmysel. Na sledovanie vplyvu pomeru vzorky a rozpúšťadla bolo publikovaných niekoľko štúdií, avšak ich výsledky sa rôznili. Napríklad, štúdia ktorá sledovala pomer rozpúšťadla a vzorky 2,5:1 a 5:1 na extrakciu fenolických látok z ryže potvrdila vyššiu výťažnosť pri použití pomeru 5:1 (Widiastuti Setyaningsih, 2019). Štúdia zameraná na extrakciu antokyánov z kvetov, stanovila optimálny pomer rozpúšťadla a vzorky 33,3:1 [31]. Vplyv pomeru rozpúšťadla ku vzorke na výťažnosť extrakcie možno pripísať zníženiu hustoty zmesi v dôsledku použitia vyšších pomerov, čím sa zvyšuje rýchlosť šírenia ultrazvukových vln, znižuje sa útlm výkonu ultrazvuku a zvyšuje sa energia prenosu. Práve efektívny prenos energie, ako výsledok zníženej denzity zmesi sa podieľa na zvýšení výťažnosti. Znížená hustota zmesi zase zvyšuje kavitačný efekt UAE [32].

Niektoré štúdie sa zaoberali aj porovnaním vplyvu extrakčnej metódy na biologické vlastnosti extrahovaných fenolických látok. Niekoľko štúdií napríklad potvrdzuje vyššiu antioxidačnú aktivitu extraktov získaných pomocou UAE v porovnaní s konvenčnými extrakčnými metódami. Práve tieto výsledky robia z UAE preferovanú metódu extrakcie v porovnaní s konvenčnými metódami [33, 34]. Podobné výsledky boli pozorované aj pri sledovaní antimikrobiálnej aktivity extraktov získaných z medicínálnych bylín. V porovnaní s konvenčnými metódami poskytovali extrakty pripravené pomocou UAE najlepší antibakteriálny účinok [35]. Dokonca štúdia ktorá porovnávala antimikrobiálny účinok extraktov získaných pomocou UAE, macerácie, PLE - extrakcie rozpúšťadlom za zvýšeného tlaku) a SFE, potvrdila najvýraznejší antimikrobiálny účinok extraktu pripraveného SFE, nasledoval extrakt získaný UAE, maceráciou a PLE [36].

2.1.2. Mikrovlnná extrakcia

Pri MAE sa využíva energia mikrovlnného žiarenia na zahriatie zmesi vzorky a extrakčného rozpúšťadla. Vzniknuté teplo uľahčuje difúziu rozpúšťadla do štruktúry vzorky a zlepšuje tak uvoľnenie analytov do rozpúšťadla [9, 37]. Difúzia rozpúšťadla cez vzorku narušuje vodíkové väzby v štruktúre vzorky, čím umožňuje efektívnejší prechod analytov do rozpúšťadla. Medzi hlavné výhody MAE patrí časová úspora a používanie nízkych objemov rozpúšťadiel [6, 8].

MAE sa využíva predovšetkým na extrakciu fenolických kyselín a flavonoidov s krátkymi reťazcami. Zložitejšie štruktúry polymérnych fenolických látok ako sú antokyány a taníny sa pomocou MAE extrahujú len zriedkavo. Tieto štruktúry obsahujú množstvo substituentov viazaných pomocou hydroxylových skupín, čo pri pôsobení tepla zvyšuje možnosť ich poškodenia. Nárast teploty počas MAE je úmerný dobe jej aplikácie a použitému výkonu, to však neplatí vo vzťahu ku hmotnosti vzorky

a tepelnej kapacity rozpúšťadla. Všeobecne, použitím vyššej teploty a menšieho objemu extrakčného rozpúšťadla dochádza ku zvýšeniu difúzie a zrýchleniu extrakčnej kinetiky [38].

Pred použitím MAE je vhodné zvážiť nasledovné: typ materiálu, typ a čistotu rozpúšťadla, čas a výkon extrakcie, veľkosť povrchu vzorky a teplotu. Avšak, najkritickejším bodom je výber vhodného rozpúšťadla, ktoré významne ovplyvňuje mieru rozpustnosti cieľových analytov. Okrem miery afinity analytov k rozpúšťadlu sa taktiež sleduje jeho schopnosť absorpcie mikrovlnného žiarenia. Napríklad použitie hexánu a dichlórometánu nie je možné nakoľko tieto rozpúšťadlá neabsorbujú mikrovlnnú energiu. Naopak, vhodné sú rozpúšťadlá ako voda, etanol, metanol, prípadne ich kombinácie. Tieto rozpúšťadlá disponujú výbornou absorpčnou kapacitou a dochádza k ich rýchlemu ohrevu, čím sa zase skraca čas extrakcie. Navyše, samotné nemajú nepriaznivé účinky na extrahované termolabilné analyty [39].

2.1.3. Extrakcia rozpúšťadlom za zvýšeného tlaku

Metóda PLE sa radí medzi zelené extrakčné metódy, pretože dochádza k redukcii používania toxických organických rozpúšťadiel. PLE využíva pôsobenie vysokého tlaku (3,3 – 20,3 MPa), aby dochádzalo k udržaniu rozpúšťadiel v kvapalnom stave aj pri použití extrakčných teplôt nad ich bodom varu (40 – 200 °C). Pri takýchto podmienkach sa zvyšuje rozpustnosť látok a urýchľuje sa ich prechod do rozpúšťadla. Zvýšená teplota pozitívne vplýva na výťažnosť extrakcie znížením viskozity a povrchového napätia extrakčného rozpúšťadla. Výhodou metódy je dosahovanie vysokej výťažnosti a používanie malých objemov rozpúšťadiel v porovnaní s konvenčnými metódami [40, 41]. Špecifikom je, že PLE podporuje lepšie využitie aj čistej vody ako extrakčného rozpúšťadla, tzv. subkritickú extrakciu vodou vďaka pôsobeniu vysokej teploty a tlaku počas extrakcie. Táto metóda je tiež známa ako PHWE (pressurized hot water extraction). Počas extrakcie sa používa relatívne mierny tlak na udržanie vody v kondenzovanej podobe. Pri extrakciách s teplotou 200 °C je to napríklad 15 bar a pri teplote 300 °C 85 bar. Kritický bod vody je 374 °C [42]. Pri použití teplôt okolo 200 °C dochádza ku zmene dielektrickej konštanty vody, čo spôsobuje, že voda má podobné vlastnosti ako organické rozpúšťadlá a dochádza tak ku zvýšeniu jej extrakčnej kapacity [43].

Medzi dôležité faktory, ktoré ovplyvňujú výťažnosť extrakcie patrí typ rozpúšťadla, teplota, čas extrakcie, obsah vody vo vzorke, veľkosť častíc vzorky, prípadne rýchlosť prietoku rozpúšťadla extrakčnou celou. Pri aplikácii zvýšeného tlaku sa všeobecne predpokladá uľahčenie ruptúry matrice vzorky a následné zjednodušené prenikanie rozpúšťadla do jej štruktúr. Avšak, na základe výsledkov publikovaných štúdií sa zistilo, že tlak nie je významný faktor pokiaľ jeho hodnota postačuje na udržanie roztoku v kvapalnom stave počas celej doby extrakcie [1, 44]. Výber vhodného rozpúšťadla je najdôležitejším bodom optimalizácie PLE, ktorý rozhoduje o miere rozpustnosti analytu a jeho

difuzivite. Pri výbere rozpúšťadla je taktiež dôležité zohľadniť nie len vlastnosti cieľových analytov ale aj povahu vzorky. Rýchlosť extrakcie analytov s nízkou koncentráciou je ovplyvnená najmä rýchlosťou prenosu hmoty. Teda, pri extrakcii koncentrovaných analytov je objem extrakčného rozpúšťadla v extrakčnej cele rýchlo nasýtený a na dosiahnutie potrebnej výťažnosti je potrebných niekoľko extrakčných cyklov. Na predbežný výber vhodného extrakčného rozpúšťadla môže poslúžiť Hansenov parameter rozpustnosti, ktorý popisuje rozpustnosť látok v rôznych rozpúšťadlách [44, 45]. Na základe publikovaných štúdií sa ako najčastejšie extrakčné rozpúšťadlá pre extrakciu fenolických látok používa metanol, etanol a voda, prípadne ich kombinácia. Nakoľko je štruktúra fenolických látok veľmi rôznorodá, už malé zmeny v zložení rozpúšťadla budú mať vplyv na mieru extrakcie jednotlivých analytov. Napríklad štúdia ktorá sa zaoberala extrakciou fenolických látok z petržlenu narazila na problém spojený s optimalizáciou rozpúšťadla, kedy nebolo možné optimalizovať zloženie rozpúšťadla do takej miery, aby dochádzalo ku extrakcii všetkých fenolických látok [46].

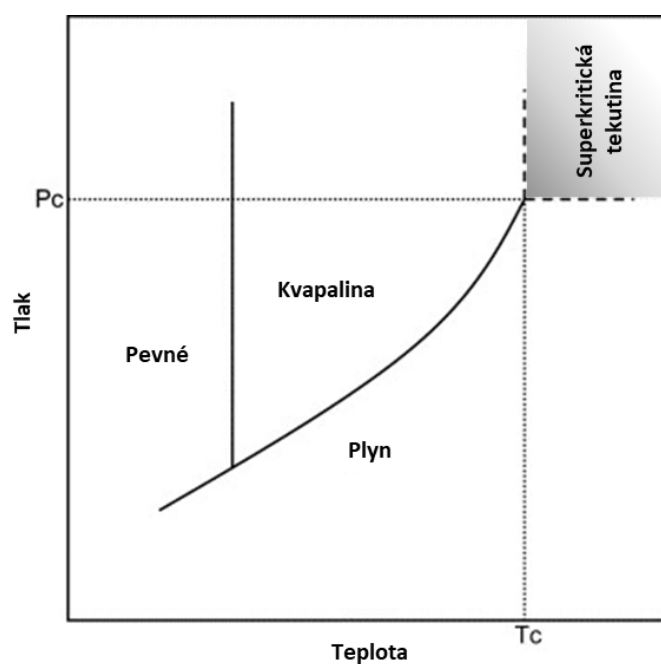
Medzi nevýhody PLE patrí nízka selektivita extrakcie a koextrakcia interferujúcich látok, relatívne vysoké nariedenie extraktov pri použití viacerých extrakčných cyklov a tiež potreba špeciálnej inštrumentácie [46]. Taktiež použitie vysokých extrakčných teplôt môže byť pre určité skupiny termolabilných látok limitujúcim faktorom. Názory na vhodnosť použitia takto vysokých teplôt na extrakciu aj termolabilných fenolických látok sa preto v rámci vedeckej komunity líšia. Napríklad štúdia, ktorá sa zameriavala na extrakciu antioxidantov z hroznových výliskov sledovala vplyv teploty až do 200 °C a času extrakcie až 30 minút na výťažnosť extrakcie. Na základe výsledkov bolo pozorované, že s nárastom teploty a súčasne doby extrakcie dochádzalo od určitého bodu nie len k poklesu výťažnosti metódy ale aj k vzniku nežiadúcej Maillardovej reakcie a jej produktov v podobe melanoidínov. Optimálna teplota pre extrakciu antokyánov bola približne 100 °C a pre taníny 150 °C [47]. Podobne, nepriaznivý vplyv použitia vyššej teploty bol pozorovaný aj v štúdiu zameranej na extrakciu sušených jablkových výliskov, kedy pri teplote nad 150 °C bolo pozorované nežiadúce neenzymatické hnednutie extraktu, ktoré sprevádzala tvorba hydroxymethylfurfuralu [48]. Naopak iná štúdia uvádza úspešné použitie metódy PLE na extrakciu antokyánov z čiernej mrkvy, kedy uvádza, že degradácia antokyánov je vo veľkej miere závislá od času extrakcie. Teda, kombináciou síce vysokej extrakčnej teploty ale krátkeho času extrakcie sa dá takejto degradácii predchádzať [49].

Na docielenie lepšej izolácie cieľových analytov sa používa PLE v off-line prevedení, prípadne in-line zapojení s SPE filtrom. V prípade on-line prevedenia je potrebné umiestniť SPE filter priamo do extrakčnej cely, kedy je od priameho kontaktu so vzorkou oddelený pomocou disperzného prostriedku. Iné typy on-line zapojení už vyžadujú automatizáciu, kedy sa extrakt zo zbernej nádoby automaticky prevádza do SPE zariadenia [43]. On-line zapojenie PLE s SPE bolo napríklad využité na extrakciu a frakcionáciu fenolických látok z jablčných výliskov. Práve pri on-line zapojení je potrebné vziať do

úvahy možné ovplyvnenie procesov SPE, kedy so zvýšením teploty môže dôjsť ku zníženiu účinnosti adsorpcie na SPE filtre [50].

2.1.4. Extrakcie s využitím CO₂

SFE sa radí medzi moderné a zelené extrakčné metódy. Extrakcia prebieha použitím superkritickej tekutiny (SCF), ktorá vzniká prekročením kritického bodu teploty a tlaku. V okamihu prekročenia kritických bodov sa stráca fázové rozhranie kvapalina-plyn. Ako rozpúšťadlo sa najčastejšie používa CO₂ z dôvodu ľahko dosiahnuteľných kritických bodov teploty (31,3°C) a tlaku (7,34 MPa) (Obrázok 1). Výhodou použitia CO₂ je taktiež jeho netoxickosť, nehorľavosť, pomerne nízka cena a dostupnosť aj vo vysokej čistote. V porovnaní s kvapalinami má SCF vyššiu difuzivitu, nižšiu densitu a viskozitu, a nižšie povrchové napätie. Naopak, viskozita a stlačiteľnosť SCF je porovnateľná s plynmi. Solvatačná sila SCF môže byť jednoducho upravená už malými zmenami v hodnotách použitého tlaku a teploty, kedy dochádza ku zmene denzity. Solvatačná sila SCF sa tak zvyšuje so zvýšením tlaku a znižuje so zvýšením teploty. Medzi výhody SFE patria výborné transportné vlastnosti SCF vyplývajúce z vysokej difuzivity a nízkej viskozity SCF. To umožňuje používanie kratších extrakčných časov a dosahovanie vysokej výťažnosti. Navyše, CO₂ je pri laboratórnych podmienkach plyn, takže po skončení extrakcie a odtlakovaní systému dochádza k samovoľnému vyprchaniu CO₂ z extraktu bez potreby kroku odparovania. Vďaka nízkym kritickým hodnotám tlaku a teploty je SFE vhodná aj na extrakciu termolabilných látok. Taktiež absencia svetla a kyslíka počas extrakcie minimalizuje riziko možných degradačných reakcií fenolických látok [51, 52].



Obrázok 1: Fázový diagram. Prevzaté z [51].

Značnou limitáciou použitia CO₂ je jeho nepolárny charakter, čo znemožňuje jeho použitie na extrakciu polárnejších látok a to najmä z rastlinného materiálu. Všeobecne platí, že so zvyšujúcim sa počtom polárnych funkčných skupín (hydroxylová, karboxylová, amino, nitro) klesá rozpustnosť analytov v CO₂. Možnosťou je však prídavok polárneho modifikátoru/kosolventu, ktorým dochádza k zvýšeniu polarizácie SCF. Najčastejšie sa používajú organické modifikátory ako etanol a metanol, isopropanol, etylacetát, prípadne acetonitril. Možnosťou je taktiež prídavok vody, avšak v dôsledku obmedzenej miešateľnosti s CO₂ sa pridávajú len malé objemy [23, 50, 51].

Ďalšou možnosťou je použitie CO₂ v jeho stlačenej kvapalnej podobe ako prídavok do organického rozpúšťadla, kedy dochádza k tvorbe kvapaliny obohatenej plynom (GXL, gas expanded liquid), ktorá predstavuje alternatívny typ extrakčného média. Zloženie GXL môže byť jednoducho upravené, pričom vyšší obsah CO₂ podporuje prenos hmoty počas extrakcie, naopak vyšší podiel organického rozpúšťadla zvyšuje rozpustnosť extrahovaných látok. Na rozdiel od SFE kde sa počas extrakcie aplikuje tlak v stovkách barov, GXLE prebiehajú za aplikácie len desiatok barov a teda nedochádza už k dosiahnutiu superkritických podmienok [53–56].

Rozpúšťaním CO₂ v organickom rozpúšťadle dochádza ku jeho objemovej expanzii za vzniku GXL. Pri tomto procese dochádza okrem objemovej zmeny aj ku zmene denzity, stlačiteľnosti, viskozity, dielektrických vlastností a schopnosti prenosu hmoty. Avšak, nie všetky rozpúšťadlá expandujú po pridaní CO₂ v rovnakej miere. Miera expanzie závisí od ich schopnosti rozpúšťať CO₂. Práve podľa tejto schopnosti sa rozdeľujú kvapaliny do troch skupín. Do prvej skupiny sa radí voda, ktorá má nedostatočnú schopnosť rozpúšťať CO₂ a preto nedochádza k jej významnej expanzii ale len k zmene acidity. Avšak, prídavkom acetonitrilu alebo metanolu, ktorých rozpustnosť vo vode a CO₂ je rovnaká, je možné vytvárať terciárne zmesi aj s obsahom vody. Do druhej skupiny rozpúšťadiel patrí väčšina organických rozpúšťadiel ako napríklad metanol a hexán. Tie sa v CO₂ rozpúšťajú vo veľkých množstvách, dochádza k ich výraznej objemovej expanzii a teda aj k zmenám vo fyzikálnych vlastnostiach. Do tretej skupiny patria napríklad iónové kvapaliny, tekuté polyméry a ropa, ktoré rozpúšťajú len malé množstvá CO₂, teda aj ich expanzia je len mierna [57–60].

Pri vývoji SFE prípadne GXLE metód je dôležitá optimalizácia hneď niekoľkých parametrov. Vzhľadom na fyzikálno-chemické vlastnosti cieľových analytov je dôležitý pomer CO₂/kosolvent a tiež samotné zloženie kosolventu (typ organického rozpúšťadla, prídavok vody), v prípade SFE je potrebné zväžiť použitie prídavného rozpúšťadla (make-up solvent), nasleduje optimalizácia tlaku, teploty, rýchlosti prietoku rozpúšťadla cez extrakčnú celu, čas extrakcie, typ extrakcie (statická, dynamická), veľkosť častíc vzorky a spôsob ich uloženia v extrakčnej cele. Niektoré z menovaných premenných môžu mať simultánny účinok, preto je potrebné identifikovať hlavné faktory ktoré ovplyvňujú

výťažnosť extrakcie. Na tento účel sa najčastejšie používajú softvéry dizajnu experimentu, ktoré umožňujú štúdium vplyvu testovaných faktorov na extrakciu a pomocou relatívne malého počtu experimentov aj optimalizáciu metód. V porovnaní s konvenčnými extrakčnými metódami umožňuje množstvo optimalizovateľných parametrov veľmi citlivé nastavenie SFE a GXLE metód pre konkrétny typ analytov [61–63].

Extrakčné metódy SFE a GXLE sa vďaka možnosti jemného nastavenia širokého spektra parametrov s obľubou využívajú na extrakciu bioaktívnych látok z rastlinného materiálu. Boli publikované štúdie zamerané aj na extrakciu polárnych fenolických látok z jablčných výliskov [63, 64], sušených jablák [65] prípadne jablčnej šupky [66]. Za týmto účelom obsahovalo extrakčné rozpúšťadlo v rôznej miere prídavok etanolu prípadne vody. Naopak, extrakcia oleja z jablčných jadier sa uskutočnila pomocou čistého CO₂ za aplikácie vysokého tlaku [67].

Súčasťou príloh dizertačnej práce je aj komentár publikácie, ktorá sa zaoberala vývojom a GXLE a jej následným porovnaním so sonikačnou metódou. Obe extrakcie boli použité na extrakciu vybraných fenolických látok zo sušených jablák.

2.2. Moderné trendy vo vývoji separačných metód

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) predstavuje analytickú metódu, ktorá sa používa na separáciu, identifikáciu a kvantifikáciu jednotlivých zložiek vzorky. Medzi hlavné časti HPLC systému patrí chromatografická kolóna naplnená stacionárnou fázou (SF), čerpadlo ktoré umožňuje pohyb mobilnej fázy (MF) cez kolónu, a detektor, ktorý poskytuje kvalitatívnu a kvantitatívnu informáciu o separovaných zložkách. Kvalitatívnu informáciu predstavuje retenčný čas látky, čo je doba od nadávkovania vzorky až po jej prechod detektorom. Retenčný čas látky ovplyvňujú jej fyzikálno-chemické vlastnosti, ktoré aj v závislosti od zloženia MF, vplývajú na afinitu látky k SF. Na základe rôznych afínit jednotlivých komponentov vzorky, dochádza k tomu, že jednotlivé zložky so SF interagujú rôzne dlhú dobu a tým dochádza k ich rozdeleniu do zón. Prechod takejto zóny cez detektor poskytuje signál v tvare chromatografického píku, a jeho plocha predstavuje kvantitatívny údaj [68], [69]. Metódy kvapalinovej chromatografie (LC) sa využívajú predovšetkým na farmaceutickú [70], environmentálnu, forenznú a klinickú analýzu [71–73], ale aj na analýzu potravín a potravinových doplnkov [74–76].

V snahe znížiť čas analýzy a zachovať, prípadne zvýšiť účinnosť separácie zložiek komplexných vzoriek, vzniklo niekoľko riešení, ktoré tieto ciele naplňajú. Jedným z prístupov bol vývoj nových typov monolitických a časticových SF [77, 78]. Z časticových SF sa jednalo predovšetkým o vývoj SF s časticami menšími ako 2 μm [79], povrchovo poréznymi časticami (superficially porous particles, SPP)

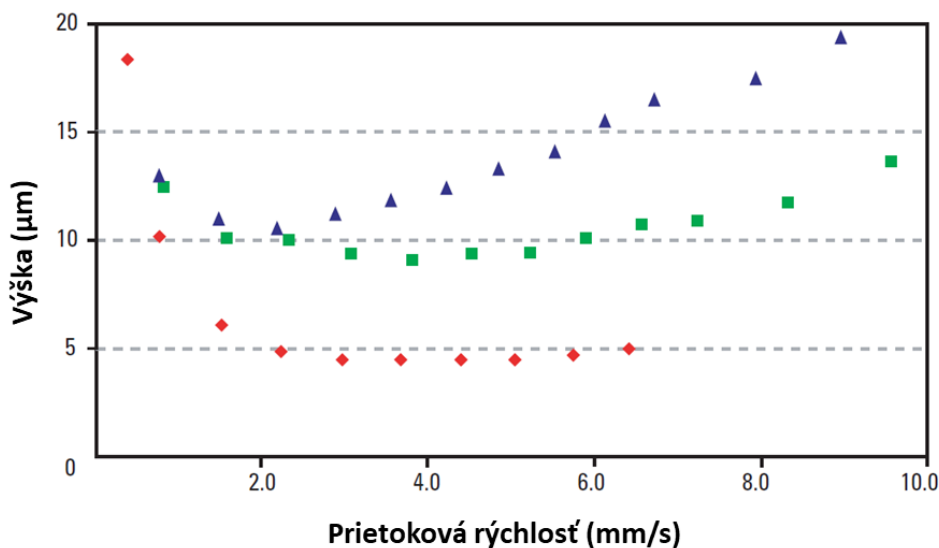
a viacvrstvových častíc [80, 81]. V snahe zvýšiť odolnosť chromatografických kolón voči pH a zníženiu reaktivity voľných silanolových skupín, ktoré nie sú modifikované viazanou funkčnou skupinou, sa tieto reaktívne funkčné skupiny modifikujú trimetylsiloxanom. Táto modifikácia silanolových skupín sa nazýva endcapping [82]. Ďalšie riešenie ako zvýšiť účinnosť separácie a zároveň skrátiť dobu analýzy, je použitie vyššej separačnej teploty (až do 200 °C) [83, 84]. Všetky vyššie uvedené stratégie však vyžadovali značné technologické úpravy a vylepšenia klasickej chromatografickej inštrumentácie, predovšetkým jej schopnosť odolávať vysokému spätnému tlaku, rýchly ohrev MF, miniaturizáciu inštrumentácie a s tým spojené zníženie mimokolonových objemov, a tiež vývoj detektorov s malými detekčnými celami a schopnosťou rýchleho zberu dát [85, 86].

Súčasťou doktorandského štúdia bol aj vývoj separačných metód pre stanovenie obsahu fenolických látok a SG. Z pohľadu separácie fenolických látok a SG zohrával vývoj moderných trendov LC dôležitú úlohu. Nakoľko sa tieto typy analytov vyznačujú značnou štruktúrnou podobnosťou, dosahovanie potrebného rozlíšenia s primeraným separačným časom je náročné. Práve vývoj moderných typov SF na báze častíc menších ako 2 µm, SPP, viacvrstvových častíc, prípadne SF so špecifickou povrchovou modifikáciou napríklad pre separáciu polárnych látok umožnil dosiahnutie potrebnej separačnej účinnosti aj v kombinácii s krátkymi časmi analýz. Separácia fenolických látok prebieha najčastejšie s využitím reverzných fáz (RP) na báze oktadecylsilikagélu (C18), v prípade SG sú to SF na báze RP prípadne hydrofilnej interakčnej chromatografie (HILIC). Pre optimalizáciu separácie týchto analytov sa najčastejšie používa gradientová elúcia, ktorá umožňuje citlivejšie ovplyvňovanie interakcie analytov so SF. Ďalšie zvýšenie nie len účinnosti separácie aj citlivosti stanovenia bolo dosiahnuté zapojením týchto nových typov SF do UHPLC zariadení. V rámci toho boli testované aj nové typy SF na báze SPP, plne poréznych častíc (FPP) a viacvrstvových častíc. Podrobnejšie informácie o vývoji separačných metód sú uvedené v komentároch v kapitole 4.

