

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

Diplomová práce

**HPLC v kontrole kvality doplňků stravy na bázi zlatobýlu  
a s obsahem rutinu a kyseliny chlorogenové**

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

**Hradec Králové 2024**

**Klára Kotyková**

**Prohlášení**

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

**Poděkování**

Velmi ráda bych poděkovala panu prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému Ph.D. za jeho vedení, odborné rady a vstřícný přístup v průběhu vypracování mé diplomové práce.

## **ABSTRAKT**

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**

**Kandidát:** Klára Kotyková

**Školitel:** prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

**Název diplomové práce:** HPLC v kontrole kvality doplňků stravy na bázi zlatobýlu a s obsahem rutinu a kyseliny chlorogenové

V rámci této diplomové práce byla vyvinuta a validována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) pro separaci a stanovení kyseliny chlorogenové, kyseliny 3,5-dikafeoylchinové, rutinu, quercetinu a kaempferolu. Tato metoda byla následně aplikována pro analýzu doplňků stravy na bázi zlatobýlu: kapek Celík zlatobýl (Valdemar Grešík), Celík obecný BIO (Bylinné kapky), Celík obecný (Bylinné kapky), Zlatobýl obecný (Green Idea), Zlatobýl – tinktura z pupenů (Serafin), Zlatobýl – tinktura z bylin (Serafin), Zlatobýlová směs (Dědek kořenář), Zlatobýl (Inca Botanica) a tobolek Celík (Ex Herbis). Dále byly analyzovány dva doplňky stravy obsahující samotný rutin od firem Solgar a Walmark® a doplněk stravy Zelená káva (Botanic) obsahující kyselinu chlorogenovou.

K analýze byla vybrána kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm s částicemi o velikosti 2,7 μm. Byla využita gradientová eluce s mobilní fází acetonitril/0,085% kyselina fosforečná. Detekce byla provedena detektorem diodového pole při vlnových délkách 325 nm (kyselina chlorogenová, kyselina 3,5-dikafeoylchinová) a 360 nm (rutin, quercetin a kaempferol). Analýza probíhala při teplotě 30 °C a rychlosti průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min.

**Klíčová slova:** HPLC, zlatobýl, rutin, kyselina chlorogenová, kyselina 3,5-dikafeoylchinová, quercetin, kaempferol, doplňky stravy

## **ABSTRACT**

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Analytical Chemistry**

**Candidate:** Klára Kotyková

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

**Title of the diploma thesis:** HPLC in quality control of food supplements based on goldenrod and containing rutin and chlorogenic acid

In this diploma thesis, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed and validated for the separation and determination of chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, rutin, quercetin, and kaempferol. This method was applied to the analysis of food supplements based on goldenrod: drops Celík zlatobýl (Valdemar Grešík), Celík obecný BIO (Bylinné kapky), Celík obecný (Bylinné kapky), Zlatobýl (Green Idea), Zlatobýl – tinktura z pupenů (Serafin), Zlatobýl – tinktura z bylin (Serafin), Zlatobýlová směs (Dědek kořenář), Zlatobýl (Inca Botanica), and capsules Celík (Ex Herbis). Furthermore, two food supplements containing rutin (Solgar and Walmark®) and a food supplement Zelená káva (Botanic) containing chlorogenic acid were analyzed.

An Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 × 4.6 mm column with 2.7 μm particles was selected for analysis. A gradient elution with a mobile phase of acetonitrile/0.085% phosphoric acid was used. Detection was performed with a diode array detector at wavelengths of 325 nm (chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid) and 360 nm (rutin, quercetin, and kaempferol