2.2.1. Ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia UHPLC

Ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia (UHPLC) predstavuje metódu LC, kedy sa typicky využívajú kolóny s časticami menšími ako 2 µm. Použitie SF s menšími časticami vedie nie len k zväčšeniu špecifického separačného povrchu, ale taktiež k skráteniu difúzných vzdialeností v poréznej vrstve SF (rýchlejší prenos hmoty). Výsledkom je skrátenie času analýzy, zvýšenie rozlíšenia a citlivosti detekcie. Pri zhotovení Van Deemterovej krivky je možné pozorovať, že na rozdiel od častíc s väčším priemerom, nedochádza pri použití vyšších lineárnych prietokov k výraznej strate separačnej účinnosti (Obrázok 2). Celkovo je možné povedať, že pri izokratrickej elúcii je veľkosť častíc nepriamoúmerná optimálnej rýchlosti prietoku MF. Zároveň platí, že výška teoretického patra je

nepriamoúmerná veľkosti častice. Napríklad, zmenšením veľkosti častíc z 5 na 1,7 μm , tak dochádza k trojnásobnému zvýšeniu počtu teoretických pater [87, 88].



Obrázok 2: Znázornenie účinnosti separácie v závislosti na použitej veľkosti častíc. Rozmery kolóny 3,1 x 50 mm, MF ACN/voda v pomere 7:3 (v/v), teplota 25°C. Veľkosť častíc 1,7 μm (červená); 3,5 μm (zelená), 5,0 μm (modrá). Prevzaté zo zdroja [89].

Uvedeniu prvého komerčne vyrábaného UHPLC prístroja na trh v roku 2004 predchádzalo množstvo technologických vylepšení, ktoré mali za úlohu odstrániť značné inštrumentálne limitácie HPLC prístrojov. Keďže pri použití tak malých častíc dochádza ku generovaniu vysokého spätného tlaku, až do 130 MPa, bolo potrebné zabezpečiť tesnosť spojení a rovnako odolnosť čerpadiel a chromatografických kolón. Zmenšením veľkosti častíc dochádza k zúženiu (zaostreniu) elučných zón a preto je minimalizovanie mimokolonových objemov zásadným predpokladom pre udržanie separačnej účinnosti kolóny. V prípade UHPLC inštrumentácie sú typické mimokolónové objemy 1 – 6 μl , u HPLC 250 – 400 μl . K rozmývaniu elučných zón dochádza aj v samotných detektoroch, preto boli vyvinuté detekčné cely s minimálnym objemom, kedy je potrebná dĺžka optického prostredia 10 mm dosiahnutá viacnásobným riadeným odrazom. V porovnaní s HPLC, kde objem detekčnej cely dosahuje 8-15 μl , je objem takto usporiadanej detekčnej cely UHPLC prístroja približne len 500 nl. V prípade fluorescenčných prietokových ciel však dochádza zmenšením ich objemu ku zníženiu signálu emitovaných fotónov, preto je potrebné použitie lampy s vysokou excitačnou energiou. Ďalšie zníženie disperzie je možné dosiahnuť skrátením kapilár a zmenšením ich priemeru, prípadne použitím nástrekovvej smyčky s malým objemom [89].

Okrem objemu detekčnej cely je pre detektory v UHPLC dôležitá aj rýchlosť zberu dát. Pre zabezpečenie spoľahlivej schopnosti kvantifikácie rýchlych separácií s úzkymi píkmi (< 1 s) je

potrebných minimálne 20 bodov na šírku píku. Preto, musí byť minimálna rýchlosť zberu dát 20 bodov/s. Pri použití gradientových separácií je dôležitým parametrom aj oneskorenie gradientu. V prípade UHPLC je objem oneskorenia do 109 μl , u HPLC od 50 do 1000 μl [89]. Z dôvodu vysokého spätného tlaku je kritickým krokom aj samotný nástrek vzorky, pri ktorom nesmie dochádzať k prílišnej fluktuácii tlaku, ktorá by mohla poškodiť SF. Nástrekový systém musí umožňovať rýchly nástrek malých objemov vzorky a s minimálnym prenosom medzi analýzami jednotlivých vzoriek [89, 90].

Výhody UHPLC

- Rýchlosť separácie
- Vyššia účinnosť separácie
- Vyššia citlivosť detekcie
- Nižšia spotreba rozpúšťadiel
- Analýza komplexných vzoriek (vyššia píkova kapacita)
- Nižšia cena analýzy

Nevýhody UHPLC

- Nižšia životnosť kolón
- Vyššie vstupné náklady [90]

Z dôvodu vysokého spätného tlaku UHPLC separácií dochádzalo aj ku zvýšeniu technologických nárokov na mechanickú odolnosť SF. SF na báze silikagélu disponujú vhodnou mechanickou stabilitou, avšak nevýhodou je ich úzky rozsah teplotnej stability, pH stability a tendencia k chvostovaniu píkovo základných látok. Naopak, kolóny na báze polymérov poskytovali stabilitu v širokom rozmedzí pH, avšak typická je ich nízka účinnosťou pre separáciu malých molekúl a menšia mechanická stabilita. Ideálnu kombináciu mechanickej odolnosti, pH stability a účinnosti predstavujú SF na báze hybridných materiálov [91]. Ďalším dôležitým parametrom je samotná výroba a plnenie kolón SF. Aby nedochádzalo k zníženiu účinnosti separácie, plnenie UHPLC kolón musí byť homogénne a disperzia veľkosti častíc minimálna (menej ako 5% RSD) [90].

Prvé komerčne dostupné UHPLC kolóny s rozmermi 50/100 mm x 2,1 mm boli plnené plne poréznymi časticami na báze hybridnej technológie BEH (bridged ethyl hybrid, hybridná stacionárna fáza s etylénovými mostíkmi) s veľkosťou 1,7 μm a naviazanými funkčnými skupinami C18 [87]. V súčasnosti sú dostupné SF na báze silikagélu alebo hybridných materiálov s rôznou selektivitou povrchovej úpravy a kompatibilitou pre jednotlivé módy kvapalinovej chromatografie – RP, HILIC, normálne fázy, iónovo výmennú a vylučovaciu chromatografiu [89].

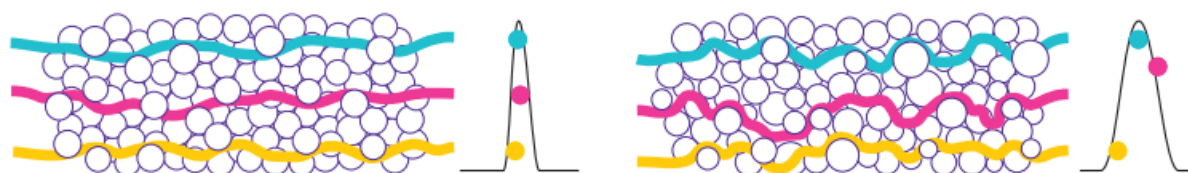
Ďalším pokrokom vo vývoji SF pre UHPLC bolo vytvorenie častíc s úplne inou štruktúrou, kedy dochádza ku kombinácii porézneho povrchu s neporéznym jadrom menším ako 2 μm . Tieto častice sú vo všeobecnosti známe ako SPP a v kombinácii s kolónami o vnútornom priemere 4,6 mm predstavujú

vhodnú alternatívu rýchlej chromatografie a zvýšenej účinnosti aj na zariadeniach HPLC, ktoré na rozdiel od UHPLC neodolávajú tak vysokým spätným tlakom.

2.2.2. Stacionárne fázy s povrchovo poréznyimi časticami

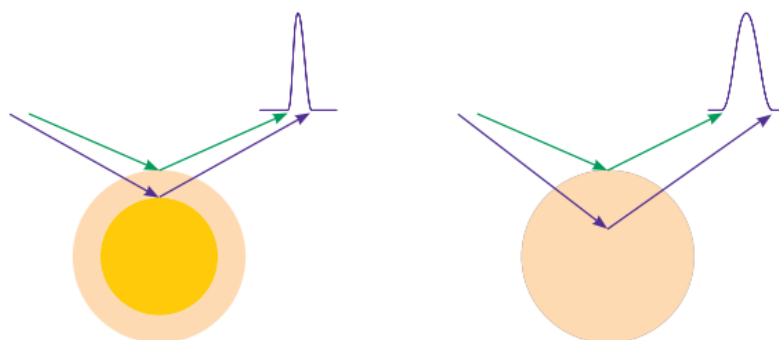
Ako bolo vyššie načrtnuté, ďalším spôsobom ako doceliť zvýšenie účinnosti a rýchlosti LC je použitie SPP, tiež známych aj ako Core-Shell a Fused-Core častíc (v závislosti od výrobcu). Kolóny s SPP boli po prvýkrát komerčne dostupné v roku 2007 pod firemným označením Halo® (Advanced Materials Technology), Ascentis® (Supelco), Kinetex™ (Phenomenex), Poroshell (Agilent), Cortecs® (Waters), Accucore™ (Thermo Fisher Scientific), Ultracore™ (Advanced Chromatography Technologies) [86, 92]. V súčasnosti sú komerčne dostupné chromatografické kolóny so SPP o veľkosti 5 μm , 2,7 – 2,6 μm a 1,6 -1,7 μm [93].

Štruktúra SPP je tvorená pevným a neporéznym silikagélovým jadrom a homogénne poréznym obalom. Najčastejšie sa využívajú častice s veľkosťou 2,7 μm , ktorých neporézne jadro má veľkosť 1,7 μm a porézny obal má hrúbku 0,5 μm . Práve špecifická štruktúra častíc má pri ich výrobe zásadný vplyv na úzku distribúciu veľkosti častíc. To zároveň umožňuje použitie frít s väčšou poréznosťou, ktoré sú menej náchylné na upchanie. Úzka distribúcia veľkosti častíc umožňuje homogénnejšie plnenie kolón, kedy medzi časticami vznikajú len malé medzery. Homogenita plnenia kolóny priaznivo ovplyvňuje člen A Van Deemterovej rovnice, vírivú difúziu, pretože dochádza ku zjednoteniu dĺžky difúznej cesty častíc, čím sa minimalizuje rozmývanie chromatografických zón a zvyšuje citlivosť detekcie (Obrázok 3) [86, 94, 95].

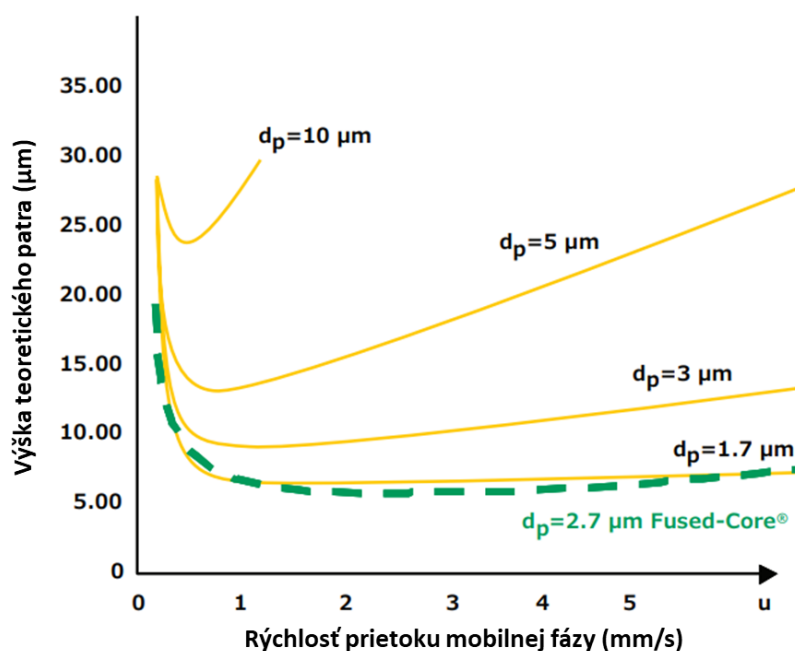


Obrázok 3: Znáznornenie vplyvu homogenity plnenia chromatografickej kolóny na vírivú difúziu, člen A Van Deemterovej rovnice. Prevzaté z [96].

Zmenšením hrúbky poréznej časti SPP, dochádza ku skráteniu difúznej vrstvy do ktorej analyty prenikajú (Obrázok 4). Znižuje sa tak odpor voči prenosu hmoty, čo je zároveň člen C Van Deemterovej rovnice, a píky majú ostrejší tvar. Keďže rýchlosť prietoku mobilnej fázy nemá vplyv na člen C Van Deemterovej rovnice, účinnosť separácie sa neznižuje ani pri vyšších prietokoch MF čo umožňuje ďalšie urýchlenie analýzy (Obrázok 5). Táto vlastnosť je dôležitá predovšetkým pri separácii väčších molekúl, kedy pri zníženej schopnosti prenosu hmoty dochádza ku strate účinnosti separácie [86, 94, 95].

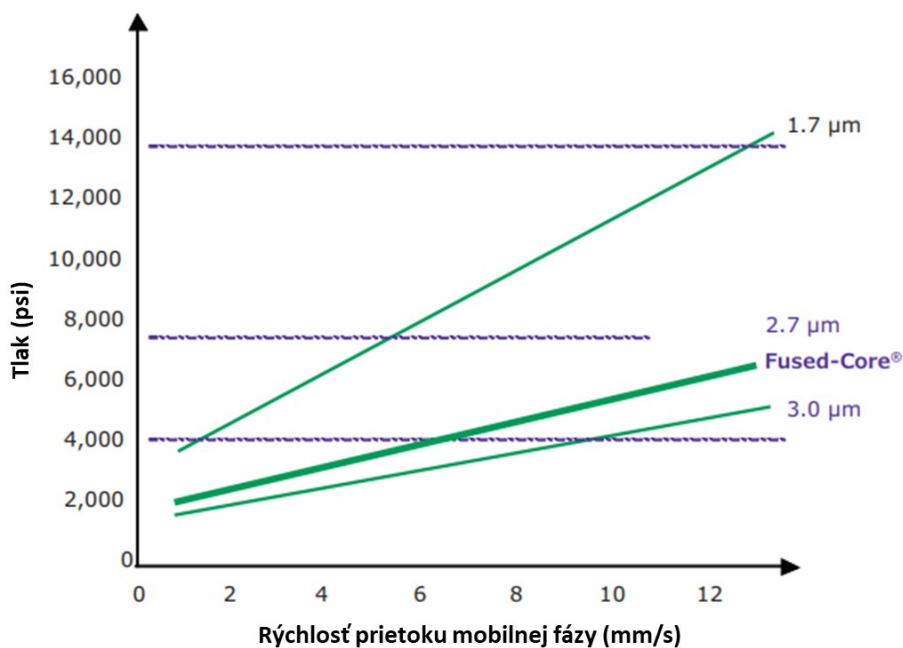


Obrázok 4: Porovnanie vzdialenosti difúzných vrstiev povrchovo poréznej (vľavo) a plne poréznej častice (vpravo) a znázornenie vplyvu na člen C Van Deemterovej rovnice. Prevzaté z [96].



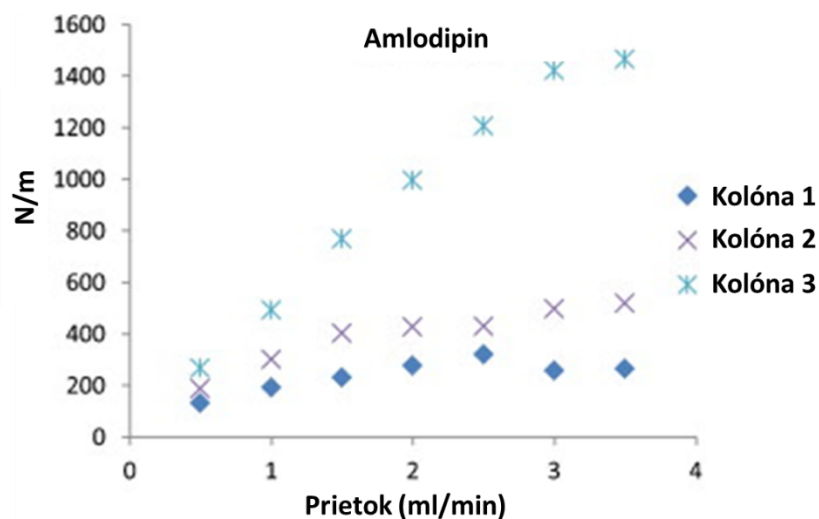
Obrázok 5: Porovnanie účinnosti povrchovo poréznych častíc s veľkosťou 2,7 μm (zelená) a plne poréznych častíc s veľkosťou 3, 5 a 10 μm (žltá). Prevzaté z [96].

V porovnaní s FPP časticami menšími ako 2 μm používanými v UHPLC, 2,7 μm SPP častice generujú približne o polovicu nižší spätný tlak (Obrázok 6). Z toho dôvodu je možné pri ich zapojení používať vyššie prietokové rýchlosti, kedy dochádza k ďalšiemu urýchleniu analýzy. Nízky spätný tlak, ktorý generujú SPP umožňuje pre dosiahnutie potrebnej účinnosti separácie aj zapojenie dlhších kolón, prípadne umožňuje zapojenie kolón s SPP aj v HPLC, čo prináša významné zvýšenie účinnosti separácie bez nutnosti zmeny inštrumentácie [96].



Obrázok 6: Porovnanie vplyvu rýchlosti prietoku mobilnej fázy na generovaný spätný tlak pri použití FPP s veľkosťou 1,7 až 3 μm verus 2,7 μm SPP. Prevzaté z [96].

V porovnaní s FPP môžu SPP poskytovať až o 40 % vyššiu účinnosť separácie [96]. Bola publikovaná štúdia, zameraná na porovnanie účinnosti HPLC separácie enantiomérov pomocou kolón s rovnakými rozmermi 150 x 4,6 mm a rovnakým typom viazaného chirálneho selektoru. Dve kolóny využívali FPP o veľkosti 3 a 5 μm , tretia kolóna bola plnená SPP s veľkosťou 2,7 μm . Pri použití SPP autori udávajú až 50% skrátenie času analýzy, užšie a symetrickejšie píky. Taktiež sa hodnotil vplyv MF na počet teoretických pater. Na rozdiel of FPP, SPP vykazovali širšie rozmedzie optimálnych prietokových rýchlostí, s optimom pre FPP 0,5 ml/min a pre SPP 1 ml/min. Omnoho vyššia účinnosť SPP kolóny je výraznejšia predovšetkým pri použití ešte vyšších prietokových rýchlostí. Účinnosť separácie bola porovnaná na základe vplyvu rýchlosti prietoku MF verus počet teoretických pater na jednotku času (N/min) (Obrázok 7). Konkrétne pri prietoku 3 ml/min bol počet teoretických pater SPP až sedemkrát vyšší v porovnaní s 5 μm FPP kolónou [97].



Obrázok 7: Závislosť počtu teoretických pater na časovú jednotku (N/min) na rýchlosti prietoku MF. Rozmery kolón 150 x 4,6 mm, FPP 5 μm (kolóna 1), FPP 3 μm (kolóna 2), SPP 2,7 μm (kolóna 3). Porovnanie je zobrazené pre chirálnu separáciu amlodipinu. Prevzaté z [97].

V súčasnosti sú na trhu k dispozícii aj SPP s časticami menšími ako 2 μm , ktoré sa vyznačujú lepšou účinnosťou a rýchlosťou separácie než FPP s rovnakou veľkosťou typicky používanými v UHPLC. Aby sa dosahovalo potrebnej účinnosti, zásadnou limitáciou bolo v tomto smere optimalizovanie homogénosti plnenia kolóny tak, aby sa minimalizoval vplyv vírvej difúzie (člen A Van Deemterovej rovnice). Práve hrúbka poréznej vrstvy má zásadný vplyv na účinnosť separácie a mieru retencie analytov. To znamená, že častice s tenšou poréznu vrstvou poskytujú vyššiu účinnosť separácie a zároveň nižšiu schopnosť retencie [89, 98]. Dostupné sú SPP s veľkosťou 1,3 μm , avšak z dôvodu vysokého nárastu spätného tlaku sú komerčne dostupné iba s kolónami o dĺžke 50 mm. Častice s veľkosťou 1,7 μm sú plnené do kolón o dĺžke do 150 mm [99].

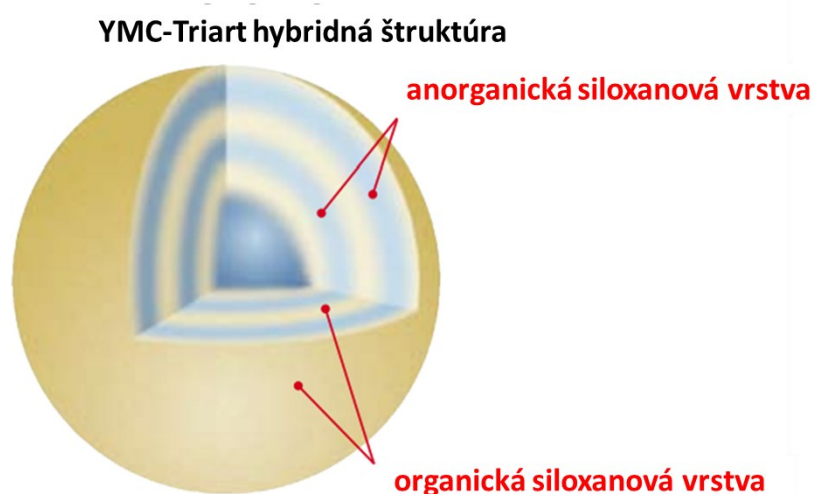
2.2.3. Povrchovo porézne častice s vrstvami

Neustála potreba zvýšenia účinnosti separácie, predovšetkým v prípade analýz komplexných vzoriek viedla k vývoju ďalšieho typu povrchovo poréznych častíc, ktoré okrem neporézneho jadra obsahujú dve porézne vrstvy (vnútornú a vonkajšiu). V závislosti od výrobcu sa môže poréznosť a modifikácia vnútornej a vonkajšej poréznej vrstvy líšiť. O tom, či bude účinnosť povrchovo poréznych častíc s dvomi porézny vrstvami vyššia než je účinnosť obdobných častíc s jednou poréznu vrstvou, rozhoduje predovšetkým veľkosť neporézneho jadra. V prípade, že je veľkosť neporézneho jadra pre danú separačnú metódu optimálna, účinnosť separácie sa pridaním druhej poréznej časti nezvýši. V prípade štandardných povrchovo poréznych častíc tvorí neporézne jadro približne 70 % priemeru častice a pridaním druhej poréznej vrstvy sa môže dosiahnuť zvýšenie účinnosti o 15-20 %. Vhodný

dizajn povrchovo poréznych častíc s dvomi vrstvami môže ponúknuť vyššiu separačnú účinnosť v prípade, ak je retencia a difuzivita vonkajšej vrstvy vyššia [81].

2.2.4. Viacvrstvé častice

Viacvrstvá technológia častíc bola vyvinutá za účelom zvýšenia účinnosti separácie chromatografických vzoriek, navyše s ohľadom na odolnosť voči širokému rozmedziu pH aj v kombinácii s použitím vyššej teploty separácie a bez dopadu na zníženie selektivity separácie. Technológia viacvrstvových častíc je komerčne dostupná od spoločnosti YMC (Obrázok 8). Viacvrstvé častice sú produkované pomocou prísne kontrolovanej technológie granulácie. Výsledkom je vznik viacvrstvej hybridnej (organicko-anorganickej) SF na báze silikagélu a organickej zložky, ktorá je charakteristická veľmi úzkou distribúciou nie len veľkosti častíc, ale aj veľkosti pórov. SF na báze viacvrstvových častíc tiež generuje nižší spätný tlak a má zvýšenú odolnosť voči preťaženiu kolóny vzorkou. Navyše, pre odstránenie nežiadúcich reakcií analytov s voľnými silanolovými skupinami sa používa tzv. „multistage endcapping“. Na tento účel sa používa skupina zlúčením s rôznou reaktivitou tak, že dochádza k maximálnemu pokrytiu reaktívnych silanolových skupín, čo zabraňuje chvostovaniu pík [100].



Obrázok 8: Znáznornenie štruktúry viacvrstvovej častice. Prevzaté z [100].

pH stabilita kolón udávaný výrobcom pre RP módy je 1 – 12 a pre HILIC 2 – 10. V prípade použitia vysokých separačných teplôt až do 70 °C, však dochádza k zúženiu vhodného pH rozmedzia pri ktorom ešte nedochádza k poškodeniu kolóny [100].

Vzhľadom na vyššie zmienené výhody použitia SF na báze viacvrstvových častíc, boli tieto typy kolón použité aj na separácie zložiek komplexných rastlinných vzoriek. Napríklad na vývoj chromatografickej metódy na separáciu piatich vybraných fenolických látok v extraktoch z častí jabloní ako sú listy, kôra

a puky. Optimálna separačná účinnosť a tvar píkovi boli dosiahnuté použitím kolóny YMC Triart C18 ExRS s využitím technológie viacvrstvových častíc [80]. Taktiež v štúdiu zameranej na izoláciu a separáciu florotanínov z morskej trávy bola použitá kolóna s technológiou viacvrstvových častíc, ktorá bola zapojená v systéme s hmotnostne spektrometrickou detekciou (MS) [101]. Kolóna s viacvrstvovými časticami bola využitá na semipreparatívnu chromatografiu pre oddelenie frakcií fenolických látok v štúdiu, ktorá sa zameriavala na identifikáciu zdraviu prospešných fenolických látok zo sladkého drievka [102]. Podobne, YMC C18 kolóna s technológiou viacvrstvových častíc s rozmermi 250 mm × 4 mm a 5 µm bola využitá v štúdiu zameranej na hodnotenie neuroprotektívnych účinkov fenolických látok z jedlej huby *Inonotus obliquus*, kde bol okrem troch vybraných fenolických látok separovaný aj enantiomerný pár [103].

2.3. Detekčné techniky pre stanovenie fenolických látok v rastlinných vzorkách

Náročnosť kvantitatívnej a kvalitatívnej charakteristiky extraktov rastlinných vzoriek vyplýva zo samotnej komplexnosti rastlinných matríc, ktoré okrem cieľových analytov ako sú napríklad fenolické látky obsahujú aj ďalšie komponenty ako farbivá, polysacharidy, fytosteroly, proteíny, vitamíny a stopové prvky. Práve tieto zložky matrice spolu s rozmanitosťou fenolických látok, ich vzájomnou štruktúrnou podobnosťou a rozdielmi v ich koncentračnom zastúpení významne zvyšujú nároky na separačnú účinnosť chromatografickej kolóny, selektivity a citlivosti detekcie [104]. Za účelom zvýšenia separačnej účinnosti metódy sa do mobilnej fázy častokrát pridávajú modifikátory, ktoré môžu ovplyvňovať citlivosť detekcie. To môže byť kritické predovšetkým pri tandemovom zapojení niekoľkých detektorov, kedy je potrebné zabezpečiť kompatibilitu mobilnej fázy pre všetky z nich [105].

Práve komplexnosť vzoriek zvyšuje riziko koelúcie častí matrice s cieľovými analytmi, čím dochádza ku interferencii s ich signálom počas detekcie [106]. Matrica vzorky ovplyvňuje signál analytu, čo sa zvyčajne prejavuje na nadhodnocovaní prípadne podhodnocovaní jeho obsahu, zhoršenej linearite, opakovateľnosti a presnosti metódy. Problematika matricových efektov je spájaná predovšetkým s MS detekciou [107, 108], avšak mnohokrát bola popísaná aj v spojení s UV detektorom prípadne detektorom diódového poľa (diode array detector, DAD) [109–111].

Ďalšie kapitoly sa podrobnejšie venujú vybraným typom detekcie, a to spektrofotometrickej a fluorescenčnej detekcii (FLD), detekcii na báze aerosólu, elektrochemickej a MS detekcii. Všetky menované detekcie boli počas doktorandského štúdia testované za účelom stanovenia fenolických látok a SG. V rámci štúdia sme sa podrobnejšie venovali porovnaniu vhodnosti DAD a detektoru nabitého aerosólu (CAD) za účelom kvantifikácie vybraných fenolických analytov. Súčasne bola identita analytov potvrdená pomocou MS detekcie a pre detailnejšiu charakterizáciu vzoriek bola práca

doplnená aj o coulometrickú detekciu (CD), ktorá popisovala antioxidačnú aktivitu vzoriek. Ďalej, práca zameraná na kvantifikáciu SG taktiež využívala CAD detekciu, nakoľko tieto typy analytov neobsahujú dostatočne silné chromofóry v štruktúre molekúl. Nakoľko sa schopnosťou fluorescencie vyznačuje len limitované množstvo analytov, ktoré boli predmetom štúdie, FLD nie je zahrnutá v žiadnej z publikovaných prác. Avšak, pre ucelenie predstavy o možnostiach využitia detekčných systémov, bola dizertačná práca doplnená aj o kapitolu popisujúcu FLD.

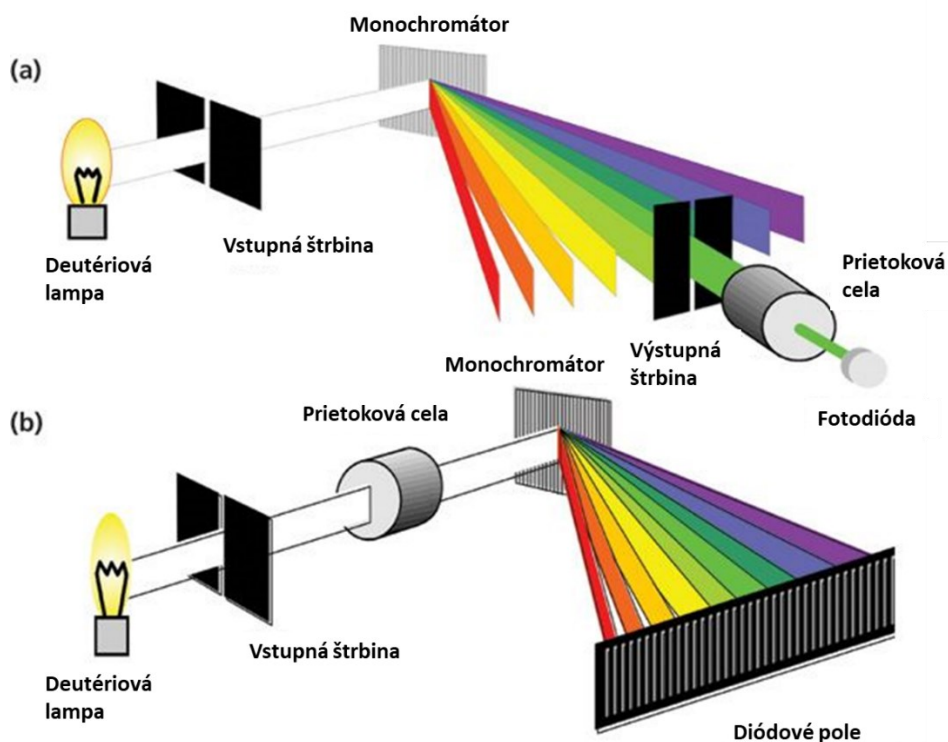
2.3.1. Spektrofotometrická detekcia

Absorpcia svetla v ultrafialovej a viditeľnej oblasti žiarenia (UV-Vis) (180 – 800 nm) je typická pre veľké množstvo molekúl vrátane organických, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú systém konjugovaných dvojitych väzieb. Oblasť molekuly, ktorá je zodpovedná za schopnosť absorpcie svetla sa nazýva chromofór. V prípade transparentných molekúl bez chromofórov, je možné podrobiť molekulu derivatizačnej reakcii, kedy získava schopnosť absorpcie žiarenia. V niektorých prípadoch slúžia derivatizačné reakcie aj na zvýšenie citlivosti a selektivity stanovenia. Väčšina fenolických látok absorbuje svetlo v rozmedzí vlnových dĺžok 200 – 550 nm. V prípade analytov absorbujúcich na nižších vlnových dĺžkach je dôležité zvoliť správne zloženie MF vzhľadom na „cut-off“ hodnotu organických rozpúšťadiel, ktoré absorbujú žiarenie nízkych vlnových dĺžok. V prípade nesprávnej voľby zloženia MF by v takom prípade dochádzalo ku zvýšeniu šumu nulovej línie a strate analytickej informácie [112].

Rozlišujeme spektrofotometrické detektory s fixnými vlnovými dĺžkami, nastaviteľnými vlnovými dĺžkami a DAD detektory. Detektory s fixnou a nastaviteľnou vlnovou dĺžkou sú v porovnaní s DAD lacnejšie a disponujú vyššou citlivosťou, pretože zaznamenávajú žiarenia len o špecifickej vlnovej dĺžke. Zároveň, obmedzené možnosti sledovania len niekoľkých vybraných vlnových dĺžok u detektorov s fixnou prípadne nastaviteľnou vlnovou dĺžkou sú značne limitujúce pre stanovenie širšieho spektra analytov v komplexných vzorkách [113].

Použitie DAD detekcie na stanovenie fenolických látok je veľmi rozšírené, nakoľko umožňuje zaznamenávanie absorpcie žiarenia celého UV-Vis spektra v reálnom čase a bez prerušenia chromatografickej separácie [114–116]. Ako zdroj žiarenia využíva DAD deutériovú (UV oblasť) a wolfrámovú (Vis oblasť) lampu, ktorých žiarenie prechádza postupne cez štrbinu, šošovku, clonu a prietokovú celu detektora, za ktorou sa pomocou holografickej mriežky rozkladá na jednotlivé vlnové dĺžky zoslabené o mieru absorpcie v prietokovej cele. Každá dióda diódového poľa je spojená s kondenzátorom nabitým na určitú hodnotu. Pri dopade žiarenia na diódu vzniká fotoelektrický prúd a dochádza k vybíjaniu kondenzátora. Následne dochádza ku opätovnému nabitíu kondenzátora, pričom prúd potrebný na jeho nabitie sa meria a informácia sa ukladá do pamäti riadiacej jednotky zariadenia. Sekvencie nabíjania a vybíjania kondenzátora sa rýchle opakuje. Počet diód sa pohybuje

v rozsahu 512 – 1024, čo určuje spektrálne rozlíšenie detektora [117, 118]. Schéma UV-Vis a DAD detektora je znázornená na Obrázku č. 9. Pri zázname absorpcie žiarenia v celom UV-Vis spektre dochádza ku vzniku 3D záznamu, pomocou ktorého je možné vyhodnocovať čistotu pík, prípadné koelúcie a tiež je možné vytvárať spektrálne knižnice. V prípade vytvárania spektrálnych knižníc je dôležité, aby analýzy prebiehali vždy za rovnakých chromatografických podmienok, pretože zloženie MF môže ovplyvňovať analytický signál [119].



Obrázok 9: Schéma optického systému UV-Vis detektora (a) a DAD (b). Prevzaté z [118].

Medzi hlavné výhody DAD patrí nedeštruktívnosť, spoľahlivosť, jednoduchá obsluha, vysoká presnosť stanovenia, široký lineárny dynamický rozsah, možnosť identifikácie pík a vyhodnocovanie ich čistoty. Zvýšenie selektivity detekcie je dosiahnuté nastavením vlnovej dĺžky absorpčného maxima (λ_{max}). Medzi nevýhody patrí požiadavka na optickú transparentnosť MF a premenlivá odozva detektora v závislosti od typu analytu a jeho molárneho absorpčného koeficientu. Nevýhodou je tiež podobnosť spektier niektorých príbuzných látok, kedy je spoľahlivosť funkcie vyhodnotenia čistoty píku prípadne identifikácie pomocou spektrálnej knižnice omnoho nižšia než v porovnaní s MS. Bez použitia derivatizácie je zásadnou limitáciou neprítomnosť chromóforov v štruktúre molekúl [118].

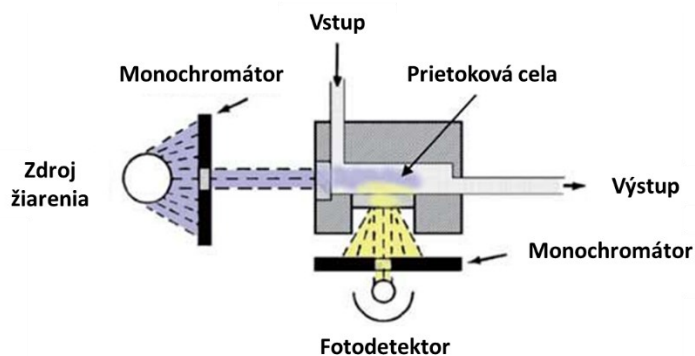
V spojení s chromatografickou separáciou sa DAD využíva ako samostatná detekčná metóda, prípadne v tandemovom zapojení s detekčnou metódou založenou na inom princípe. Typické sú kombinácie DAD s elektrochemickými [75, 120], fluorescenčnými [121], a MS detektormi [122, 123].

2.3.2. Fluorescenčná detekcia

FLD je jednou z najcitlivejších optických detekčných techník používaných v spojení s kvapalinovou chromatografiou. Fluorescencia molekúl môže byť prirodzená alebo môže byť výsledkom derivatizačných reakcií, kedy dochádza ku štruktúrnej modifikácii cieľových molekúl, prípadne k pridaniu fluorescenčnej značky. Z prírodných látok sa prirodzenou schopnosťou fluorescencie vyznačuje len relatívne malé množstvo molekúl. Z pomedzi fenolických látok majú schopnosť fluorescencie napríklad niektoré fenolické kyseliny vrátane kyseliny gallovej, taktiež flavanoly a prokyanidíny (vrátane epikatechinu a katechinu), dihydrochalkony, flavonoly a antokyány. Na rozdiel od spektrofotometrickej detekcie je derivatizácia molekúl za účelom fluorescencie omnoho bežnejšia a podľa miesta derivatizácie ju rozdeľujeme na pre-kolónovú alebo post-kolónovú. Funkciu derivatizácie je okrem získania molekúl so schopnosťou fluorescencie aj zvýšenie citlivosti a selektivity stanovenia [124–126].

Pri fluorescencii dochádza ku molekulárnej absorpcii fotónu a následnej emisii fotónu s nižšou energiou. Absorpcia fotónu je sprevádzaná excitáciou elektrónov a pri ich následnom návrate na základnú energetickú hladinu dochádza ku emisii žiarenia s nižšou energiou a vyššou vlnovou dĺžkou. Selektivita FLD spočíva predovšetkým v tom, že excitačná aj emisná vlnová dĺžka sú pre danú molekulu špecifické. Práve táto vlastnosť umožňuje v niektorých prípadoch detekciu molekuly aj v prítomnosti interferujúcich látok, čo by v prípade UV-Vis/DAD nebolo možné [113, 124].

Ako zdroj primárneho excitačného žiarenia v UV-Vis oblasti sa využíva xenónová výbojka. Následne sa sekundárne emisné žiarenie vznikajúce v cele detektora zachytáva fotonásobičom, ktorý je umiestnený kolmo na zdroj excitačného žiarenia, čím sa eliminuje možnosť interferencií z primárneho žiarenia. Konštrukcia prietokovej cely FLD je v porovnaní s UV celou menej robustná a preto je potrebné dodržiavať tlakové limity stanovené výrobcom, zvyčajne 3 – 35 bar. Výber požadovanej excitačnej a emisnej vlnovej dĺžky prebieha pomocou dvoch monochromátorov. Difrakčná mriežka excitačného monochromátora sa otáča tak, aby žiarenie požadovanej vlnovej dĺžky prechádzalo cez detekčnú celu FLD. Podobným spôsobom dochádza ku natočeniu difrakčnej mriežky emisného monochromátora, ktorý umožňuje smerovanie emisného žiarenia požadovanej vlnovej dĺžky na fotonásobič (Obrázok 10). Oba monochromátory je možné použiť aj v režime skenovania, čo sa využíva predovšetkým pri vývoji metódy, kedy je potrebné nájsť maximá excitačných a emisných spektier analytov [124, 125].



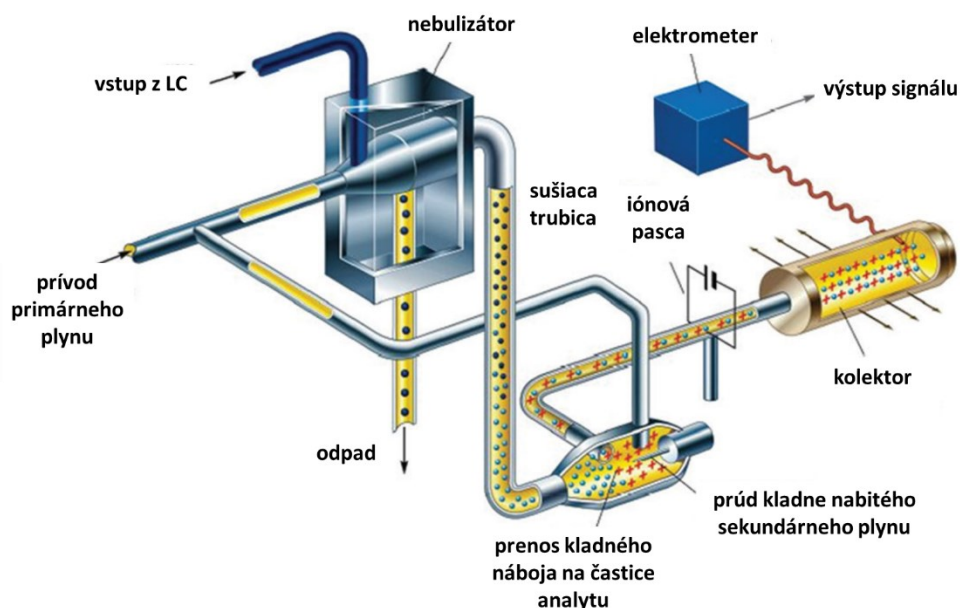
Obrázok 10: Schéma fluorescenčného detektora. Prevzaté z [124].

Fluorescencia analytov môže byť ovplyvnená molekulárnou štruktúrou analytu a tiež chromatografickými podmienkami. K zhášaniu fluorescence dochádza napríklad vplyvom nedostatočne odplynenej MF s vyšším obsahom kyslíka, pri použití vyšších separačných teplôt a taktiež v prípade vyššej koncentrácie analytu, kedy je riešením riedenie vzorky [124].

Pre chromatografickú analýzu fenolických látok je tandemové zapojenie UV-Vis/DAD a FLD výhodné. UV-Vis/DAD sa vyznačuje svojou univerzálnosťou a umožňuje kvantifikáciu a vyhodnotenie čistoty pík. Navyše, selektívny FLD sa využíva na identifikáciu pík a kvantifikáciu aj málo koncentrovaných analytov so schopnosťou fluorescence. Kombinácia spektrofotometrickej a FLD bola použitá napríklad na stanovenie fenolických látok vo víne [121, 127, 128].

2.3.3. Univerzálna detekcia na báze aerosólu

Univerzálne detektory na báze aerosólu, medzi ktoré radíme CAD, predstavujú alternatívu ku spektrofotometrickým detektorom. Umožňujú totiž kvantifikáciu analytov bez chromofórov prípadne slabo absorbujúcich analytov a tiež kvantifikáciu analytov, ktorých štandardy nie sú dostupné. Medzi hlavné výhody CAD patrí univerzálnosť detekcie neprchavých analytov, nezávislosť signálu detekcie od fyzikálno-chemických vlastností látky, široký dynamický rozsah, citlivosť a presnosť stanovenia, a jednoduchosť obsluhy. Pretože je princíp CAD založený na tvorbe aerosólu je jeho hlavnou nevýhodou vplyv zloženia MF na signál detektora. Záznam signálu detektora taktiež neobsahuje žiadne spektrálne informácie o analytoch a preto nie je možné vykonávať identifikáciu ani vyhodnocovať čistotu pík, tak ako pri zapojení DAD a MS [129–131].



Obrázok 11: Schéma princípu CAD. Prevzaté z [132].

Princíp detekcie CAD je znázornený na Obrázku 11, kedy dochádza ku nebulizácii eluentu z kolóny pomocou prúdu dusíka. Vzniknutý aerosól je ďalej transportovaný cez driftovaciu trubicu, kde dochádza k odpareniu prchavej MF a iných prchavých zložiek eluentu. V ďalšom kroku dochádza znova k prívodu dusíka, ktorého molekuly sú po kontakte s elektródou kladne nabité (tzv. koronový výboj) a predávajú svoj náboj molekulám aerosólu. Kladne nabité molekuly aerosólu následne prechádzajú cez negatívne nabité elektrické pole do kolektora, kde predávajú svoj náboj za vzniku prúdu, ktorého intenzitu meria citlivý elektrometer. Obsluha CAD je jednoduchá, z parametrov je možné optimalizovať tlak vstupného plynu, teplotu a rozsah výstupného signálu [133, 134].

Odpoveď CAD je hmotnostne závislá, preto je veľkosť signálu priamo úmerná množstvu analytu a nie je ovplyvnená jeho spektrálnymi ani fyzikálno-chemickými vlastnosťami. Nevýhodou je vplyv zloženia MF na odozvu detektora. Problematické je používanie neprchavých aditív MF, respektíve prítomnosť rôznych nečistôt. Tiež zmenou hustoty a viskozity MF dochádza k ovplyvneniu priemeru vznikajúcich častíc a teda ich hmotnosti. Pri použití gradientovej elúcie je tak veľkosť signálu ovplyvnená aktuálnym zložením MF. Napríklad, vyšší obsah organických rozpúšťadiel zvyšuje efektivitu nebulizácie, čím dochádza ku vzniku väčšieho množstva častíc, ktoré následne v detektore predávajú náboj a poskytujú tak vyššiu odozvu detektora. Avšak, použitie inverzného gradientu predstavuje spôsob ako eliminovať vplyv zloženia MF pri použití gradientovej elúcie. V takomto prípade sa privádza sekundárny prúd MF s inverzným gradientom pomocou druhej pumpy do eluentu z kolóny, čím sa

zabezpečí konštantné zloženie MF na vstupe do detektora a odozva detektora tak nie je ovplyvnená [133, 134].

Z dôvodu univerzálnosti detekcie môže byť kvantifikácia analytov v komplexných vzorkách náročná. Problematická je predovšetkým koelúcie analytov a ďalších komponentov matrice. Pre zvýšenie selektivity detekcie je často nevyhnutné používať dlhé separačné časy [75, 120, 122]. CAD je možné využívať aj na kvantifikáciu neprchavých rastlinných analytov vrátane fenolických látok. V publikáciách sa CAD častokrát vyskytuje v tandemovom zapojení s DAD, elektrochemickou detekciou (ECD), prípadne MS detekciou [120, 122, 135].

2.3.4. Elektrochemická detekcia

Elektrochemická detekcia (ECD) v podobe ampérometrickej, voltametrickej, CD, potenciometrickej a konduktometrickej detekcie sa využíva k analýze potravín, environmentálnych, farmaceutických a biologických vzoriek. Predpokladom pre použitie ECD je prítomnosť elektroaktívnych skupín v štruktúre molekúl, čo v prípade prírodných látok spĺňa väčšina molekúl. Elektrochemické metódy sa dajú charakterizovať ako lacné, citlivé a selektívne spôsoby detekcie. Pri stanovení sa môžu sledovať ako oxidačné (napr. fenoly, aromatické molekuly, amíny, tioly, chinolíny), tak aj redukčné vlastnosti analytov (napr. estery, ketóny, aldehydy, étery, chinóny) [113, 136, 137].

Pri ampérometrickej detekcii sa meria prúd vznikajúci prechodom redukovanej alebo oxidovanej formy látky prietokovou celou detektoru a pri CD sa meria náboj potrebný na oxidáciu alebo redukciu celého množstva látky pri jej prechode mernou celou. Na rozdiel od spektrofotometrickej a FLD detekcie dochádza pri prechode analytu elektrochemickým detektorom ku zmenám vzorky – oxidácii prípadne redukcii. ECD zvyčajne obsahuje tri typy elektród – pracovnú, pomocnú a referenčnú. Práve veľkosť povrchu elektród je dôležitým parametrom, ktorý zásadne ovplyvňuje citlivosť stanovenia. Pri elektródach s malým povrchom dochádza k elektrochemickej premene len u približne 3-10 % analytu, zatiaľ čo pri elektródach s veľkým povrchom dochádza ku takmer úplnej elektrochemickej premene analytu prechádzajúceho detektorom. U malých elektród, zvyčajne využívaných pri ampérometrickej detekcii dochádza k ich pasivácii, kedy sa ich povrch pokrýva elektrodepozitmi, čo má zásadný vplyv na ich citlivosť. Naopak, elektródy CD sú charakterizované veľkým povrchom, ktorý umožňuje elektrochemickú premenu 100 % elektroaktívneho analytu. CD často využívajú elektródy fritového typu vyrobené z porézneho grafitu [138].

Vzhľadom na elektroaktivitu antioxidantov, je práve spojenie LC s ECD vhodné na určenie ich antioxidačných vlastností a kvantifikáciu. K stanoveniu antioxidantov s redukčnými vlastnosťami pri ktorých dochádza k donácii elektrónov sa využíva predovšetkým CD [113, 136, 137]. Okrem pracovnej

elektrody z porézneho grafitu sa v systéme nachádza aj referenčná elektróda z paládia a pomocná platinová elektróda. CD taktiež umožňuje zapojenie série elektród (4 – 16), ktoré sa líšia intenzitou vloženého napätia. Pri takomto zapojení dochádza k prednostnej elektrolýze analytov na elektróde s napätím, ktoré odpovedá ich polvlnovému potenciálu. Takýmto spôsobom môžu byť odlišené aj neseparované látky v prípade, že ich polvlnový potenciál sa líši aspoň o 60 mV. Pre komplexnú charakterizáciu antioxidantov sa často využíva zapojenie CD v tandeme s DAD/UV-Vis, prípadne iným typom detektora [75, 120, 139–141]. Pri takomto type zapojenia sa okrem kvantity vybraných analytov sledujú aj ich antioxidačné vlastnosti. Platí pri tom, že oxidácia silných antioxidantov prebieha už na elektróde s nižším potenciálom. Naopak, k elektrochemickej premene slabých antioxidantov dochádza až pri vyšších hodnotách potenciálu [113, 138].

2.3.5. Hmotnostne spektrometrická detekcia

Za najväčší prielom v analýze prírodných látok sa dá považovať spojenie LC-MS. Napriek počiatočnej nevýhode vysokých obstarávacích nákladov má MS niekoľko zásadných výhod. Patrí medzi ne vysoká citlivosť detekcie a selektivita stanovenia aj v komplexných biologických, rastlinných, prípadne environmentálnych vzorkách. MS taktiež poskytuje dôležité informácie o štruktúre molekúl ako je molekulárna hmotnosť, molekulárny vzorec a štruktúrne špecifické fragmenty [113, 142].

Obľúbenosť MS vzrástla aj vďaka metódam ionizácie za atmosférického tlaku (API) ako napríklad ionizácia elektrosprejom (ESI) a chemická ionizácia za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizácia za atmosférického tlaku (APPI). Ako vyplýva z názvu, ionizačné techniky ESI aj APCI prebiehajú za atmosférického tlaku a ďalším pôsobením tepla a vysokého napätia dochádza ku ionizácii molekúl za vzniku iónov, ktoré sú následne smerované do hmotnostného analyzátoru MS. Pri ESI prebieha nebulizácia eluentu z kolóny použitím vysokého napätia (3 – 5 kV). Vniknuté kvapôčky eluentu sú smerované k vstupu do analyzátoru pričom dochádza k ich postupnému zmenšovaniu až do chvíle, kedy dochádza k uvoľneniu samotného iónu, ktorý následne vstupuje do MS. Pri ionizácii APCI sa na odparenie eluentu z kolóny využíva teplo. Molekuly rozpúšťadla sú následne ionizované koronovým výbojom a mechanizmom chemickej ionizácie dochádza aj k ionizácii samotných analytov. Podobne ako pri APCI, aj pri APPI prebieha odparenie eluentu z kolóny teplom, avšak ionizácia je zabezpečená UV lampou, ktorá emituje fotóny. Emitované fotóny ionizujú najprv molekuly mobilnej fázy, prípadne dopantu a ionizačnými mechanizmami vrátane prenosu náboja alebo protónu dochádza nakoniec k ionizácii samotného analytu [143].

ESI, APPI aj APCI patria medzi mäkké ionizačné techniky, ktoré sa používajú v pozitívnom a negatívnom ionizačnom móde za vzniku molekulárnych iónov v protonovanej $[M + H]^+$ alebo deprotonovanej $[M - H]^-$ podobe, prípadne vo forme adduktov v závislosti od zloženia MF a jej aditív.

Základným pravidlom je, že kyslé molekuly (karboxylové kyseliny, fenolické látky) produkujú v negatívnom móde hlavne $[M - H]^-$ a bázické (alkaloidy, amíny) v pozitívnom móde $[M + H]^+$. Ďalšie zložky prírodných látok, ako sú napríklad glykozidy majú afinitu k soliam a často produkujú napríklad sodné addukty. Následnú fragmentáciu molekúl alebo čiastočnú deklasterizáciu adduktov je možné vyvolať kolízne indukovanou disociáciou v zdroji API alebo pomocou tandemových MS experimentov [144].

Okrem mäkkých ionizačných techník sa k ionizácii využívajú aj takzvané tvrdé ionizačné techniky, ako elektrónová ionizácia a chemická ionizácia. Pri elektrónovej ionizácii získava molekula nadbytok vnútornej energie, čo sa prejaví jej fragmentáciou. Fragmentácia prebieha pomocou elektrónov, ktoré emituje žhavená katóda. Emitované elektróny prechádzajú cez iónový zdroj a následne sa zachytávajú na anóde. Priblížením emitovaného elektrónu ku valenčným elektrónom molekuly dochádza k uvoľneniu valenčného elektrónu a z molekuly sa stáva radikál katiónu. V prípade, že pri ionizácii získa molekula prebytok vnútornej energie, dochádza k jej fragmentácii. Nevýhodou pri elektrónovej ionizácii je častokrát chýbajúci molekulárny ión. Štandardne sa využíva urýchľujúca energia elektrónov o veľkosti 70 eV. Je to z dôvodu, že dochádza ku vzniku konzistentných fragmentov, ktoré sa následne môžu vyhľadávať v knižnici hmotnostných spektier na objasnenie štruktúry molekúl. Elektrónová ionizácia sa však bežne využíva v spojení s plynovou chromatografiou [145].

V spojení s LC sa využívajú rôzne typy MS detektorov. Spomedzi analyzátorov s nízkym rozlíšením sa často využívajú jednoduché kvadrupólové analyzátory (Q). Z analyzátorov, ktoré poskytujú vysoké rozlíšenie a informácie o štruktúre molekuly sa využíva napríklad analyzátor doby letu (TOF). Pre citlivé stanovenie alebo špecifickú detekciu konkrétneho štruktúrneho fragmentu sa využívajú trojité kvadrupólové analyzátory (QqQ) v režime selektívneho záznamu jedného prípadne viacerých iónov (MRM), čo je špecifické predovšetkým pre kvantifikáciu analytov v komplexných maticiach [146]. Pre presné objasnenie štruktúry látok sa zase využíva tandemová MS (MS^n), kam radíme napríklad analyzátor typu iónovej pasce [142, 143].

Pre účely kvantitatívnej analýzy sa veľmi často používajú analyzátory typu Q a QqQ, prípadne TOF [146]. Z hľadiska voľby ionizačnej techniky, je dôležité prispôsobiť výber polarite iónu a zloženi eluentu tak, aby bola dosiahnutá požadovaná citlivosť. APCI je vhodnejšie na ionizáciu nepolárnych molekúl a ESI na šetrnú ionizáciu polárnych molekúl, avšak je náchylnejšie k vzniku maticových efektov [147].

Práve maticové efekty sú v spojitosti s MS detekciou veľmi diskutované. Prítomnosť matrice vzorky a jej koelúcia s cieľovými analytmi môže ovplyvňovať výsledný signál analytu v detektore. Konkrétne, matrica vzorky ovplyvňuje signál analytov, čo sa prejavuje ako podhodnocovanie prípadne

nadhodnocovanie ich obsahu a vedie k analytickej nepresnosti a zhoršenej reprodukovateľnosti a linearite metódy. Prítomnosť matricových efektov môže byť vyhodnotená porovnaním kalibračnej krivky štandardov s a bez prídavku matrice [106, 107]. Na zníženie vplyvu matricových efektov bolo vyvinutých niekoľko stratégií vrátane extenzívneho prečistenia vzoriek od zložiek matrice [148, 149], efektívnej chromatografickej separácie [107, 150], sledovania čistoty píku [127] a riedenia vzoriek [151]. Veľmi často sa však využívajú izotopicky značené štandardy. Nevýhodou je ich obmedzená dostupnosť a taktiež vysoká cena [108, 152].

Spojenie LC s MS detekciou je v súčasnosti kľúčová metóda pre identifikáciu prírodných látok. Okrem samotnej detekcie prináša MS aj informácie o štruktúre analytu v podobe určenia empirického vzorca. Následne použitím tandemových MS experimentov prípadne hybridných analyzátorov poskytuje prostredníctvom fragmentácie podrobné informácie o štruktúre [143, 153].

Napríklad štúdia zaoberajúca sa kvalitatívnou analýzou fenolických látok vo výliskoch z jablák používala spojenie LC s MSⁿ detekciou. Ionizácia prebiehala použitím ESI v negatívnom ionizačnom móde a analýza iónov v QqQ. Takýmto spôsobom bolo identifikovaných až 60 analytov [154].

3. KOMENTÁRE K PUBLIKOVANÝM PRÁCAM ZAHRNUTÝM V DIZERTAČNEJ PRÁCI

3.1. Benefits and Pitfalls of HPLC Coupled to Diode-Array, Charged Aerosol, and Coulometric Detections: Effect of Detection on Screening of Bioactive Compounds in Apples (príloha č. 1)

Cieľom práce bolo vyvinúť rýchlu skriningovú chromatografickú metódu pre kvantifikáciu hlavných fenolických látok prítomných v jablčných vzorkách s využitím jednoduchej spektrálnej a elektrochemickej detekcie. Napriek tomu, že DAD sa veľmi často využíva na analýzu komplexných vzoriek, v čase prípravy metódy, chýbalo v dostupnej literatúre porovnanie DAD s inými typmi detekcie, ako napríklad CAD, ktoré by porovnávalo ich schopnosti a rozlíšenie v prítomnosti interferujúcich zložiek. Práca preto porovnáva DAD a CAD detekciu z pohľadu ich vhodnosti pre identifikáciu a kvantifikáciu látok v komplexnej matici jablčných vzoriek s prítomnosťou ďalších interferujúcich zložiek. Navyše, v spojení s chromatografickou separáciou bola použitá aj CD detekcia, ktorá umožnila charakterizáciu vzoriek na základe ich antioxidantných vlastností [120, 139, 141]. Dodatočné potvrdenie identity analytov kvantifikovaných pomocou DAD a CAD bolo zabezpečené spojením LC-HRMS.

Vývoj analytickej metódy prebiehal s tandemovým zapojením detektorov DAD a CAD. Z pohľadu vývoja chromatografickej separácie bolo kritické dosiahnuť dostatočnú retenciu vysoko polárnej kyseliny gallovej a dostatočné rozlíšenie kyseliny chlorogenovej, ktorá sa vo vzorkách typicky nachádzala vo vysokých koncentráciách. Optimalizácia separačnej metódy nadväzovala na predchádzajúce skúsenosti so separáciou tohto spektra látok [155]. Optimálna retencia kyseliny gallovej a rozlíšenie kyseliny chlorogenovej boli dosiahnuté pri použití gradientovej elúcie a kolóny Luna Omega Polar C18 (150 x 4,6 mm) s plne poréznymi 5 µm časticami a modifikáciou pre separáciu polárnych látok. Celkový čas analýzy optimalizovanej HPLC – DAD – CAD metódy pre separáciu siedmych fenolických látok bol 12,5 minúty.

Validácia metód prebiehala podľa doporučení EMA, pričom sa sledovala linearita metód, medze detekcie a kvantifikácie, presnosť, správnosť a selektivita stanovenia [156]. Výsledky validácie poukázali na väčší lineárny rozsah DAD detekcie. Naopak, spodná hranica lineárneho rozsahu pre CAD bola 4-10 krát vyššia v porovnaní s DAD (Tabuľka č. 1).

Tabuľka 1: Porovnanie vybraných validačných parametrov testovaných detekčných techník DAD a CAD

DAD detekcia	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Kalibračný rozsah (µg/ml)	Regresná rovnica	R ² ^a
Kyselina gallová ^{280 nm}	0,03	0,10	0,10 - 20	0,2393x – 0,0132	0,9989
Kyselina chlorogenová ^{320 nm}	0,03	0,10	0,10 - 20	0,2547x – 0,0298	0,9983
Epikatechín ^{280 nm}	0,07	0,25	0,25 - 20	0,0876x – 0,0083	0,9985
Rutín ^{365 nm}	0,07	0,25	0,25 - 20	0,1584x – 0,0092	0,9990
Floridzin ^{280 nm}	0,03	0,10	0,10 - 20	0,2174x – 0,0100	0,9992
Kvercetin ^{365 nm}	0,03	0,10	0,10 - 20	0,3971x – 0,0820	0,9977
Floretin ^{280 nm}	0,03	0,10	0,10 - 20	0,3791x – 0,0162	0,9992
CAD detekcia					
Kyselina gallová	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0058x – 0,0024	0,9949
Kyselina chlorogenová	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0096x – 0,0031	0,9943
Epikatechín	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0163x – 0,0047	0,9973
Rutín	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0145x – 0,0017	0,9985
Floridzin	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0196x – 0,0019	0,9995
Kvercetin	0,30	1,00	1,00 - 20	0,0224x – 0,0116	0,9956
Floretin	0,15	0,50	0,50 - 20	0,0309x – 0,042	0,9996

^a R² koeficient determinácie

Štatistickým porovnaním výsledkov senzitivity bolo potvrdené, že rozdiely v senzitivite metód sú významné pre každý typ skúmaného analytu (Tabuľka 2).

Tabuľka 2: Štatistické porovnanie senzitivity DAD a CAD detekcie na základe smernice regresnej rovnice. Hladina významnosti $\alpha = 0,05$

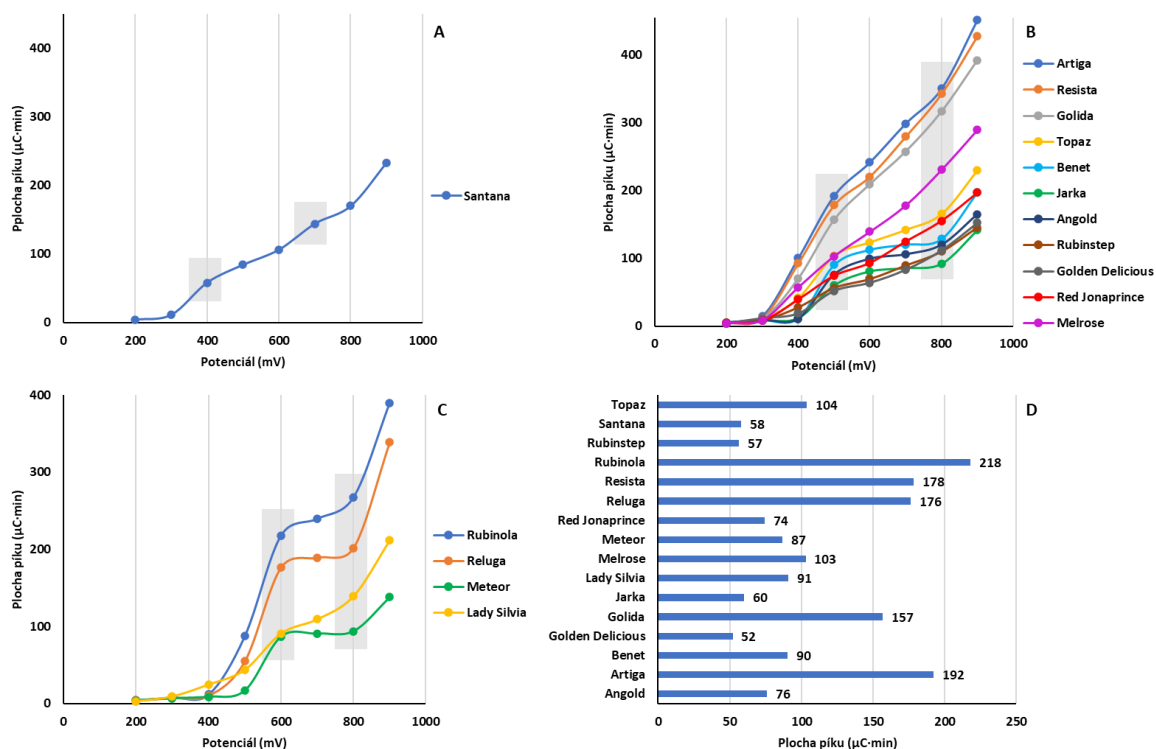
Analyt	p-hodnota testu
Kyselina gallová	7,24 x 10 ⁻⁶
Kyselina chlorogenová	2,67 x 10 ⁻⁶
Epikatechín	2,58 x 10 ⁻⁵
Rutín	6,12 x 10 ⁻⁶
Floridzin	1,45 x 10 ⁻⁷
Kvercetin	1,81 x 10 ⁻⁷
Floretin	3,05 x 10 ⁻⁷

Výsledky obsahu vybraných fenolických látok získané DAD a CAD detekciou boli porovnané, pričom sa brali do úvahy odporúčenia EMA, kedy sa priemerná presnosť výsledkov získaných cross-validovanými metódami sa môže líšiť o 15 až 20 % [156]. Takýmto porovnaním výsledkov bolo pozorované analyt-špecifické jednostranné nadhodnocovanie, prípadne podhodnocovanie výsledkov. Napríklad, pri použití CAD detekcie bolo pozorované nadhodnocovanie obsahu epikatechínu a rutínu, čo môže byť dôsledok absencie spektrálnej informácie z detektora, kedy nie je možné odhaliť koelúciu analytu a ďalších minoritných zložiek matrice. Výsledky z DAD poukazovali na vyššiu senzitivitu aj selektivitu stanovenia. Na rozdiel od CAD detekcie, DAD umožnila sledovaním vybraných vlnových dĺžok aj kvantifikáciu analytov, ktoré sa v niektorých kultivaroch nachádzali len v nízkych

koncentráciách. Najvýraznejšie rozdiely medzi DAD a CAD detekciou boli pozorované u analytov, ktorých koncentrácie sa nachádzali v blízkosti LOQ metód.

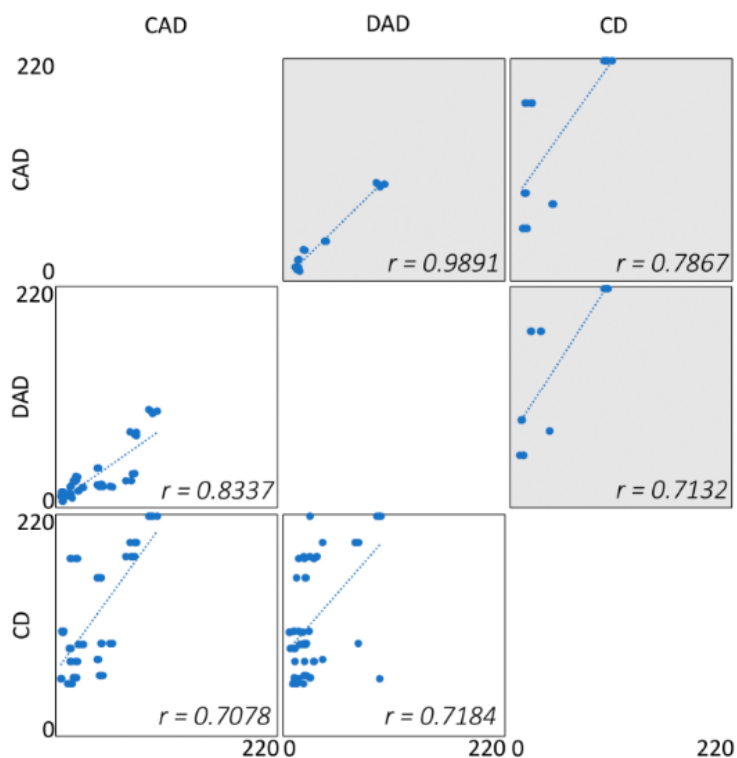
Celkovo, DAD detekcia umožnila kvantifikáciu analytov prítomných aj v nízkych koncentráciách. Použitie CAD vykazovalo v spojení s rýchlou skriningovou analýzou komplexnej matrice zníženú selektivitu a tiež citlivosť kvantifikácie. CAD detekcia bola náchylnejšia na vplyvy interferujúcich zložiek matrice, čo bolo zapríčinené kombináciou nedostatočného rozlíšenia komponentov matrice a nízkou selektivitou, ktorá zároveň vychádza z univerzálnosti CAD. Tieto faktory viedli k prekryvaniu signálov jednotlivých analytov s inými komponentami matrice a tým k nadhodnocovaniu ich obsahu. Podobné závery boli publikované v štúdiách, ktoré aplikovali CAD detekciu v kombinácii s dlhými separačnými časmi na kvantifikáciu analytov v komplexných matriaciach [120, 122, 157, 158]. Autori uvádzali, že aj napriek použitiu dlhých separačných časov bola kvantifikácia CAD detekciou, v porovnaní s inými technikami (UV, DAD, HRMS), ovplyvnená zložkami matrice, ktoré koeluovali s analytmi. Napríklad, štúdia vyživajúca DAD a CAD detekciu pre kvantifikáciu a HRMS na identifikáciu analytov v spojení so 125 minút dlhou chromatografickou separáciou, zaznamenala koelúciu analytov z extraktov *Ginkgo biloba* v píkoch CAD, čo bolo potvrdené pomocou HRMS [157].

Coulometrická detekcia v spojení s chromatografickou separáciou bola použitá ako doplnková metóda pre stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity vzoriek, bez nutnosti identifikácie jednotlivých analytov. Oxidácia analytov prebiehala na ôsmich elektródach s použitím potenciálu 200 až 900 mV. Na základe získaných výsledkov bolo možné pozorovať, že napriek komplexnému zloženiu vzoriek, sa oxidácia odohrávala prednostne na špecifických potenciáloch a v dvoch vlnách, ktoré boli označené ako inflexné body (inflection point, IP) (Obrázok 12). Spravidla, prvý IP bol pozorovaný ako oxidácia pri 200, 400, alebo 600 mV. Druhý IP predstavoval oxidačné deje prebiehajúce pri 700 alebo 800 mV. Prítomnosť dvoch IP indikovala, že oxidačný proces vzoriek je dvojstupňový, pričom ako prvé reagovali silné antioxidanty a až následne antioxidanty s nižšou antioxidačnou aktivitou (Obrázok 12). Pre porovnanie antioxidačnej aktivity jednotlivých kultivarov sa použil súčet plôch pod píkom prvého IP. Výsledky poukázali až na štvornásobné rozdiely v antioxidačnej aktivite testovaných odrôd.



Obrázok 12: Vyhodnotenie antioxidačnej aktivity s použitím CD. Sumy plôch pík na jednotlivých detekčných potenciáloch sú znázornené ako funkcia rastúceho detekčného potenciálu, čo vytvára hydrodynamický voltamogram. Vzorky sú rozdelené do jednotlivých grafov podľa hodnoty potenciálu na ktorom je pozorovaný prvý IP – 400 (A), 500 (B), 600 mV (C). Porovnanie vzoriek na základe celkovej plochy pík ktoré patria do prvého elektrónového transferu (IP 1) (D).

Pre celkové porovnanie výsledkov získaných DAD, CAD a CD detekciou bol použitý t-test a Pearsonov test (Obrázok 13). Výsledné hodnoty korelačných koeficientov potvrdzovali koreláciu výsledkov DAD – CAD, avšak korelácie metód DAD – CD a CAD – CD sa nepotvrdila. Vysvetlením môže byť práve fakt, že signál z CD detekcie bol ovplyvnený dvomi typmi vlastností – koncentráciou analytov a zároveň ich antioxidačnými schopnosťami. To znamená, že rozdielne látky s tou istou koncentráciou sa môžu výrazne líšiť intenzitou signálu CD detekcie. Naopak, pri použití DAD a CAD detekcie je intenzita signálu ovplyvňovaná len koncentráciou látky. Avšak, výnimkou bolo päť odrôd, ktoré splnili podmienky t-testu pre podobnosť výsledkov celkových kvantifikovaných fenolických látok a antioxidačnej aktivity (Obrázok 13).



Obrázok 13: Znáznorenie Pearsonovej korelácie medzi detektormi pre všetky hodnotené odrody (62 bodov, biele pozadie) a pre vybrané hodnotené odrody, ktoré splnili podmienky t-testu pre podobnosť výsledkov celkových kvantifikovaných fenolických látok a antioxidačnej aktivity (18 bodov, sivé pozadie).

Získané výsledky potvrdili, že pre analýzu komplexných vzoriek je použitie spektrálnej DAD detekcie výhodnejšie, nakoľko disponuje vyššou selektivitou a tiež citlivosťou stanovenia v porovnaní s CAD. Zároveň, kombinácia detekčných techník DAD a CD môže predstavovať ďalšie výhody, kedy okrem charakterizovania jednotlivých zložiek zmesi prináša aj cenné informácie o ich antioxidačných vlastnostiach, ktoré nie vždy korelujú s ich koncentráciou vo vzorkách.

V porovnaní s inými podobnými publikáciami zameranými na charakterizovanie fenolických analytov v rastlinných extraktoch pomocou DAD, táto práca prináša dodatočnú informáciu o biologickej hodnote vzoriek prostredníctvom hodnotenia ich antioxidačnej aktivity pomocou CD [114–116, 159]. Z pohľadu citlivosti validovanej metódy, boli napríklad dosiahnuté nižšie LOD a LOQ pre CAD detekciu. Konkrétne, LOD kyseliny chlorogenovej bolo až 20x nižšie a LOD pre rutín, floridzín a kvercetín 4 – 10x nižšie v porovnaní so štúdiou zameranou na kvantifikáciu fenolických látok v jablčných vzorkách s využitím CAD detekcie [120]. Taktiež z pohľadu chromatografickej separácie došlo k výraznému skráteniu doby analýzy na 12,5 minúty v porovnaní s podobnými prácami, kedy doba analýzy dosahovala viac ako 50 minút pri použití kolón s dĺžkou 150 – 250 mm a veľkosťou častíc 2,7 – 5 μm [114, 116, 120].

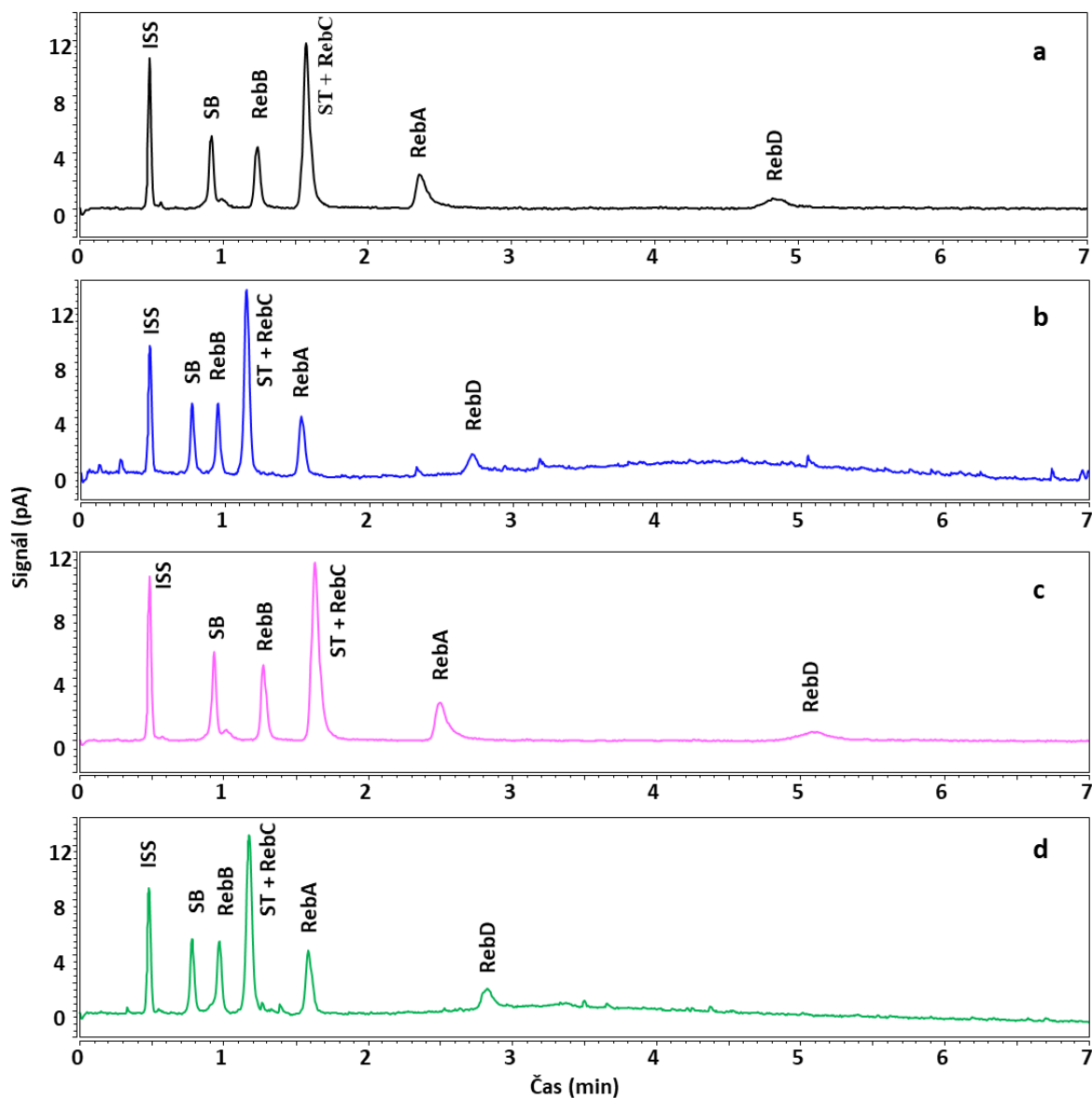
3.2. UHPLC coupled with charged aerosol detector for rapid separation of steviol glycosides in commercial sweeteners and extract of Stevia rebaudiana (príloha č. 2)

Práca bola zameraná na vývoj rýchlej separačnej metódy s využitím detektoru nabitého aerosólu ako univerzálneho typu detekcie pre kvantifikáciu hlavných SG v komerčných sladidlách a rastlinných extraktoch. Náročnosť vývoja separačnej metódy pre SG spočíva v ich vysokej polarite, vzájomnej štruktúrnej podobnosti a neprítomnosti silných chromofórov, čo napríklad pri použití spektrofotometrickej detekcie znižuje citlivosť stanovenia [160, 161]. Najčastejšie sa v literatúre uvádzala separácia s použitím reverzných stacionárnych fáz, ktorá je však charakterizovaná zníženou retenčnou schopnosťou a nízkym rozlíšením [161–167]. Menej často bolo v publikáciách uvádzané použitie módu hydrofilnej interakčnej chromatografie (HILIC), ktorá sa typicky využíva na separáciu malých silne polárnych molekúl [168–170].

V dobe realizácie štúdie existovalo len limitované množstvo prác, ktoré by využívali univerzálny typ detekcie na stanovenie SG. Niektoré metódy boli charakterizované pomerne vysokými hodnotami LOQ [164], prípadne popisovali rozširovanie píkov počas CAD detekcie v dôsledku nebulizácie [171]. Naopak, iné dokumentovali až päťnásobne vyššiu citlivosť stanovenia v porovnaní s UV detekciou [172].

Na základe fyzikálno-chemických vlastností analytov bolo vybraných päť chromatografických kolón, z toho štyri pre separáciu na reverzných fázach a jedna dedikovaná na HILIC. Dôraz sa kládol predovšetkým na dostatočné rozlíšenie Rebaudiosidu A (RebA) a stévioidu (ST), ktoré eluujú v blízkosti a sú prirodzene dominantnými SG v komerčných aj rastlinných vzorkách. Zároveň bolo potrebné vhodným nastavením podmienok zabrániť elúcii Rebaudiosidu D (RebD) v mŕtvom retenčnom čase. Optimalizovaná metóda bola validovaná podľa EMA doporučení [156] pre stanovenie šiestich SG v komerčných sladidlách aj v rastlinnom extrakte. Stanovené boli parametre ako linearita, limit detekcie a kvantifikácie, stabilita, presnosť, správnosť (vyjadrená ako výťažnosť metódy) a selektivita.

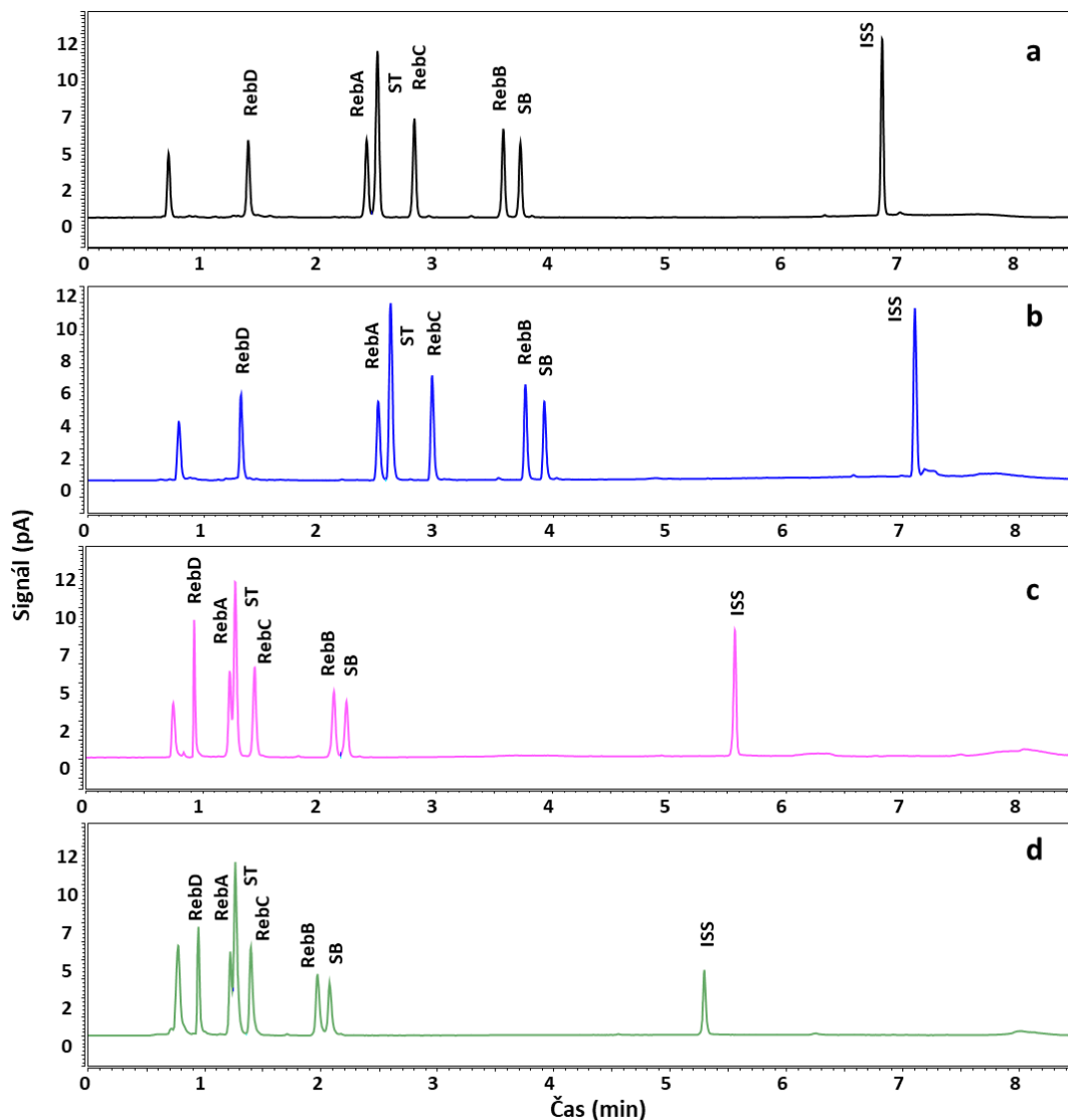
Pri vývoji separačnej metódy v HILIC móde bola vodná zložka mobilnej fázy tvorená z ultračistej vody prípadne rôznych koncentrácií prchavého pufru mravenčanu amónneho. Ako organická zložka bol použitý acetonitril. Testované boli izokratické aj gradientové metódy, rôzne koncentrácie pufru, pomery vodnej a organickej zložky mobilnej fázy a ich rýchlosť prietoku. Výsledné chromatografické záznamy boli charakterizované nízkou retenciou isosteviolu (ISS), nedostatočným rozlíšením RebC/ST a nízkym signálom RebD (Obrázok 14). Žiadny z testovaných faktorov nemal požadovaný efekt na separáciu a k rozdeleniu ST/RebC nedochádzalo.



Obrázok 14: Chromatografická separácia zmesného štandardu stéviových glykozidov s použitím izokratycznej elúcie. Podmienky: chromatografická kolóna Kinetex HILIC (100x2,1 mm; 2,6 μ m). Mobilná fáza: 92% (a, c) a 90% (b, d) acetonitril s 5 mmol/l (a, b) a 10 mmol/l (c, d) pufrum mravenčanu amonného, prietok mobilnej fázy 0,5 ml/min, teplota kolóny 30°C, objem nástreku 2 μ l.

Pre jednoduchšie porovnanie kolón s reverznými fázami bola ako prvá testovaná Luna Omega PS, na ktorej boli predoptimalizované jednotlivé parametre. Mobilná fáza bola zložená z vody s prídavkom kyseliny mravečnej a acetonitrilu. Už miernou optimalizáciou gradientovej metódy, prietoku, teploty a objemu nástreku dochádzalo ku separácii všetkých analytov vrátane kritického páru RebA a ST. Následne boli za rovnakých separačných podmienok otestované aj ďalšie kolóny s reverznou stacionárnou fázou. Na rozdiel of F5 kolón, Luna Omega Polar a Luna omega PS umožnili separáciu RebA/ST a poskytli vhodnú retenciu pre RebD (Obrázok 15). V porovnaní s HILIC módom

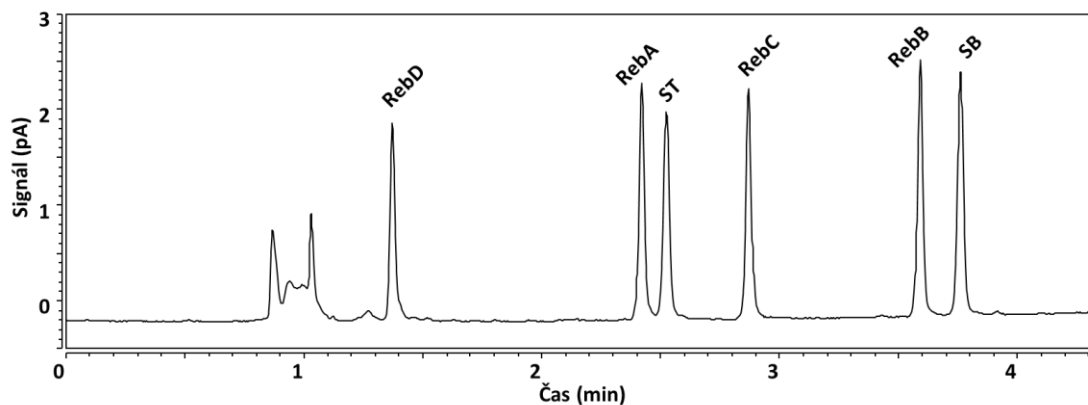
(Obrázok 14), reverzné fázy poskytovali výrazne užšie a symetrickejšie píky a teda aj lepšiu citlivosť stanovenia.



Obrázok 15: Chromatografická separácia zmesného štandardu stéviových glykozidov s použitím gradientovej elúcie a RP kolón. Podmienky: kolóna Luna Omega PS (a), Luna Omega Polar (b), Kinetex F5 s veľkosťou častíc 2,6 μm (c), Kinetex F5 s veľkosťou častíc 1,7 μm (d). Mobilná fáza: 0,1% (v/v) vodný roztok kyseliny mravenčej (A) a acetonitril (B), gradientová elúcia 35-50% B v A za 3 min, 50-80% B za 2 min, 80% B po dobu 1 min; 80-35% B za 0,5 min, 35% B po dobu 2 min, teplota kolóny 40°C, prietok mobilnej fázy 0,35 ml/min, objem nástreku 2 μl .

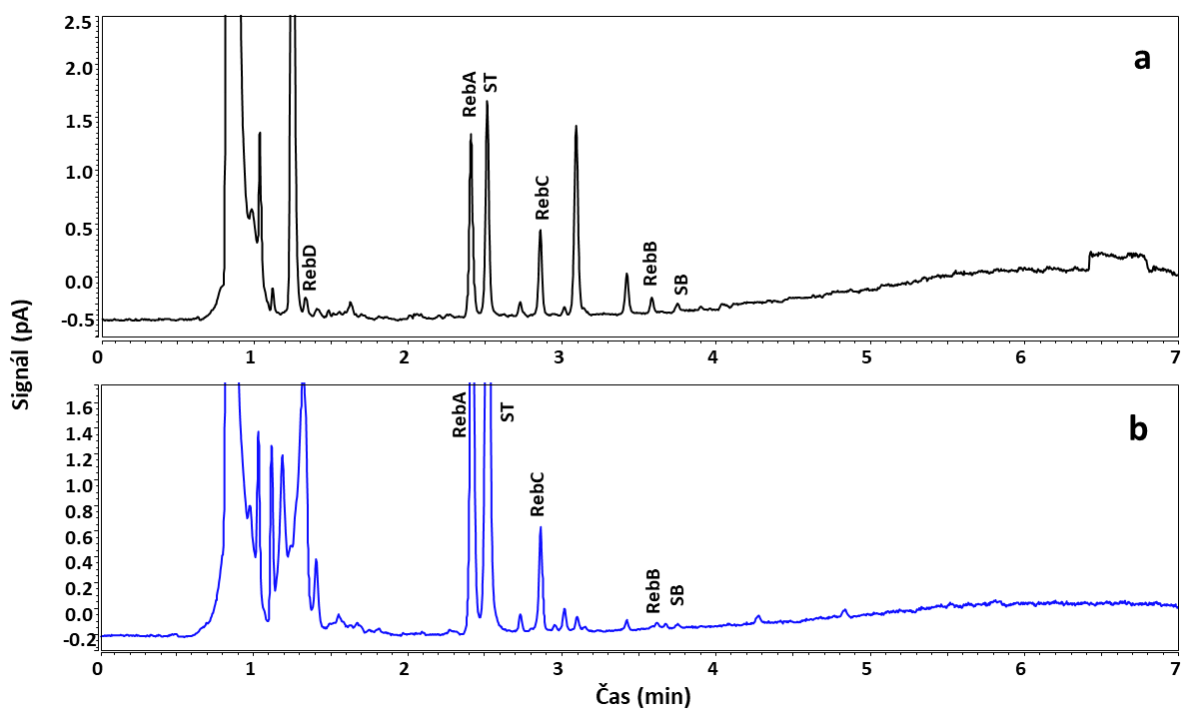
Z vyššie uvedených dôvodov pokračovala optimalizácia len v RP móde a na kolónach Luna Omega Polar a Luna Omega PS. Ďalšie kroky optimalizácie boli zamerané na zvýšenie rozlíšenia kritického páru RebA/ST a tiež Rebb a steviolbiosidu (SB), a urýchlenie elúcie posledne eluujúceho ISS. Testovala sa zmena gradientovej metódy a vplyv zvýšenia teploty separácie. Predoptimalizovaná metóda bola overená na separácii reálnych vzoriek. Nakoľko sa ISS v žiadnej zo vzoriek nevyskytoval,

jeho vyradením sa podarilo skrátiť čas separácie na 7 minút (Obrázok 16). V porovnaní s HILIC, bol vývoj metódy v móde RP jednoduchší a rýchlejší, k deleniu analytov dochádzalo už od prvých testovacích analýz.



Obrázok 16: Chromatografická separácia zmesného štandardu stéviových glykozidov s použitím optimalizovanej UHPLC-CAD metódy. Podmienky: kolóna Luna Omega Polar C18 (150x2,1 mm; 1,6 μ m). Gradientová elúcia s mobilnou fázou zloženou z vody (A) a scetonitrilu (B), priebeh gradientu: 35-55% B v A za 4 min, 55% B po dobu 1,5 min, 55-35% B za 0,2 min, 35% B po dobu 1,3 min, teplota kolóny 50°C, prietok mobilnej fázy 0,35 ml/min, objem nástreku 2 μ l.

Analýzou piatich komerčných a dvoch rastlinných vzoriek sa potvrdili výrazné rozdiely v zastúpení jednotlivých SG a teda aj v kvalite sladidiel. V komerčných sladidlách dominoval obsahom RebA a následne ST. V rastlinných extraktoch bol trend opačný, obsah ST bol až 3,5 krát vyšší, čo potvrdzuje aj literatúra [173]. Kvalita komerčných vzoriek bola posúdená vzhľadom na zloženie jednotlivých SG a súhlas s deklarovaným zložením na obale výrobku. Najkvalitnejším komerčným sladidlom bola vzorka č. 1. Celkový obsah kvantifikovaných SG bol až 26,95 mg/ml a obsah RebA bol v porovnaní so ST až 2,4 krát vyšší, čo priaznivo vplýva na sensorické vlastnosti výrobku. Zároveň, zistené rozdiely medzi deklarovaným obsahom SG a obsahom kvantifikovaným za pomoci validovanej metódy, boli v rámci presnosti a správnosti metódy a tiež variability pri produkcii sladidiel.



Obrázok 17: Chromatografická separácia vzorky komerčného sladidla č. 6 (a) a vzorky rastlinného extraktu č. 8 zo stéviových listov (b) pomocou optimalizovanej UHPLC-CAD metódy. Podmienky separácie: kolóna Luna Omega Polar C18 (150x2,1mm; 1,6 μ m). Gradientová elúcia s mobilnou fázou zloženou z vody (A) a scetonitrilu (B), priebeh gradientu: 35-55% B v A za 4 min, 55% B po dobu 1,5 min, 55-35% B za 0,2 min, 35% B po dobu 1,3 min, teplota kolóny 50°C, prietok mobilnej fázy 0,35 ml/min, objem nástreku 2 μ l.

Obsah SG sa v rámci jednotlivých rastlinných častí rastlín *Stevia rebaudiana* líši [174]. Najvyššie koncentrácie sa nachádzajú v listoch rastliny, čo bolo potvrdené aj analýzou rastlinných vzoriek. Zatiaľ čo rastlinná vzorka č. 8 obsahovala len sušené listy stévie, vzorka 9 obsahovala aj iné rastlinné časti, ako napríklad stonky. Celkovo, obsah SG bol vo vzorke č. 8 v porovnaní so vzorkou č. 9 až 3,9 krát vyšší. Porovnanie chromatografických záznamov z analýzy extraktu komerčného sladidla a rastlinnej vzorky je znázornený na Obrázku 17.

Vyvinutá metóda poskytovala dostatočne nízky LOD (0,15 μ g/ml) a LOQ (0,5 μ g/ml) pre stanovenie hlavných SG, tiež dostatočné rozlíšenie hlavných SG, RebA a ST ($\geq 2,4$). Výťažnosť metódy pre komerčné sladidlá bola 89,6 – 105,0 % a pre rastlinný materiál 93,8 – 111,4 %.

V porovnaní s predchádzajúcimi prácami, je zásadným zlepšením zvýšenie rozlíšenia kritického páru ST a RebA. Na rozdiel od predchádzajúcich prác, ktoré udávali rozlíšenie najviac 2 [161, 167], nami vyvinutá metóda dosahuje rozlíšenie až 2,41 a umožňuje tak spoľahlivú kvantifikáciu oboch analytov. LOD a LOQ vyvinutej metódy je rovnaký pre všetkých šesť analytov, čo v porovnaní s inými

publikovanými metódami potvrdilo výrazné zvýšenie citlivosti stanovenia. Napríklad v porovnaní s UV detekciou poskytuje vyvinutá metóda 4 – 10 násobne nižší LOQ [160, 161, 166, 175–177]. Taktiež v porovnaní s pulznou ampérometrickou detekciou bol dosiahnutý o polovicu nižší LOD [178]. V porovnaní s publikáciami, ktoré taktiež využívali univerzálny typ detekcie ELSD a CAD, dosahuje naša metóda 50 krát [165], respektíve 2,8 – 4,6 x nižší LOQ [179].

3.3. Green Solvents in the Extraction of Bioactive Compounds from Dried Apple Cultivars (príloha č. 3)

Cieľom práce bolo vyvinúť a vzájomne porovnať potenciál dvoch extrakčných metód s využitím zelených rozpúšťadiel, konkrétne sonikačnej extrakcie a extrakcie oxidom uhličitým obohateným o kvapalinu (gas expanded liquid extraction, GXLE). Vývoj metód bol prispôsobený typu rastlinnej vzorky, ktorou boli plátky sušených jabĺk aj so šupkou a fenolickým látkam, ako cieľovým analytom. Na rozdiel od väčšiny konvenčných extrakčných metód sú moderné extrakčné metódy častokrát označované ako „zelené“, pretože dochádza k redukcii spotreby toxických organických rozpúšťadiel. Pri vývoji metód bola zásadnou limitáciou polarita analytov, ktorá vopred predurčovala spektrum vhodných extrakčných rozpúšťadiel. Zároveň, prítomnosť komplexnej polárnej matrice zvyšovala pravdepodobnosť koextrakcie látok štruktúrne podobných s cieľovými analytmi.

Zloženie jabĺk je charakteristické predovšetkým vysokým obsahom vody – až 85 %, polysacharidov, sacharidov, a približne 1 % bioaktívnych látok ako sú vitamíny, karotenoidy, fytoferoli a fenolické látky [53]. Výťažnosť vyvíjaných metód sa sledovala na základe výsledkov UHPLC-DAD metódy, ktorá umožňovala kvantifikáciu štrnástich fenolických látok typických pre jablčné vzorky. Pre zvýšenie spektra fenolických látok, vývoj metód prebiehal s využitím zmesi, ktorá pozostávala zo sušených jabĺk zakúpených v supermarkete a sušených jabĺk piatich kultivarov jednotlivých vzoriek. Príprava vzoriek jablčných kultivarov zahŕňala ich krájanie na plátky (aj so šupkou) a ich okamžité sušenie v sušičke. Pre zníženie degradácie fenolických látok a predovšetkým ich glykozidických foriem, boli aplikované znalosti z publikovaného užitečného vzoru, kde sa sledoval vplyv teploty sušenia na obsahové látky [180]. Samotné sušenie prebiehalo v dvoch krokoch a to pri teplote 50 °C po dobu jednej hodiny a pri teplote 60 °C po dobu siedmych hodín. Následne boli vzorky mixované na jemný prášok a následne uskladnené do doby analýzy v utesnených sklenených nádobách v tme a chlade.

Vývoj oboch metód prebiehal s využitím softvéru dizajnu experimentu (DoE), pomocou ktorého sa optimalizovali sledované extrakčné parametre. V prípade optimalizácie sonikačnej metódy bol zvolený D-optimálny dizajn a pre optimalizáciu GXLE Box-Behnken dizajn. Optimalizácia metód prebehla v dvoch hlavných krokoch. V prvom kroku optimalizácie GXLE sa sledoval vplyv pomeru CO₂/kosolvent a samotné zloženie kosolventu (rôzne pomery vody a etanolu), tlak a teplota extrakcie. V druhom kroku bola testovaná kinetika extrakcie – vplyv rýchlosti prietoku extrakčného média a čas extrakcie, a na záver vplyv veľkosti sklenených guľčiek používaných v extrakčnej cele na výťažnosť. V prípade optimalizácie sonikačnej metódy, D-optimálny dizajn slúžil na optimalizovanie zloženia extrakčného roztoku (pomer etanol/voda) a teploty extrakcie. V druhom kroku bola testovaná kinetika extrakcie.

Hlavnou požiadavkou pri vývoji bolo zohľadniť polárny charakter analytov. V prípade GXLE metódy bolo potrebné modifikovať nepolárny CO₂ prídavkom kosolventu zloženého z vody a etanolu. Rozsah ostatných testovaných parametrov ako teplota a tlak zohľadňoval fyzikálno-chemické vlastnosti analytov (riziko degradácie vplyvom teploty), ale aj samotné technické limitácie inštrumentácie. Z celkovo 14 sledovaných fenolických látok sa na hodnotenie výťažnosti sledoval súčet ôsmich analytov, ktoré boli v zmesnej vzorke zastúpené v najvyššej miere a predstavovali viac ako 90% všetkých kvantifikovaných analytov. Menovite sa jednalo o epikatechín, katechín, kyselinu chlorogenovú, floridzin, guaiaverin, hirsutrin, reynoutrin a kvercitrín.

V prípade GXLE mal obsah CO₂ a vody najvýznamnejší vplyv na výťažnosť extrakcie. Všeobecne platilo, že zvýšenie obsahu vody v kosolvente, teploty a tlaku poskytuje vyššiu výťažnosť extrakcie. Na základe vyhodnotenia výsledkov série extrakcií sa optimálne podmienky dosiahli pri použití extrakčného média zloženého z CO₂/etanol/voda v pomere 34/53,8/12,2 (v/v/v) s rýchlosťou prietoku 3 ml/min, pri teplote 75 °C, tlaku 120 bar, čase extrakcie 30 minút a optimálna disperzia vzorky bola v extrakčnej cele dosiahnutá použitím 2 mm sklenených guľičiek. Výťažnosť za týchto podmienok dosahovala 2442 µg/g s RSD < 10 %.

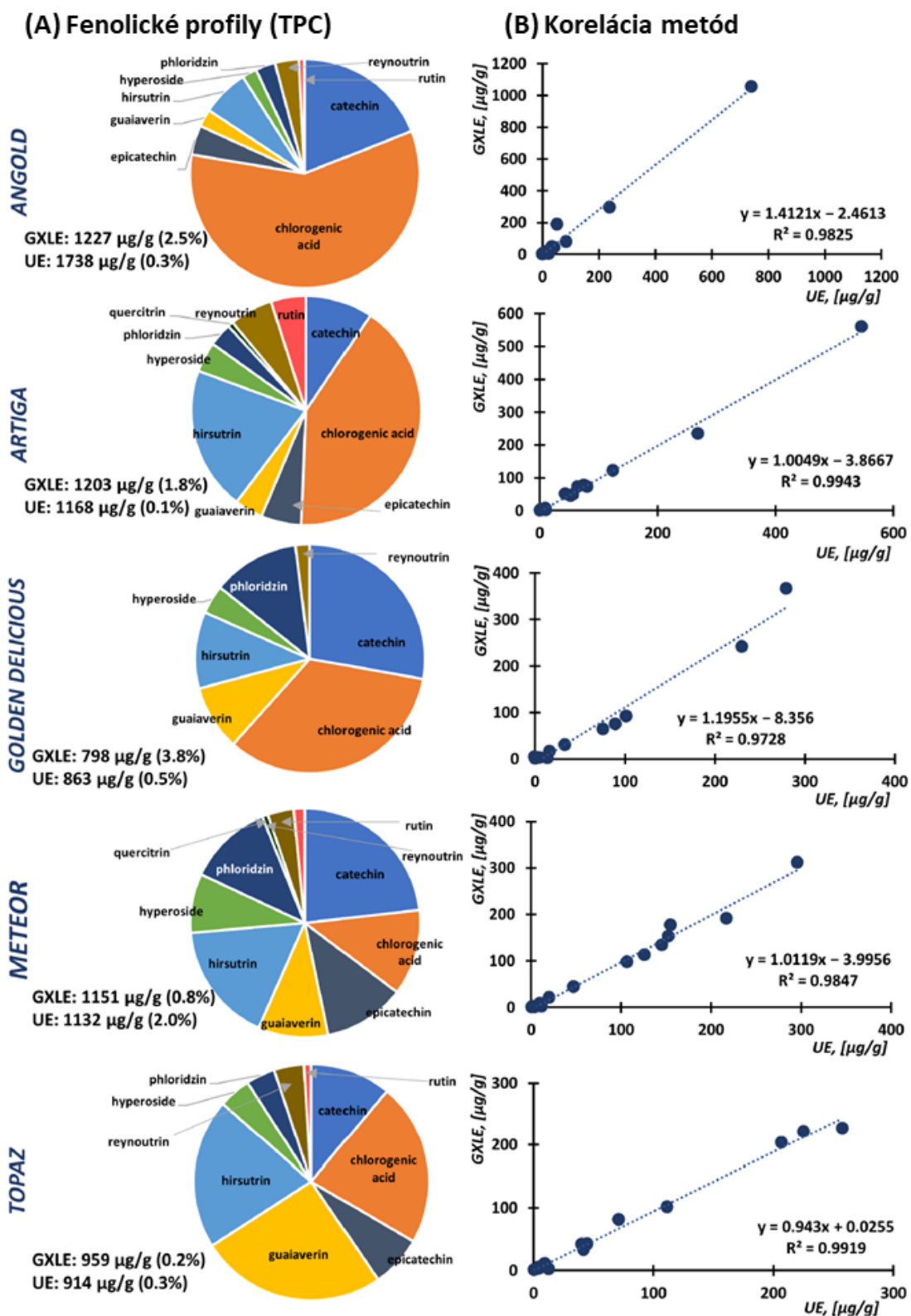
Pri optimalizácii sonikačnej metódy sa testoval vplyv zloženia extrakčného rozpúšťadla (etanol, voda) a teploty. Inštrumentácia v tomto prípade neumožňovala nastavovanie frekvencie sonikácie. Všeobecne, extrakcie prebiehajúce s vyšším obsahom vody v extrakčnom rozpúšťadle a pri vyššej teplote poskytovali lepšiu výťažnosť. Z výsledkov série extrakcií bolo možné pozorovať, že oba sledované parametre majú výrazný vplyv na výťažnosť extrakcie a zároveň dochádza k ich vzájomným interakciám. Štúdium kinetiky potvrdilo, že maximum fenolických látok je extrahovaných už počas prvých 10 min. Optimálne podmienky extrakcie boli preto dosiahnuté pri použití 26% etanolu ako extrakčného rozpúšťadla pri teplote 70 °C a čase extrakcie 10 min. Výťažnosť optimalizovanej metódy dosahovala 2226 µg/g s hodnotou RSD < 6 %.

Optimalizované metódy boli vzájomne porovnané na základe výsledkov z extrakcie vzoriek piatich jablčných odrôd. Porovnanie výsledkov poukazovalo na významnú vzájomnú koreláciu výsledkov oboch metód ($R^2 > 0,97$) (Obrázok 18). Jediný rozdiel bol pozorovaný v prípade kyseliny chlorogenovej, s hodnotou $R^2 = 0,9419$, čo bolo vysvetlené koelúciou štruktúrne podobných analytov, ktoré boli koextrahované sonikáciou. Porovnaním chromatografických záznamov oboch metód, bola v prípade GXLE pozorovaná o niečo vyššia selektivita extrakcie. To sa prejavilo nižším šumom a menším množstvom pík balastu na chromatogramoch. S výnimkou epikatechínu bola konformita metódy potvrdená aj vzájomnou koreláciou výsledkov pre ostatných sedem hlavných analytov ($R^2 > 0,94$).

Celkovo, metódy poskytovali vzájomne porovnateľné výsledky výťažnosti a opakovateľnosti s hodnotou RSD < 10 %.

Získané dáta korešpondovali s ďalšími publikovanými prácami, ktoré sa zaoberali vývojom metód pre extrakciu fenolických látok z rastlinného materiálu s použitím etanolu [23, 181–184]. Pozitívne vlastnosti etanolu na výťažnosť boli ďalej podporené prídavkom vody do extrakčného rozpúšťadla. Ďalšie zvýšenie efektivity extrakcie by bolo možné úpravou frekvencie sonikačnej metódy [55].

Zelenosť, respektíve miera ekologickosti metód bola vyhodnotená pomocou voľne dostupného softvéru Analytical GREENness, ktorý sleduje 12 princípov zelenej chémie (Obrázok 18) [185–187]. Nakoľko analýzy prebiehali rovnakou UHPLC metódou, najväčšia váha bola pripísaná samotnej extrakcii. Hlavné rozdiely metód spočívali v poloautomatickosti, respektíve plne manuálnej obsluhu. Ďalej v produkcii odpadu, spotrebe energie, a počte extrakcií, ktoré je možné previesť za časovú jednotku. Porovnaním sledovaných parametrov boli najväčšie rozdiely identifikované v miere spotreby energie, množstve generovaného odpadu a možnosti paralelnej extrakcie niekoľkých vzoriek. Na základe tohto porovnania dosiahla sonikačná metóda skóre 0,71, čím sa stala z environmentálneho hľadiska prijateľnejšia v porovnaní s GXLE so skóre 0,61.



Obrázok 18: (A) Porovnanie fenolických profilov jednotlivých jablčných odrôd. Celkový obsah (100 %) predstavuje množstvo extrahované optimalizovanou GXLE metódou. Hodnoty RSD sú uvedené pre celkový fenolický obsah získaný pomocou oboch metód, GXLE aj sonikačnej extrakcie. (B) Korelácia extrahovaného množstva látok medzi GXLE a sonikačnou extrakciou pre každú odrodu.

3.4. Certifikovaná metodika: Metodika pre kvalitatívne hodnotenie ovocia a spracovateľských produktov z hľadiska obsahu látok prospešných pre zdravie človeka (príloha č. 4)

Metodika bola publikovaná v nadväznosti na riešenie projektu TAČR TJ01000151. Je určená predovšetkým pestovateľom jabloní a spracovateľom ovocia. Cieľom bolo vyvinúť jednoduchú, rýchlu a rutinnú chromatografickú metódu, ktorá umožňuje analýzu veľkého počtu vzoriek a tým monitoring obsahu typických fenolických látok. Metodika podrobne sumarizuje informácie o separačnej metóde v kombinácii s DAD, CAD a CD detekciou a ich špecifikami. Okrem analytickej časti je metodika doplnená aj o pomologickú, ktorá ponúka kvalitatívne zhodnotenie jablčných odrôd.

Analytická časť metodiky charakterizuje fyzikálno-chemické, štruktúrne a biologické vlastnosti fenolických látok typických pre jablká. Súčasťou je popis chromatografických a detekčných metód (UV, DAD, ECD, CAD, FLD, MS), ktoré sú k analýze využívané najčastejšie a tiež tabuľka s prehľadom publikovaných chromatografických metód a ich separačných podmienok. Okrem kvantitatívnej chromatografickej analýzy sú popísané aj ďalšie metódy, ktoré poskytujú informácie o biologickej (antioxidačnej) aktivite vzorky ako napríklad testy s využitím činidiel s voľnými radikálmi, prípadne testy využívajúce redoxné reakcie. Pre lepšie pochopenie problematiky separácie a kvantifikácie fenolických látok sú uvedené aj špecifiká analytov, ktoré zvyšujú nároky na separačnú metódu a významným spôsobom ovplyvňujú výber použitej detekčnej techniky.

Metodika prezentuje použitie vyvinutých a validovaných analytických metód na stanovení siedmich fenolických látok ako kyselina gallová, kyselina chlorogenová, epikatechín, kvercetin, floridzín a floretín. Obsah látok je skúmaný v celkovo 27 odrodách, z toho 16 pôvodných a v 11 novošľachtených odrodách, ktoré boli vypestované v sezóne 2018 a zozbierané v stave ideálnej zrelosti. Pred samotnou analýzou boli vzorky skladované po dobu troch mesiacov za presne určených podmienok teploty a vlhkosti.

Možnosť replikácie analytických metód popísaných v rámci metodiky je umožnená vďaka podrobnému popisu použitých chemikálií a činidiel, použitej inštrumentácie a analytických podmienok HPLC- DAD- CAD a HPLC-CD, reakčných podmienok stanovenia antioxidačnej aktivity pomocou metódy TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity assay) a popisu samotnej úpravy jablčných vzoriek. Výsledky validácie metódy sú prehľadne vyobrazené vo forme tabuliek, kde možno pozorovať rozdiely medzi DAD a CAD detekciou vzhľadom na opakovateľnosť merania, LOD a LOQ hodnoty a tiež lineárny rozsah porovnávaných detektorov.

Výsledky získané DAD a CAD detekciou boli vzájomne porovnané s výsledkami CD a TEAC. Podobne ako v inej nami publikovanej práci [75], v prípade CAD detekcie bolo pozorované

nadhodnocovanie prípadne podhodnocovanie signálu v porovnaní s DAD detekciou. Konkrétne v prípade kyseliny chlorogenovej boli pozorované oba javy, čo bolo spôsobené jednak zložením určitých odrôd, ktorých obsahové látky koeluovali s kyselinou chlorogenovou a taktiež nižšou citlivosťou CAD detekcie. Tá na rozdiel od citlivej DAD detekcie kyseliny chlorogenovej na vlnovej dĺžke 320 nm nedokázala zachytiť signál analytu.

Výsledky HPLC-CD poukázali na výrazné medziodrodové rozdiely v obsahu antioxidantných látok. Najviac látok s redukčnými vlastnosťami sa nachádzalo v novošľachtenej odrode 'HL 1651', až 523 μC . Naopak najnižšia koncentrácia redukčných látok bola nameraná v tradičnej odrode Meteor a to 138 μC . Vo väčšine prípadov boli vyššie koncentrácie redukčných látok potvrdené u odrôd s vyšším množstvom kvantifikovaných fenolických látok pomocou DAD a CAD. Avšak, korelácia výsledkov neplatila pre všetky odrody, čo môže byť spojené s mierou antioxidantnej aktivity látok, kedy napríklad aj látka prítomná vo vysokých koncentráciách nedisponuje výraznými antioxidantnými vlastnosťami.

Korelácia výsledkov bola jednoznačne potvrdená medzi CD a TEAC. Avšak, napriek tomu, že metóda TEAC je veľmi často využívaná na stanovenie antioxidantnej aktivity, neumožňuje identifikáciu jednotlivých analytov tak, ako CD, ktorá je spojená aj so separačnou metódou.

Pre komplexnú charakteristiku jablčných odrôd je použitie metód poskytujúcich informácie o ich antioxidantnej aktivite významným prínosom a v kombinácii s kvantifikáciou jednotlivých analytov pomocou DAD detekcie umožňuje komplexný popis zloženia odrody. Z praktického hľadiska umožňuje metóda TEAC rýchle hodnotenie antioxidantnej aktivity, avšak vzhľadom na pracnosť je náchylná na vznik náhodných chýb. Metódy DAD a CAD majú v rámci analýzy vzoriek samostatné postavenie, nakoľko umožňujú kvantifikáciu a v prípade DAD aj spektrálnu identifikáciu jednotlivých analytov.

Pre komplexnosť hodnotenia odrôd je metodika doplnená aj o pomologickú časť, kde sa nachádza prehľad hodnotenia odrôd na základe parametrov ako vôňa, hrúbka šupky, konzistencia, kyslosť, chuť a vzhľad.

4. ZÁVER

Predložená dizertačná práca sumarizuje moju vedeckú prácu publikovanú počas doktorandského štúdia. Počas tejto doby som sa zaoberala vývojom extrakčných metód pre účinnú extrakciu fenolických látok z rastlinného materiálu a vývojom separačných metód v kombinácii s rôznymi typmi detekcie. Vývoj separačných metód bol zameraný na rýchle skrínigové separácie, ktoré umožňujú analýzu veľkého počtu vzoriek aj v krátkom čase. V závislosti od typu stanovovaných prírodných analytov boli separačné metódy kombinované s DAD, CAD a CD detekciou. V prípade potreby znalostí o biologickej aktivite testovaných vzoriek boli taktiež zaradené TEAC testy.

Vyvinuté extrakčné metódy, sonikačná a GXLE, potvrdili možnosť ich uplatnenia pre extrakciu fenolických látok a taktiež vysokú koreláciu výsledkov charakterizovaných ako suma kvantifikovaných fenolických látok získaných extrakciou jablčných vzoriek. Zásadný význam v optimalizácii výťažností oboch metód zohrávalo práve zloženie extrakčného rozpúšťadla. Porovnaním chromatografických profilov extraktov získaných oboma metódami bola zároveň pozorovaná o niečo vyššia selektivita extrakcie metódou GXLE, čo sa prejavovalo nižšou mierou šumu a znížením počtu balastných pík na chromatogramoch. Metódy boli porovnané aj na základe princípov zelenej chémie, kedy boli významné odlišnosti pozorované pre mieru spotreby rozpúšťadiel a energie, schopnosť spracovať väčší počet vzoriek za jednotku času a taktiež v dostupnosti inštrumentácie. Na základe týchto zistení bol potvrdený vyšší súlad s princípmi zelenej chémie pre sonikačnú metódu. Sonikačná metóda bola využívaná aj na prípravu extraktov stéviových sladidiel a jablčného pyrú v ďalších publikáciách.

Vhodnosť detekčných metód DAD a CAD bola testovaná z pohľadu selektivity a citlivosti stanovenia fenolických látok. Výsledky práce potvrdili náchylnosť CAD detekcie na možnosť ovplyvnenia signálu koelúciou ďalších zložiek matrice vzorky. Zároveň, vzhľadom na biologickú aktivitu fenolických látok bolo potvrdené, že detekcia zameraná len na kvantifikáciu vybraných hlavných analytov neposkytuje dostatočne komplexnú informáciu o miere antioxidačnej aktivity nie len identifikovaných, ale aj neidentifikovaných analytov zo vzorky. Z toho dôvodu je potrebné zaradenie aj iných detekčných metód ako CD prípadne antioxidačných testov.

Podrobný vývoj separačnej metódy bol prezentovaný na stéviových glykozidoch s CAD detekciou. Vzhľadom na vysokú polaritu molekúl bol okrem módu RP testovaný aj mód HILIC. CAD detekcia bola volená na základe slabej schopnosti absorpcie žiarenia molekulami glykozidov. V rámci vývoja bolo testovaných niekoľko stacionárnych fáz s rôznou povrchovou chémiou, izokratické aj gradientové elúcie, zloženie MF, teploty kolón, rýchlosti prietoku MF a objemy nástrekov. Vo všeobecnosti bol vývoj separačnej metódy v móde RP omnoho jednoduchší v porovnaní s HILIC. Vyvinutá separačná metóda umožnila rýchlu kvantifikáciu šiestich hlavných SG a bola validovaná pre

dva typy matríc podľa požiadaviek EMA. Vyvinutá metóda, aj v porovnaní s inými v tom čase publikovanými prácami, umožňovala citlivé a rýchle hodnotenie glykozidyckého profilu komerčných sladidiel a rastlinných extraktov.

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Fázový diagram.....	21
Obrázok 2: Znázornenie účinnosti separácie v závislosti na použitej veľkosti častíc. Rozmery kolóny 3,1 x 50 mm, MF ACN/voda v pomere 7:3 (v/v), teplota 25°C. Veľkosť častíc 1,7 μm (červená); 3,5 μm (zelená), 5,0 μm (modrá)	25
Obrázok 3: Znázornenie vplyvu homogenity plnenia chromatografickej kolóny na vírivú difúziu, člen A Van Deemterovej rovnice.....	27
Obrázok 4: Porovnanie vzdialenosti difúzných vrstiev povrchovo poréznej (vľavo) a plne poréznej častice (vpravo) a znázornenie vplyvu na člen C Van Deemterovej rovnice	28
Obrázok 5: Porovnanie účinnosti povrchovo poréznych častíc s veľkosťou 2,7 μm (zelená) a plne poréznych častíc s veľkosťou 3, 5 a 10 μm (žltá).....	28
Obrázok 6: Porovnanie vplyvu rýchlosti prietoku mobilnej fázy na generovaný spätný tlak pri použití FPP s veľkosťou 1,7 až 3 μm verus 2,7 μm SPP.....	29
Obrázok 7: Závislosť počtu teoretických pater na časovú jednotku (N/min) na rýchlosti prietoku MF. Rozmery kolón 150 x 4,6 mm, FPP 5 μm (kolóna 1), FPP 3 μm (kolóna 2), SPP 2,7 μm (kolóna 3). Porovnanie je zobrazené pre chirálnu separáciu amlodipinu	30
Obrázok 8: Znázornenie štruktúry viacvrstvovej častice	31
Obrázok 9: Schéma optického systému UV-Vis detektora (a) a DAD (b).....	34
Obrázok 10: Schéma fluorescenčného detektora	36
Obrázok 11: Schéma princípu CAD	37
Obrázok 12: Vyhodnotenie antioxidantnej aktivity s použitím CD. Sumy plôch pík na jednotlivých detekčných potenciáloch sú znázornené ako funkcia rastúceho detekčného potenciálu, čo vytvára hydrodynamický voltamogram. Vzorky sú rozdelené do jednotlivých grafov podľa hodnoty potenciálu na ktorom je pozorovaný prvý IP – 400 (A), 500 (B), 600 mV (C). Porovnanie vzoriek na základe celkovej plochy píkov ktoré patria do prvého elektrónového transferu (IP 1) (D).	45
Obrázok 13: Znázornenie Pearsonovej korelácie medzi detektormi pre všetky hodnotené odrody (62 bodov, biele pozadie) a pre vybrané hodnotené odrody, ktoré splnili podmienky t-testu pre podobnosť výsledkov celkových kvantifikovaných fenolických látok a antioxidantnej aktivity (18 bodov, sivé pozadie).	46
Obrázok 14: Chromatografická separácia zmesného štandardu stéviových glykozidov s použitím izokratickej elúcie. Podmienky: chromatografická kolóna Kinetex HILIC (100x2,1 mm; 2,6 μm). Mobilná fáza: 92% (a, c) a 90% (b, d) acetonitril s 5 mmol/l (a, b) a	

10 mmol/l (c, d) pufrom mravenčanu amonného, prietok mobilnej fázy 0,5 ml/min, teplota kolóny 30°C, objem nástreku 2 µl..... 48

Obrázok 15: Chromatografická separácia zmesného štandardu stéviových glykozidov s použitím gradientovej elúcie a RP kolón. Podmienky: kolóna Luna Omega PS (a), Luna Omega Polar (b), Kinetex F5 s veľkosťou častíc 2,6 µm (c), Kinetex F5 s veľkosťou častíc 1,7 µm (d). Mobilná fáza: 0,1% (v/v) vodný roztok kyseliny mravenčej (A) a acetonitril (B), gradientová elúcia 35-50% B v A za 3 min, 50-80% B za 2 min, 80% B po dobu 1 min; 80-35% B za 0,5 min, 35% B po dobu 2 min, teplota kolóny 40°C, prietok mobilnej fázy 0,35 ml/min, objem nástreku 2 µl. 49

Obrázok 16: Chromatografická separácia zmesného štandardu stéviových glykozidov s použitím optimalizovanej UHPLC-CAD metódy. Podmienky: kolóna Luna Omega Polar C18 (150x2,1 mm; 1,6 µm). Gradientová elúcia s mobilnou fázou zloženou z vody (A) a scetonitrilu (B), priebeh gradientu: 35-55% B v A za 4 min, 55% B po dobu 1,5 min, 55-35% B za 0,2 min, 35% B po dobu 1,3 min, teplota kolóny 50°C, prietok mobilnej fázy 0,35 ml/min, objem nástreku 2 µl. 50

Obrázok 17: Chromatografická separácia vzorky komerčného sladidla č. 6 (a) a vzorky rastlinného extraktu č. 8 zo stéviových listov (b) pomocou optimalizovanej UHPLC-CAD metódy. Podmienky separácie: kolóna Luna Omega Polar C18 (150x2,1mm; 1,6 µm). Gradientová elúcia s mobilnou fázou zloženou z vody (A) a scetonitrilu (B), priebeh gradientu: 35-55% B v A za 4 min, 55% B po dobu 1,5 min, 55-35% B za 0,2 min, 35% B po dobu 1,3 min, teplota kolóny 50°C, prietok mobilnej fázy 0,35 ml/min, objem nástreku 2 µl..... 51

Obrázok 18: (A) Porovnanie fenolických profilov jednotlivých jablčných odrôd. Celkový obsah (100 %) predstavuje množstvo extrahované optimalizovanou GXLE metódou. Hodnoty RSD sú uvedené pre celkový fenolický obsah získaný pomocou oboch metód, GXLE aj sonikačnej extrakcie. (B) Korelácia extrahovaného množstva látok medzi GXLE a sonikačnou extrakciou pre každú odrodu. 56

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Porovnanie vybraných validačných parametrov testovaných detekčných techník DAD a CAD.....	43
Tabuľka 2: Štatistické porovnanie senzitivity DAD a CAD detekcie na základe smernice regresnej rovnice. Hladina významnosti $\alpha = 0,05$	43

5. ZOZNAM CITÁCIÍ

- [1] O. R. Alara, N. H. Abdurahman, a C. I. Ukaegbu, Extraction of phenolic compounds: A review, *Curr Res Food Sci*, roč. 4, s. 200–214, 2021, doi: 10.1016/j.crfs.2021.03.011.
- [2] N. Balasundram, K. Sundram, a S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem*, roč. 99, č. 1, s. 191–203, 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042.
- [3] S. R. Shah, C. I. Ukaegbu, H. A. Hamid, a O. R. Alara, Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of the stems of *Flammulina velutipes* and *Hypsizygus tessellatus* (white and brown var.) extracted with different solvents, *Journal of Food Measurement and Characterization*, roč. 12, č. 3, s. 1947–1961, 2018, doi: 10.1007/s11694-018-9810-8.
- [4] S. Martini, A. Conte, a D. Tagliazucchi, Phenolic compounds profile and antioxidant properties of six sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars, *Food Research International*, roč. 97, s. 15–26, 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.03.030.
- [5] M. Herrero, M. Plaza, A. Cifuentes, a E. Ibáñez, Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food, v *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, Elsevier, 2012, s. 159–180. doi: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00132-0.
- [6] K. A. Shams, N. S. Abdel-Azim, I. A. Saleh, M.-E. F. Hegazy, M. M. El-Missiry, a F. M. Hammouda, Green technology : Economically and environmentally innovative methods for extraction of medicinal & aromatic plants (MAP) in Egypt, *J Chem Pharm Res*, roč. 7, č. 5, s. 1050–1074, 2015.
- [7] O. R. Alara, N. H. Abdurahman, a C. I. Ukaegbu, Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity, *J Appl Res Med Aromat Plants*, roč. 11, s. 12–17, 2018, doi: 10.1016/j.jarmap.2018.07.003.
- [8] O. R. Alara, N. H. Abdurahman, C. I. Ukaegbu, a N. H. Azhari, *Vernonia cinerea* leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted extraction technique, *Ind Crops Prod*, roč. 122, s. 533–544, 2018, doi: 10.1016/j.indcrop.2018.06.034.
- [9] B. Kaufmann a P. Christen, Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, *Phytochemical Analysis*, roč. 13, č. 2, s. 105–113, 2002, doi: 10.1002/pca.631.
- [10] O. Sticher, Natural product isolation, *Nat Prod Rep*, roč. 25, č. 3, s. 517, 2008, doi: 10.1039/b700306b.
- [11] C. S. Dzah *et al.*, The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review, *Food Biosci*, roč. 35, s. 100547, 2020, doi: 10.1016/j.fbio.2020.100547.
- [12] L. Wang *et al.*, Ultrasonic extraction and separation of anthraquinones from *Rheum palmatum* L., *Ultrason Sonochem*, roč. 15, č. 5, s. 738–746, 2008, doi: 10.1016/j.ultsonch.2007.12.008.
- [13] L. Zhang *et al.*, Study of ultrasonic cavitation during extraction of the peanut oil at varying frequencies, *Ultrason Sonochem*, roč. 37, s. 106–113, 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.12.034.

- [14] S. Kaur Bhangu, M. Ashokkumar, a J. Lee, Ultrasound Assisted Crystallization of Paracetamol: Crystal Size Distribution and Polymorph Control, *Cryst Growth Des*, roč. 16, č. 4, s. 1934–1941, 2016, doi: 10.1021/acs.cgd.5b01470.
- [15] P. Juliano *et al.*, Extraction of olive oil assisted by high-frequency ultrasound standing waves, *Ultrason Sonochem*, roč. 38, s. 104–114, 2017, doi: 10.1016/j.ultsonch.2017.02.038.
- [16] J. Stojanovic a J. L. Silva, Influence of osmotic concentration, continuous high frequency ultrasound and dehydration on antioxidants, colour and chemical properties of rabbiteye blueberries, *Food Chem*, roč. 101, č. 3, s. 898–906, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.02.044.
- [17] B. Miljevic, F. Hedayat, S. Stevanovic, K. E. Fairfull-Smith, S. E. Bottle, a Z. D. Ristovski, To Sonicate or Not to Sonicate PM Filters: Reactive Oxygen Species Generation Upon Ultrasonic Irradiation, *Aerosol Science and Technology*, roč. 48, č. 12, s. 1276–1284, 2014, doi: 10.1080/02786826.2014.981330.
- [18] J. Prakash Maran, S. Manikandan, C. Vigna Nivetha, a R. Dinesh, Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design, *Arabian Journal of Chemistry*, roč. 10, s. S1145–S1157, 2017, doi: 10.1016/j.arabjc.2013.02.007.
- [19] C. D. Fernando a P. Soysa, Extraction Kinetics of phytochemicals and antioxidant activity during black tea (*Camellia sinensis* L.) brewing, *Nutr J*, roč. 14, č. 1, s. 74, 2015, doi: 10.1186/s12937-015-0060-x.
- [20] N. Ćurko *et al.*, The effect of high power ultrasound on phenolic composition, chromatic characteristics, and aroma compounds of red wines, *Croatian Journal of Food Science and Technology*, roč. 9, č. 2, s. 136–144, 2017, doi: 10.17508/CJFST.2017.9.2.08.
- [21] M. Paini, A. A. Casazza, B. Aliakbarian, P. Perego, A. Binello, a G. Cravotto, Influence of ethanol/water ratio in ultrasound and high-pressure/high-temperature phenolic compound extraction from agri-food waste, *Int J Food Sci Technol*, roč. 51, č. 2, s. 349–358, 2016, doi: 10.1111/ijfs.12956.
- [22] J. Azmir *et al.*, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *J Food Eng*, roč. 117, č. 4, s. 426–436, 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014.
- [23] M. Cvjetko Bubalo, S. Vidović, I. Radojčić Redovniković, a S. Jokić, New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents, *Food and Bioprocess Processing*, roč. 109, s. 52–73, 2018, doi: 10.1016/j.fbp.2018.03.001.
- [24] T. Belwal *et al.*, A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 100, s. 82–102, 2018, doi: 10.1016/j.trac.2017.12.018.
- [25] A. Altemimi, D. G. Watson, R. Choudhary, M. R. Dasari, a D. A. Lightfoot, Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins, *PLoS One*, roč. 11, č. 2, s. e0148758, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0148758.
- [26] J. Dai a R. J. Mumper, Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules*, roč. 15, č. 10, s. 7313–7352, 2010, doi: 10.3390/molecules15107313.

- [27] L. Havlíková a K. Míková, Heat Stability of Anthocyanins, *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, roč. 181, č. 5, s. 427–432, 1985, doi: 10.1007/BF01027412.
- [28] T.-B. Zou, E.-Q. Xia, T.-P. He, M.-Y. Huang, Q. Jia, a H.-W. Li, Ultrasound-Assisted Extraction of Mangiferin from Mango (*Mangifera indica* L.) Leaves Using Response Surface Methodology, *Molecules*, roč. 19, č. 2, s. 1411–1421, 2014, doi: 10.3390/molecules19021411.
- [29] P. S. Vankar a J. Srivastava, Ultrasound-Assisted Extraction in Different Solvents for Phytochemical Study of *Canna indica*, *International Journal of Food Engineering*, roč. 6, č. 3, 2010, doi: 10.2202/1556-3758.1599.
- [30] U. Złotek, S. Mikulska, M. Nagajek, a M. Świeca, The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts, *Saudi J Biol Sci*, roč. 23, č. 5, s. 628–633, 2016, doi: 10.1016/j.sjbs.2015.08.002.
- [31] J. Pinela *et al.*, Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants, *Food Chem*, roč. 275, s. 309–321, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.118.
- [32] C. C. Coussios, C. H. Farny, G. Ter Haar, a R. A. Roy, Role of acoustic cavitation in the delivery and monitoring of cancer treatment by high-intensity focused ultrasound (HIFU), *International Journal of Hyperthermia*, roč. 23, č. 2, s. 105–120, 2007, doi: 10.1080/02656730701194131.
- [33] D.-P. Xu, J. Zheng, Y. Zhou, Y. Li, S. Li, a H.-B. Li, Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods, *Food Chem*, roč. 217, s. 552–559, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.013.
- [34] S.-S. Teh a E. J. Birch, Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes, *Ultrason Sonochem*, roč. 21, č. 1, s. 346–353, 2014, doi: 10.1016/j.ultsonch.2013.08.002.
- [35] R. Abdelkebir *et al.*, Effect of ultrasound technology combined with binary mixtures of ethanol and water on antibacterial and antiviral activities of *Erodium glaucophyllum* extracts, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, roč. 52, s. 189–196, 2019, doi: 10.1016/j.ifset.2018.12.009.
- [36] K. Rafińska *et al.*, Effect of solvent and extraction technique on composition and biological activity of *Lepidium sativum* extracts, *Food Chem*, roč. 289, s. 16–25, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.03.025.
- [37] O. R. Alara a N. H. Abdurahman, Microwave-assisted extraction of phenolics from *Hibiscus sabdariffa* calyces: Kinetic modelling and process intensification, *Ind Crops Prod*, roč. 137, s. 528–535, 2019, doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.053.
- [38] J. Pinela *et al.*, Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study, *Sep Purif Technol*, roč. 164, s. 114–124, 2016, doi: 10.1016/j.seppur.2016.03.030.
- [39] H.-F. Zhang, X.-H. Yang, a Y. Wang, Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions, *Trends Food Sci Technol*, roč. 22, č. 12, s. 672–688, 2011, doi: 10.1016/j.tifs.2011.07.003.

- [40] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, a R. M. Marcé, Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 29, č. 7, s. 752–764, 2010, doi: 10.1016/j.trac.2010.03.014.
- [41] Q.-W. Zhang, L.-G. Lin, a W.-C. Ye, Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review, *Chin Med*, roč. 13, č. 1, s. 20, 2018, doi: 10.1186/s13020-018-0177-x.
- [42] C. C. Teo, S. N. Tan, J. W. H. Yong, C. S. Hew, a E. S. Ong, Pressurized hot water extraction (PHWE), *J Chromatogr A*, roč. 1217, č. 16, s. 2484–2494, 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2009.12.050.
- [43] M. Plaza a C. Turner, Pressurized hot water extraction of bioactives, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 71, s. 39–54, 2015, doi: 10.1016/j.trac.2015.02.022.
- [44] A. Mustafa a C. Turner, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Anal Chim Acta*, roč. 703, č. 1, s. 8–18, 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.07.018.
- [45] K. Srinivas, J. W. King, J. K. Monrad, L. R. Howard, a C. M. Hansen, Optimization of Subcritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds Using Hansen Solubility Parameters, *J Food Sci*, roč. 74, č. 6, s. E342–E354, 2009, doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01251.x.
- [46] S. Maqsood, S. Benjakul, A. Abushelaibi, a A. Alam, Phenolic Compounds and Plant Phenolic Extracts as Natural Antioxidants in Prevention of Lipid Oxidation in Seafood: A Detailed Review, *Compr Rev Food Sci Food Saf*, roč. 13, č. 6, s. 1125–1140, 2014, doi: 10.1111/1541-4337.12106.
- [47] J. R. Vergara-Salinas *et al.*, Effect of Pressurized Hot Water Extraction on Antioxidants from Grape Pomace before and after Enological Fermentation, *J Agric Food Chem*, roč. 61, č. 28, s. 6929–6936, 2013, doi: 10.1021/jf4010143.
- [48] H. Wijngaard a N. Brunton, The Optimization of Extraction of Antioxidants from Apple Pomace by Pressurized Liquids, *J Agric Food Chem*, roč. 57, č. 22, s. 10625–10631, 2009, doi: 10.1021/jf902498y.
- [49] A. M. Gizir, N. Turker, a E. Artuvan, Pressurized acidified water extraction of black carrot [*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.] anthocyanins, *European Food Research and Technology*, roč. 226, č. 3, s. 363–370, 2008, doi: 10.1007/s00217-006-0546-z.
- [50] L. C. da Silva *et al.*, Simultaneous extraction and separation of bioactive compounds from apple pomace using pressurized liquids coupled on-line with solid-phase extraction, *Food Chem*, roč. 318, s. 126450, 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126450.
- [51] M. Herrero, A. Cifuentes, a E. Ibanez, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review, *Food Chem*, roč. 98, č. 1, s. 136–148, 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.058.
- [52] E. Anklam, H. Berg, L. Mathiasson, M. Sharman, a F. Ulberth, Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: A review, *Food Addit Contam*, roč. 15, č. 6, s. 729–750, 1998, doi: 10.1080/02652039809374703.
- [53] *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier, 2020. doi: 10.1016/C2018-0-00121-8.

- [54] L. P. Cunico a C. Turner, Supercritical Fluids and Gas-Expanded Liquids, *The Application of Green Solvents in Separation Processes*, s. 155–214, 2017, doi: 10.1016/B978-0-12-805297-6.00007-3.
- [55] R. P. F. F. da Silva, T. A. P. Rocha-Santos, a A. C. Duarte, Supercritical fluid extraction of bioactive compounds, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 76, s. 40–51, 2016, doi: 10.1016/j.trac.2015.11.013.
- [56] K. Tyśkiewicz, M. Konkol, a E. Rój, The Application of Supercritical Fluid Extraction in Phenolic Compounds Isolation from Natural Plant Materials, *Molecules*, roč. 23, č. 10, s. 2625, 2018, doi: 10.3390/molecules23102625.
- [57] D. J. Heldebrant, H. N. Witt, S. M. Walsh, T. Ellis, J. Rauscher, a P. G. Jessop, Liquid polymers as solvents for catalytic reductions, *Green Chemistry*, roč. 8, č. 9, s. 807, 2006, doi: 10.1039/b605405f.
- [58] B. Rajagopalan, M. Wei, G. T. Musie, B. Subramaniam, a D. H. Busch, Homogeneous Catalytic Epoxidation of Organic Substrates in CO₂-Expanded Solvents in the Presence of Water-Soluble Oxidants and Catalysts, *Ind Eng Chem Res*, roč. 42, č. 25, s. 6505–6510, 2003, doi: 10.1021/ie0340950.
- [59] P. G. Jessop a B. Subramaniam, Gas-Expanded Liquids, *Chem Rev*, roč. 107, č. 6, s. 2666–2694, 2007, doi: 10.1021/cr040199o.
- [60] J. A. Mendiola, Green Processes in Foodomics. Gas-Expanded Liquids Extraction of Bioactives, v *Comprehensive Foodomics*, Elsevier, 2021, s. 744–753. doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22927-2.
- [61] K. M. Sharif *et al.*, Experimental design of supercritical fluid extraction – A review, *J Food Eng*, roč. 124, s. 105–116, 2014, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.10.003.
- [62] S. B. Hawthorne, Analytical-scale supercritical fluid extraction, *Anal Chem*, roč. 62, č. 11, s. 633A-642A, 1990, doi: 10.1021/ac00210a001.
- [63] İ. H. Adil, H. İ. Çetin, M. E. Yener, a A. Bayındırlı, Subcritical (carbon dioxide+ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts, *J Supercrit Fluids*, roč. 43, č. 1, s. 55–63, 2007, doi: 10.1016/j.supflu.2007.04.012.
- [64] G. Ferrentino, K. Morozova, O. K. Mosibo, M. Ramezani, a M. Scampicchio, Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction, *J Clean Prod*, roč. 186, s. 253–261, 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.03.165.
- [65] M. Hollá, V. Pilařová, F. Švec, a H. Sklenářová, Green Solvents in the Extraction of Bioactive Compounds from Dried Apple Cultivars, *Foods*, roč. 12, č. 4, s. 893, 2023, doi: 10.3390/foods12040893.
- [66] A. Massias, S. Boisard, M. Baccaunaud, F. Leal Calderon, a P. Subra-Paternault, Recovery of phenolics from apple peels using CO₂+ethanol extraction: Kinetics and antioxidant activity of extracts, *J Supercrit Fluids*, roč. 98, s. 172–182, 2015, doi: 10.1016/j.supflu.2014.12.007.
- [67] F. Montañés, O. J. Catchpole, S. Tallon, K. A. Mitchell, D. Scott, a R. F. Webby, Extraction of apple seed oil by supercritical carbon dioxide at pressures up to 1300 bar, *J Supercrit Fluids*, roč. 141, s. 128–136, 2018, doi: 10.1016/j.supflu.2018.02.002.

- [68] M. Martin a G. Guiochon, Effects of high pressure in liquid chromatography, *J Chromatogr A*, roč. 1090, č. 1–2, s. 16–38, 2005, doi: 10.1016/j.chroma.2005.06.005.
- [69] Y. Xiang, Y. Liu, a M. L. Lee, Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature, *J Chromatogr A*, roč. 1104, č. 1–2, s. 198–202, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2005.11.118.
- [70] K. Plachká, L. Chrenková, M. Douša, a L. Nováková, Development, validation and comparison of UHPSFC and UHPLC methods for the determination of agomelatine and its impurities, *J Pharm Biomed Anal*, roč. 125, s. 376–384, 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2016.04.020.
- [71] F. Hansen, E. L. Øiestad, a S. Pedersen-Bjergaard, Bioanalysis of pharmaceuticals using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography–mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal*, roč. 189, s. 113446, 2020, doi: 10.1016/j.jpba.2020.113446.
- [72] Y. Wu, B. Ji, X. Zeng, Y. Liang, S. Gao, a Z. Yu, Determination of Long Chain Chlorinated Paraffins in Soils and Sediments by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) High Resolution Mass Spectrometry (HR-MS), *Anal Lett*, roč. 55, č. 16, s. 2590–2603, 2022, doi: 10.1080/00032719.2022.2065678.
- [73] A. J. Krotulski, D. M. Papsun, C. Noble, S. L. Kacinko, a B. K. Logan, Brorphine—Investigation and quantitation of a new potent synthetic opioid in forensic toxicology casework using liquid chromatography-mass spectrometry, *J Forensic Sci*, roč. 66, č. 2, s. 664–676, 2021, doi: 10.1111/1556-4029.14623.
- [74] A. S. Ivanova, A. D. Merkulova, S. V. Andreev, a K. A. Sakharov, Method for determination of hydrogen peroxide in adulterated milk using high performance liquid chromatography, *Food Chem*, roč. 283, s. 431–436, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.051.
- [75] M. Hollá *et al.*, Benefits and Pitfalls of HPLC Coupled to Diode-Array, Charged Aerosol, and Coulometric Detections: Effect of Detection on Screening of Bioactive Compounds in Apples, *Molecules*, roč. 26, č. 11, s. 3246, 2021, doi: 10.3390/molecules26113246.
- [76] M. Hollá, D. Šatínský, F. Švec, a H. Sklenářová, UHPLC coupled with charged aerosol detector for rapid separation of steviol glycosides in commercial sweeteners and extract of Stevia rebaudiana, *J Pharm Biomed Anal*, roč. 207, s. 114398, 2022, doi: 10.1016/j.jpba.2021.114398.
- [77] K. Cabrera, A New Generation of Silica-Based Monolithic HPLC Columns with Improved Performance, *LCGC North America*, roč. 04, s. 30–35, 2012.
- [78] H. T. Khoo a C. H. Leow, Advancements in the preparation and application of monolithic silica columns for efficient separation in liquid chromatography, *Talanta*, roč. 224, s. 121777, 2021, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121777.
- [79] L. Nováková, D. Solichová, a P. Solich, Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: Comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel, *J Sep Sci*, roč. 29, č. 16, s. 2433–2443, 2006, doi: 10.1002/jssc.200600147.
- [80] A. Adamcová, A. Horna, a D. Šatínský, Determination of Phloridzin and Other Phenolic Compounds in Apple Tree Leaves, Bark, and Buds Using Liquid Chromatography with

- Multilayered Column Technology and Evaluation of the Total Antioxidant Activity, *Pharmaceuticals*, roč. 15, č. 2, s. 244, 2022, doi: 10.3390/ph15020244.
- [81] S. Horváth, F. Gritti, R. Kormány, a K. Horváth, Theoretical Analysis of Efficiency of Multi-Layer Core-Shell Stationary Phases in the High Performance Liquid Chromatography of Large Biomolecules, *Molecules*, roč. 24, č. 15, s. 2849, 2019, doi: 10.3390/molecules24152849.
- [82] What Is Endcapping in HPLC Columns. Chrom Tech, Inc, 2021. Cit: júl 2023. [Online]. Dostupné na: <https://chromtech.com/what-is-endcapping-in-hplc-column/>
- [83] T. Greibrokk a T. Andersen, High-temperature liquid chromatography, *J Chromatogr A*, roč. 1000, č. 1–2, s. 743–755, 2003, doi: 10.1016/S0021-9673(02)01963-5.
- [84] S. I. Magagula, A. Ndiripo, a A. Johannes van Reenen, Heterophasic ethylene-propylene copolymers: New insights on complex microstructure by combined molar mass fractionation and high temperature liquid chromatography, *Polym Degrad Stab*, roč. 171, s. 109022, 2020, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2019.109022.
- [85] D. Guillarme, D. T.-T. Nguyen, S. Rudaz, a J.-L. Veuthey, Recent developments in liquid chromatography—Impact on qualitative and quantitative performance, *J Chromatogr A*, roč. 1149, č. 1, s. 20–29, 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2006.11.014.
- [86] D. Guillarme, J. Ruta, S. Rudaz, a J.-L. Veuthey, New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches, *Anal Bioanal Chem*, roč. 397, č. 3, s. 1069–1082, 2010, doi: 10.1007/s00216-009-3305-8.
- [87] J. R. Mazzeo, U. D. Neue, M. Kele, a R. S. Plumb, A new separation technique takes advantage of sub-2- μm porous particles, *Anal Chem*, roč. 77, s. 460A-467A, 2005.
- [88] J. H. Knox a M. Saleem, Kinetic Conditions for Optimum Speed and Resolution in Column Chromatography, *J Chromatogr Sci*, roč. 7, č. 10, s. 614–622, 1969, doi: 10.1093/chromsci/7.10.614.
- [89] T. H. Walter a R. W. Andrews, Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 63, s. 14–20, 2014, doi: 10.1016/j.trac.2014.07.016.
- [90] M. Taleuzzaman, S. Ali, S. J. Gilani, S. S. Imam, a A. Hafeez, Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review, *Austin J Anal Pharm Chem*, roč. 2, č. 6, s. 1056, 2015.
- [91] C. Zhu, D. M. Goodall, a S. A. C. Wren, Elevated Temperature HPLC: Principles and Applications to Small. Molecules and Biomolecules, *LC-GC North America*, roč. 32, č. 1, s. 54–72, 2005.
- [92] A. Ahmed, K. Skinley, S. Herodotou, a H. Zhang, Core-shell microspheres with porous nanostructured shells for liquid chromatography, *J Sep Sci*, roč. 41, č. 1, s. 99–124, 2018, doi: 10.1002/jssc.201700850.
- [93] M. W. Dong, S. Fekete, a D. Guillarme, Superficially Porous Particles: Perspectives, Practices, and Trends, *LCGC North America*, roč. 32, č. 6, s. 420–433, 2014.
- [94] A. Cavazzini, F. Gritti, K. Kaczmarski, N. Marchetti, a G. Guiochon, Mass-Transfer Kinetics in a Shell Packing Material for Chromatography, *Anal Chem*, roč. 79, č. 15, s. 5972–5979, 2007, doi: 10.1021/ac070571a.

- [95] N. Marchetti, A. Cavazzini, F. Gritti, a G. Guiochon, Gradient elution separation and peak capacity of columns packed with porous shell particles, *J Chromatogr A*, roč. 1163, č. 1–2, s. 203–211, 2007, doi: 10.1016/j.chroma.2007.06.046.
- [96] Ascentis® Express HPLC and UHPLC Columns. Sigma Aldrich, 2020. Cit: júl 2023. [Online]. Dostupné na: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Product_Information_Sheet/t407044.pdf
- [97] D. A. Spudeit, M. D. Dolzan, Z. S. Breitbach, W. E. Barber, G. A. Micke, a D. W. Armstrong, Superficially porous particles vs. fully porous particles for bonded high performance liquid chromatographic chiral stationary phases: Isopropyl cyclofructan 6, *J Chromatogr A*, roč. 1363, s. 89–95, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.08.022.
- [98] J. O. Omamogho, J. P. Hanrahan, J. Tobin, a J. D. Glennon, Structural variation of solid core and thickness of porous shell of 1.7µm core–shell silica particles on chromatographic performance: Narrow bore columns, *J Chromatogr A*, roč. 1218, č. 15, s. 1942–1953, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2010.11.067.
- [99] A. C. Sanchez *et al.*, Pushing the performance limits of reversed-phase ultra high performance liquid chromatography with 1.3µm core–shell particles, *J Chromatogr A*, roč. 1311, s. 90–97, 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.08.065.
- [100] YMC-Triart - Versatile hybrid silica based (U)HPLC columns. YMC Europe GmbH. Cit: júl 2023. [Online]. Dostupné na: https://www.interchim.fr/cat/120829_Triart_Complet_Inter.pdf
- [101] H. Cho *et al.*, Dereplication by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectroscopy (qTOF-MS) and Antiviral Activities of Phlorotannins from *Ecklonia cava*, *Mar Drugs*, roč. 17, č. 3, s. 149, 2019, doi: 10.3390/md17030149.
- [102] K. Li *et al.*, Glycybridins A–K, Bioactive Phenolic Compounds from *Glycyrrhiza glabra*, *J Nat Prod*, roč. 80, č. 2, s. 334–346, 2017, doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00783.
- [103] Y.-M. Wei *et al.*, Phenolic compounds from the sclerotia of *Inonotus obliquus*, *Nat Prod Res*, roč. 36, č. 9, s. 2413–2417, 2022, doi: 10.1080/14786419.2020.1833202.
- [104] K. M. Kalili a A. de Villiers, Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds, *J Sep Sci*, roč. 34, č. 8, s. 854–876, 2011, doi: 10.1002/jssc.201000811.
- [105] I. D. Wilson a U. A. T. Brinkman, Hyphenation and hypernation the practice and prospects of multiple hyphenation, *J Chromatogr A*, roč. 1000, č. 1–2, s. 325–356, 2003, doi: 10.1016/S0021-9673(03)00504-1.
- [106] A. Cappiello, G. Famigliani, P. Palma, E. Pierini, V. Termopoli, a H. Trufelli, Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, *Anal Chem*, roč. 80, č. 23, s. 9343–9348, dec. 2008, doi: 10.1021/ac8018312.
- [107] J. Kang, L. A. Hick, a W. E. Price, Using calibration approaches to compensate for remaining matrix effects in quantitative liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometric analysis of phytoestrogens in aqueous environmental samples, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, roč. 21, č. 24, s. 4065–4072, 2007, doi: 10.1002/rcm.3311.

- [108] T. Yarita, Y. Aoyagi, a T. Otake, Evaluation of the impact of matrix effect on quantification of pesticides in foods by gas chromatography–mass spectrometry using isotope-labeled internal standards, *J Chromatogr A*, roč. 1396, s. 109–116, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.03.075.
- [109] C. Verdu, J. Gatto, I. Freuze, P. Richomme, F. Laurens, a D. Guilet, Comparison of Two Methods, UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS, for the Quantification of Polyphenols in Cider Apple Juices, *Molecules*, roč. 18, č. 9, s. 10213–10227, 2013, doi: 10.3390/molecules180910213.
- [110] L. Caporossi *et al.*, LC Determination of the Skin Exposure to Oxamyl on Greenhouse Workers and Comparison Between DAD and MS–MS Detection, *Chromatographia*, roč. 72, č. 3–4, s. 281–287, 2010, doi: 10.1365/s10337-010-1651-5.
- [111] V. Weingerl, M. Strlic, a D. Kocar, Comparison of methods for determination of polyphenols in wine by HPLC-UV/VIS, LC/MS/MS and spectrophotometry, *Acta Chim Slov*, roč. 56, č. 3, s. 698–703, 2009.
- [112] M. L. C. Passos a M. L. M. F. S. Saraiva, Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies, *Measurement*, roč. 135, s. 896–904, 2019, doi: 10.1016/j.measurement.2018.12.045.
- [113] J.-L. Wolfender, HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue, *Planta Med*, roč. 75, č. 07, s. 719–734, 2009, doi: 10.1055/s-0028-1088393.
- [114] C. Rössle, H. H. Wijngaard, R. T. Gormley, F. Butler, a N. Brunton, Effect of Storage on the Content of Polyphenols of Minimally Processed Skin-On Apple Wedges from Ten Cultivars and Two Growing Seasons, *J Agric Food Chem*, roč. 58, č. 3, s. 1609–1614, 2010, doi: 10.1021/jf903621y.
- [115] R. Martí, M. Valcárcel, J. M. Herrero-Martínez, J. Cebolla-Cornejo, a S. Roselló, Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column, *Food Chem*, roč. 169, s. 169–179, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.151.
- [116] M. Liaudanskas, P. Viškelis, D. Kviklys, R. Raudonis, a V. Janulis, A Comparative Study of Phenolic Content in Apple Fruits, *Int J Food Prop*, roč. 18, č. 5, s. 945–953, 2015, doi: 10.1080/10942912.2014.911311.
- [117] M. Douša, UV/VIS HPLC detektory. Cit: august 2023. [Online]. Dostupné na: http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html
- [118] J. Wysocki a M. W. Dong, Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices, *LCGC North America*, roč. 37, č. 10, s. 750–759, 2019.
- [119] M. Hansen a T. Larsen, Dereplication and Discovery of Natural Products by UV Spectroscopy, v *Bioactive Natural Products*, CRC Press, 2007, s. 221–244. doi: 10.1201/9781420006889.ch8.
- [120] M. Plaza, J. Kariuki, a C. Turner, Quantification of individual phenolic compounds' contribution to antioxidant capacity in apple: A novel analytical tool based on liquid chromatography with diode array, electrochemical, and charged aerosol detection, *J Agric Food Chem*, roč. 62, č. 2, s. 409–418, 2014, doi: 10.1021/jf404263k.
- [121] M. A. Rodríguez-Delgado, S. Malovaná, J. P. Pérez, T. Borges, a F. J. García Montelongo, Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with

- absorbance and fluorimetric detection, *J Chromatogr A*, roč. 912, č. 2, s. 249–257, 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(01)00598-2.
- [122] S. Granica, K. Krupa, A. Klebowska, a A. K. Kiss, Development and validation of HPLC-DAD-CAD-MS3 method for qualitative and quantitative standardization of polyphenols in *Agrimoniae eupatoriae herba* (Ph. Eur), *J Pharm Biomed Anal*, roč. 86, s. 112–122, 2013, doi: 10.1016/j.jpba.2013.08.006.
- [123] J. Santos, M. B. P. P. Oliveira, E. Ibáñez, a M. Herrero, Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby-leaf vegetables during storage, *J Chromatogr A*, roč. 1327, s. 118–131, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2013.12.085.
- [124] J. W. Dolan, How Does It Work? Part V: Fluorescence Detectors, *LCGC North America*, roč. 34, č. 9, s. 710–719, 2016.
- [125] H. Franz a V. Jendreizik, Fluorescence Method Development Handbook . Thermo Fisher Scientific, 2015. Cit: jún 2023. [Online]. Dostupné na: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-70302-Fluorescence-Method-Development-Handbook-AN70302-E.pdf>
- [126] A. Wojdyło, J. Oszmiański, a P. Laskowski, Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties, *J Agric Food Chem*, roč. 56, č. 15, s. 6520–6530, 2008, doi: 10.1021/jf800510j.
- [127] P. Viñas, C. López-Erroz, J. J. Marín-Hernández, a M. Hernández-Córdoba, Determination of phenols in wines by liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection, *J Chromatogr A*, roč. 871, č. 1–2, s. 85–93, 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(99)01087-0.
- [128] A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, J. López-Hernández, P. Ferraces-Casais, a M. A. Lage-Yusty, Analysis of non-anthocyanin phenolic compounds in wine samples using high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection, *J Sep Sci*, roč. 30, č. 9, s. 1262–1266, 2007, doi: 10.1002/jssc.200600489.
- [129] N. Vervoort, D. Daemen, a G. Török, Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography, *J Chromatogr A*, roč. 1189, č. 1–2, s. 92–100, 2008, doi: 10.1016/j.chroma.2007.10.111.
- [130] R. O. Cole *et al.*, HPLC Analysis of Nonvolatile Analytes Using Charged Aerosol Detection, *LCGC North America*, roč. 23, č. 2, s. 150–161, 2005.
- [131] T. Vehovec a A. Obreza, Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector, *J Chromatogr A*, roč. 1217, č. 10, s. 1549–1556, 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2010.01.007.
- [132] M. Swartz, M. Emanuele, A. Awad, A. Grenier, a D. Hartley, An Overview of Corona Charged Aerosol Detection in Pharmaceutical Analysis. Synomics Pharmaceutical Services, LLC, Wareham, 2009. Cit: jún 2023. [Online]. Dostupné na: http://alfresco-static-files.s3.amazonaws.com/alfresco_images/pharma/2014/08/21/6a477436-ba6f-4716-9d67-ebc7e3196fa8/article-636147.pdf

- [133] T. Górecki, F. Lynen, R. Szucs, a P. Sandra, Universal Response in Liquid Chromatography Using Charged Aerosol Detection, *Anal Chem*, roč. 78, č. 9, s. 3186–3192, 2006, doi: 10.1021/ac060078j.
- [134] R. W. Dixon a D. S. Peterson, Development and Testing of a Detection Method for Liquid Chromatography Based on Aerosol Charging, *Anal Chem*, roč. 74, č. 13, s. 2930–2937, 2002, doi: 10.1021/ac011208l.
- [135] Y. Zhang *et al.*, Rapid separation and simultaneous quantitative determination of 13 constituents in Psoraleae Fructus by a single marker using high-performance liquid chromatography with diode array detection, *J Sep Sci*, roč. 40, č. 21, s. 4191–4202, 2017, doi: 10.1002/jssc.201700482.
- [136] S. A. Özkan, LC with Electrochemical Detection. Recent Application to Pharmaceuticals and Biological Fluids, *Chromatographia*, roč. 66, č. S1, s. 3–13, 2007, doi: 10.1365/s10337-007-0223-9.
- [137] C. Wang, J. Xu, G. Zhou, Q. Qu, G. Yang, a X. Hu, Electrochemical Detection Coupled with High-Performance Liquid Chromatography in Pharmaceutical and Biomedical Analysis: A Mini Review, *Comb Chem High Throughput Screen*, roč. 10, č. 7, s. 547–554, 2007, doi: 10.2174/138620707782152362.
- [138] G. Sontag, M. I. Pinto, J. P. Noronha, a H. D. Burrows, Analysis of Food by High Performance Liquid Chromatography Coupled with Coulometric Detection and Related Techniques: A Review, *J Agric Food Chem*, roč. 67, č. 15, s. 4113–4144, 2019, doi: 10.1021/acs.jafc.9b00003.
- [139] P. Kongwong, K. Morozova, G. Ferrentino, P. Poonlarp, a M. Scampicchio, Rapid Determination of the Antioxidant Capacity of Lettuce by an E-Tongue Based on Flow Injection Coulometry, *Electroanalysis*, roč. 30, č. 2, s. 230–237, 2018, doi: 10.1002/elan.201700354.
- [140] P. Ullucci, I. N. Acworth, C. Crafts, B. A. Bailey, a M. Plante, Targeted Analyses of Secondary Metabolites in Herbs, Spices, and Beverages Using a Novel Spectro-Electro Array Platform. Thermo Fisher Scientific, Waltham, 2016. Cit: jún 2023. [Online]. Dostupné na: <https://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/AN-1063-Targeted-Analyses-Metabolites-Sp>
- [141] M. Dvořáková, M. Douanier, M. Jurková, V. Kellner, a P. Dostálek, Comparison of Antioxidant Activity of Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Malt Extracts with the Content of Free Phenolic Compounds Measured by High Performance Liquid Chromatography Coupled with CoulArray Detector, *Journal of the Institute of Brewing*, roč. 114, č. 2, s. 150–159, 2008, doi: 10.1002/j.2050-0416.2008.tb00320.x.
- [142] W. M. A. Niessen, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. CRC Press, 2006. doi: 10.1201/9781420014549.
- [143] W. A. Korfmacher, Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery, *Drug Discov Today*, roč. 10, č. 20, s. 1357–1367, 2005, doi: 10.1016/S1359-6446(05)03620-2.
- [144] X.-G. He, On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic–diode array detection–mass spectrometric techniques, *J Chromatogr A*, roč. 880, č. 1–2, s. 203–232, 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(00)00059-5.

- [145] T. Kind a O. Fiehn, Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry, *Bioanal Rev*, roč. 2, č. 1–4, s. 23–60, 2010, doi: 10.1007/s12566-010-0015-9.
- [146] L. N. Williamson a M. G. Bartlett, Quantitative liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Biomedical Chromatography*, roč. 21, č. 6, s. 567–576, 2007, doi: 10.1002/bmc.844.
- [147] D. A. Volmer a L. L. Jessome, Ion Suppression: A Major Concern in Mass Spectrometry, *LCGC North America*, roč. 24, č. 5, s. 498–510, 2006.
- [148] J. Schuhmacher, D. Zimmer, F. Tesche, a V. Pickard, Matrix effects during analysis of plasma samples by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: practical approaches to their elimination, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, roč. 17, č. 17, s. 1950–1957, 2003, doi: 10.1002/rcm.1139.
- [149] M. J. Avery, Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometric bioanalytical methods, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, roč. 17, č. 3, s. 197–201, 2003, doi: 10.1002/rcm.895.
- [150] J.-P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, a B. Le Bizec, The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis, *Anal Chim Acta*, roč. 529, č. 1–2, s. 129–136, 2005, doi: 10.1016/j.aca.2004.08.055.
- [151] C. Ferrer, A. Lozano, A. Agüera, A. J. Girón, a A. R. Fernández-Alba, Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables, *J Chromatogr A*, roč. 1218, č. 42, s. 7634–7639, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.07.033.
- [152] J. Wu, X. Qian, Z. Yang, a L. Zhang, Study on the matrix effect in the determination of selected pharmaceutical residues in seawater by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography–electrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A*, roč. 1217, č. 9, s. 1471–1475, 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2009.12.074.
- [153] K.-W. Cheng, F. Chen, a M. Wang, Liquid Chromatography–Mass Spectrometry in Natural Product Research, v *Bioactive Natural Products*, London: CRC Press, 2007, s. 246–266.
- [154] F. Sánchez-Rabaneda, O. Jáuregui, R. M. Lamuela-Raventós, F. Viladomat, J. Bastida, a C. Codina, Qualitative analysis of phenolic compounds in apple pomace using liquid chromatography coupled to mass spectrometry in tandem mode, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, roč. 18, č. 5, s. 553–563, 2004, doi: 10.1002/rcm.1370.
- [155] H. Sklenářová, A. Bílková, M. Pechová, a P. Chocholouš, Determination of major phenolic compounds in apples: Part I–Optimization of high-performance liquid chromatography separation with diode array detection, *J Sep Sci*, roč. 41, č. 15, s. 3042–3050, 2018, doi: 10.1002/jssc.201800302.
- [156] Guideline on Bioanalytical Method Validation, Amsterdam, The Netherlands: European Medicines Agency, 2015. Cit: august 2023. [Online]. Dostupné na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

- [157] T. R. Baker a B. T. Regg, A multi-detector chromatographic approach for characterization and quantitation of botanical constituents to enable in silico safety assessments, *Anal Bioanal Chem*, roč. 410, č. 21, s. 5143–5154, 2018, doi: 10.1007/s00216-018-1163-y.
- [158] C. E. Zhang *et al.*, Quality assessment of Astragali Radix from different production areas by simultaneous determination of thirteen major compounds using tandem UV/charged aerosol detector, *J Pharm Biomed Anal*, roč. 165, s. 233–241, 2019, doi: 10.1016/j.jpba.2018.12.015.
- [159] N. R. Mihailović, V. B. Mihailović, S. Kreft, A. R. Ćirić, L. G. Joksović, a P. T. Đurđević, Analysis of phenolics in the peel and pulp of wild apples (*Malus sylvestris* (L.) Mill.), *Journal of Food Composition and Analysis*, roč. 67, s. 1–9, 2018, doi: 10.1016/j.jfca.2017.11.007.
- [160] Z. Liu, K. Ren, Y. Feng, T. Uong, S. Krepich, a H. You, Rapid and Economic Determination of 13 Steviol Glycosides in Market-Available Food, Dietary Supplements, and Ingredients: Single-Laboratory Validation of an HPLC Method, *J Agric Food Chem*, roč. 68, č. 37, s. 10142–10148, 2020, doi: 10.1021/acs.jafc.0c03453.
- [161] T. Bililign, J. C. Moore, S. Tan, a A. T. Leeks, Development and Validation of a Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for Routine Identification and Purity Assessment of High-Purity Steviol Glycoside Sweeteners, *J Agric Food Chem*, roč. 62, č. 6, s. 1384–1389, 2014, doi: 10.1021/jf4047557.
- [162] M. McCullagh, D. Douce, E. Van Hoeck, a S. Gosciny, Exploring the Complexity of Steviol Glycosides Analysis Using Ion Mobility Mass Spectrometry, *Anal Chem*, roč. 90, č. 7, s. 4585–4595, 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b05002.
- [163] M. Molina-Calle, V. Sánchez de Medina, M. P. Delgado de la Torre, F. Priego-Capote, a M. D. Luque de Castro, Development and application of a quantitative method based on LC–QqQ MS/MS for determination of steviol glycosides in Stevia leaves, *Talanta*, roč. 154, s. 263–269, 2016, doi: 10.1016/j.talanta.2016.03.051.
- [164] Y.-H. Wang, B. Avula, W. Tang, M. Wang, M. A. Elsohly, a I. A. Khan, Ultra-HPLC method for quality and adulterant assessment of steviol glycosides sweeteners – Stevia rebaudiana and stevia products, *Food Additives & Contaminants: Part A*, roč. 32, č. 5, s. 674–685, 2015, doi: 10.1080/19440049.2015.1021863.
- [165] M. I. Espinoza, J.-P. Vincken, M. Sanders, C. Castro, M. Stieger, a E. Agosin, Identification, Quantification, and Sensory Characterization of Steviol Glycosides from Differently Processed *Stevia rebaudiana* Commercial Extracts, *J Agric Food Chem*, roč. 62, č. 49, s. 11797–11804, 2014, doi: 10.1021/jf502878k.
- [166] C. Lorenzo, J. Serrano-Díaz, M. Plaza, C. Quintanilla, a G. L. Alonso, Fast methodology of analysing major steviol glycosides from Stevia rebaudiana leaves, *Food Chem*, roč. 157, s. 518–523, 2014, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.02.088.
- [167] B. F. Zimmermann, Beaming steviol glycoside analysis into the next dimension, *Food Chem*, roč. 241, s. 150–153, 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.079.
- [168] B. F. Zimmermann, U. Woelwer-Rieck, a M. Papagiannopoulos, Separation of Steviol Glycosides by Hydrophilic Liquid Interaction Chromatography, *Food Anal Methods*, roč. 5, č. 2, s. 266–271, 2012, doi: 10.1007/s12161-011-9229-x.

- [169] U. Woelwer-Rieck, C. Lankes, A. Wawrzun, a M. Wüst, Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*, *European Food Research and Technology*, roč. 231, č. 4, s. 581–588, 2010, doi: 10.1007/s00217-010-1309-4.
- [170] P. Kubica, J. Namieśnik, a A. Wasik, Comparison of hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the determination of eight artificial sweeteners and common steviol glycosides in popular beverages, *J Pharm Biomed Anal*, roč. 127, s. 184–192, 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2016.01.006.
- [171] J. F. Clos, G. E. DuBois, a I. Prakash, Photostability of Rebaudioside A and Stevioside in Beverages, *J Agric Food Chem*, roč. 56, č. 18, s. 8507–8513, 2008, doi: 10.1021/jf801343e.
- [172] I. Acworth, C. Crafts, a B. Bailey, Sensitive Analysis of Commonly Used Artificial and Natural Sweeteners Including Stevia and Their Impurities and Degradation Products. Cit: august 2023. [Online]. Thermo Fisher Scientific, Chelmsford, MA, USA, 2011. Dostupné na: <http://www.thermoscientific.com/content/dam/tfs/ATG/CMD/CMD%20Documents/Applicati on%20&%20Technical%20Notes/8740>
- [173] A. S. Dacome, C. C. Da Silva, C. E. M. Da Costa, J. D. Fontana, J. Adelman, a S. C. Da Costa, Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods, *Process Biochemistry*, roč. 40, č. 11, s. 3587–3594, 2005, doi: 10.1016/J.PROCBIO.2005.03.035.
- [174] U. Wölwer-Rieck, Analysis of Steviol Glycosides, *Steviol Glycosides: Cultivation, Processing, Analysis and Applications in Food*, U. Wölwer-Rieck, Ed., 1. vyd. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2018, s. 84–112. doi: 10.1039/9781788010559.
- [175] D. Bergs, B. Burghoff, M. Joehnck, G. Martin, a G. Schembecker, Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, roč. 7, č. 2, s. 147–154, 2012, doi: 10.1007/s00003-012-0760-5.
- [176] K. Jaworska, A. J. Krynitsky, a J. I. Rader, Simultaneous Analysis of Steviol and Steviol Glycosides by Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection on a Mixed-Mode Column: Application to Stevia Plant Material and Stevia-Containing Dietary Supplements, *J AOAC Int*, roč. 95, č. 6, s. 1588–1596, 2012, doi: 10.5740/jaoacint.11-435.
- [177] A. Tada *et al.*, Improvement of the Assay Method for Steviol Glycosides in the JECFA Specifications, *Am J Analyt Chem*, roč. 04, č. 04, s. 190–196, 2013, doi: 10.4236/ajac.2013.44024.
- [178] M. Jamaluddin Ahmed a R. M. Smith, Determination of stevioside by high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection, *J Sep Sci*, roč. 25, č. 3, s. 170–172, 2002, doi: 10.1002/1615-9314(20020201)25:3<170::AID-JSSC170>3.0.CO;2-W.
- [179] D. Hurum a J. Rohrer, Steviol Glycoside Determination by HPLC with Charged Aerosol and UV Detections Using the Acclaim Trinity P1 Column. Cit: august 2023. [Online]. Thermo Fisher Scientific, 2016. Dostupné na: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Application-Notes/AN-293-LC-Steviol-Glycoside-LPN2976-EN.pdf>

- [180] M. Hollá *et al.*, Metodika pro kvalitativní hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka. Certifikovaná metodika, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2019, ISBN 978-80-906644-4-9.
- [181] L. C. da Silva *et al.*, Recent advances and trends in extraction techniques to recover polyphenols compounds from apple by-products, *Food Chem X*, roč. 12, s. 100133, 2021, doi: 10.1016/j.fochx.2021.100133.
- [182] A. Weremfo, F. Adulley, K. Dabie, S. Abassah-Oppong, a E. Peprah-Yamoah, Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from turkey berry (*Solanum torvum* Sw) fruits using response surface methodology, *J Appl Res Med Aromat Plants*, roč. 30, s. 100387, 2022, doi: 10.1016/j.jarmap.2022.100387.
- [183] F. Brahmi *et al.*, Optimization of the conditions for ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. flowers and comparison with conventional procedures, *Ind Crops Prod*, roč. 184, s. 114977, 2022, doi: 10.1016/j.indcrop.2022.114977.
- [184] N. Abderrezag *et al.*, One-step sustainable extraction of Silymarin compounds of wild Algerian milk thistle (*Silybum marianum*) seeds using Gas Expanded Liquids, *J Chromatogr A*, roč. 1675, s. 463147, 2022, doi: 10.1016/j.chroma.2022.463147.
- [185] W. Wojnowski, M. Tobiszewski, F. Pena-Pereira, a E. Psillakis, AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, roč. 149, s. 116553, 2022, doi: 10.1016/j.trac.2022.116553.
- [186] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, a M. Tobiszewski, AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software, *Anal Chem*, roč. 92, č. 14, s. 10076–10082, 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c01887.
- [187] AGREE Analytical Greenness Calculator. Cit: august 2023. [Online]. Dostupné na: <https://cdn.mostwiedzy.pl/f1/43/4d/a3>

6. VÝSTUPY KANDIDÁTKY

6.1. Publikácie zahrnuté v dizertačnej práci

I. **Hollá M.**, Pilařová V., Švec F., Sklenářová H.

Green Solvents in the Extraction of Bioactive Compounds from Dried Apple Cultivars

Foods, 2023, vol. 12, p. 893, **IF₂₀₂₃ 5.52, Q1 (IF), Q2 (AIS)**

Podiel autorky = 50 %: metodológia, experimentálna práca, spracovanie dát, príprava publikácie

II. **Hollá M.**, Šatínský D., Švec F., Sklenářová H.

UHPLC coupled with charged aerosol detector for rapid separation of steviol glycosides in commercial sweeteners and extract of Stevia rebaudiana

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2022, vol. 207, p. 11439, **IF₂₀₂₂ 3.4, Q2 (IF), Q2 (AIS)**

Podiel autorky = 70 %: experimentálna práca, spracovanie dát, príprava publikácie

III. **Hollá M.**, Bílková A., Jakubec P., Košková S., Kočová Vlčková H., Šatínský D., Švec F., Sklenářová H.

Benefits and Pitfalls of HPLC Coupled to Diode-Array, Charged Aerosol, and Coulometric Detections: Effect of Detection on Screening of Bioactive Compounds in Apples

Molecules, 2021, vol. 26, p. 3246, **IF₂₀₂₁ 4.927, Q3/Q2 (IF), Q3 (AIS)**

Podiel autorky = 70 %: konceptualizácia, experimentálna práca, spracovanie dát, príprava publikácie

IV. **Hollá M.**, Sklenářová H., Chocholouš P., Adamcová A., Košková S., Šmídová B., Bílková A., Nekvindová V., Suran P.

Metodika pro kvalitativní hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka

Certifikovaná metodika, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, ID 45848/2019-MZE-18140, 2019, ISBN 978-80-906644-4-9.

Podiel autorky = 60 %: experimentálna práca, spracovanie dát, príprava metodiky

6.2. Publikácie nezahrnuté v dizertačnej práci

I. Adamcová A., Šatínský D., Zatrochová S., **Hollá M.**, Šírová K., Šilhavá K.

Metodika pro identifikaci a detekci bioaktivních látek v rostlinných částech ovocných stromů a odpadní biomase

Certifikovaná metodika, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2021, ISBN 978-80-906644-7-0

II. Bílková A., Vávra R., **Hollá M.**, Sklenářová H., Chocholouš P., Dvořáková R., Horna A., Eichlerová E.

Metodika stanovení hlavních fenolických sloučenin v genotypch jabloní s ohledem na různé podmínky skladování

Certifikovaná metodika, Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o., ID 4034/2019-MZE-17222, 2018, ISBN 978-80-87030-68-4.

6.3. Prezentácie výsledkov

Česká chromatografická škola - HPLC 2021, posterová prezentácia, Zaječí, 2021

Hollá M., Kholová, A., Sklenářová H., Šatínský D.

Application of CO₂ enriched fluids for extraction of polar phenolic compounds

Česká chromatografická škola - HPLC 2021, posterová prezentácia, Zaječí, 2021

Hollá M., Šatínský D., Sklenářová H., Švec, F.

UHPLC coupled with charged aerosol detector for rapid separation of steviol glycosides in commercial sweeteners and extract of *Stevia rebaudiana*

10th Postgraduate and Postdoc Conference, ústna prezentácia, Hradec Králové, 2021

Hollá M., Kholová, A., Sklenářová H., Šatínský D.

The development of extraction method using supercritical fluids

Škola hmotnostní spektrometrie, posterová prezentácia, Srní, 2020

Hollá M., Sklenářová H., Šatínský D.

Stanovenie stéviových glykozidov v potravinových doplnkoch a rastlinných extraktoch

9th Postgraduate and Postdoc Conference, ústna prezentácia, Hradec Králové, 2020

Hollá M., Kholová, A., Sklenářová H., Šatínský D.

Monitoring influence of pesticide spray on antioxidants in apricots

8th Postgraduate and Postdoc Conference, ústna prezentácia, Hradec Králové, 2019

Hollá M., Sklenářová H., Šatínský D.

Detection techniques for analysis of phenolic compounds in apples

Česká chromatografická škola - HPLC 2019, posterová prezentácia, Zaječí, 2019

Hollá M., Sklenářová H., Šatínský D.

Detection techniques for analysis of phenolic compounds in matrix rich apple fruit samples

2nd Food Chemistry Conference, posterová prezentácia, Seville, Španielsko, 2019

Hollá M., Sklenářová H., Šatínský D.

Evaluation of phenolic compounds content in apples – correlation of results from HPLC separation and DPPH assay

VITATOX, ústna prezentácia, Dvůr Králové nad Labem, 2019

Hollá M., Bílková, A., Sklenářová H., Šatínský, D.

Stanovenie fenolických profilov novošľachtených odrôd jabloní

Ingrový Dny, posterová prezentácia, Brno, 2019

Bílková, A., Hollá M., Sklenářová H.

Monitoring vybraných fenolických sloučenin v plodech jabloní s ohledem na podmínky skladování

7th Postgraduate and Postdoc Conference, ústna prezentácia, Hradec Králové, 2018

Hollá M., Sklenářová H., Šatínský D.

Separation behavior of selected phenolic analytes

Ingrový Dny, posterová prezentácia, Brno, 2018

Hollá M., Bílková, A., Sklenářová H.

Porovnanie fenolického profilu vybraných jablčných odrôd

International Symposium on Separation Science, posterová prezentácia, Jasná, 2018

Hollá M., Sklenářová H., Bílková, A., Šatínský, D.

Comparison of phenolic profiles in selected new and old apple cultivars

International Nutrition and Diagnostic Conference, posterová prezentácia, Praha, 2018

Hollá M., Bílková, A., Sklenářová H., Švecová, B., Šatínský D.

Comparing antioxidant content in apple cultivars via HPLC-ECD method

6.4. Stáže a projekty

Grantová agentura Univerity Karlovy, hlavný riešiteľ projektu 1466119

Development of on-line SPE coupled to UHPLC-DAD separation and off-line SFE in connection with UHPLC-DAD-CAD/ SFC-UV-MS separation for rapid evaluation of phenolic compounds in fruit samples (2019 – 2021)

Grantová agentura České republiky, spoluriešiteľ projektu 20-19297S

Nanofibrous polymers with restricted access materials functionality for the on-line chromatographic extraction of complex samples (2020 – 2023)

Technologická agentura ČR, spoluriešiteľ projektu TJ02000196

Research using of fruit tree waste as a source of valuable bioactive substances (2019 – 2021)

Technologická agentura ČR, spoluriešiteľ projektu TJ01000151

Monitoring of compounds with benefits in fruits and its processed products with respect to the human health and children nutrition (2017 – 2019)

Stáž na University of Granada, Faculty of sciences, Department of Analytical Chemistry,

výskumná skupina prof. Ana María García Campaña, Granada, Španielsko (september – december 2021)

- 3-mesačná stáž programu Erasmus, vývoj elektroforetickej metódy pre stanovenie vybraných pesticídov v potravinových matriciach

Stáž na Univerzite Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytickej chémie,

Stáž pod vedením Ing. Blanky Švecovej, PhD., Pardubice (2018)

- dvojtzáždňová stáž za účelom získania teoretických z a praktických zručností pre využitie CD detekcie na stanovenie antioxidačnej aktivity vo vzorkách

Stáž vo Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holovousy s.r.o.

Stáž pod vedením RNDr. Anety Bílkové, Holovousy (2017 – 2020)

- opakované návštevy za účelom spracovania ovocných vzoriek, prevedenia meraní s využitím CD detekcie a stanovenia antioxidačnej aktivity pomocou testov DPPH

7. PRÍLOHY

Zoznam publikačných príloh

Príloha č.1:

Hollá M., Bílková A., Jakubec P., Košková S., Kočová Vlčková H., Šatínský D., Švec F., Sklenářová H. Benefits and Pitfalls of HPLC Coupled to Diode-Array, Charged Aerosol, and Coulometric Detections: Effect of Detection on Screening of Bioactive Compounds in Apples. *Molecules*, 2021, vol. 26, p. 3246.

Príloha č.2:

Hollá M., Šatínský D., Švec F., Sklenářová H. UHPLC coupled with charged aerosol detector for rapid separation of steviol glycosides in commercial sweeteners and extract of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, vol. 207, p. 11439.

Príloha č. 3:

Hollá M., Pilařová V., Švec F., Sklenářová H. Green Solvents in the Extraction of Bioactive Compounds from Dried Apple Cultivars. *Foods*, 2023, vol. 12, p. 893.

Príloha č. 4:

Hollá M., Sklenářová H., Chocholouš P., Adamcová A., Košková S., Šmídová B., Bílková A., Nekvindová V., Suran P. Metodika pro kvalitativní hodnocení ovoce a zpracovatelských produktů z hlediska obsahu látek prospěšných pro zdraví člověka. Certifikovaná metodika, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, ID 45848/2019-MZE-18140, 2019, ISBN 978-80-906644-4-9.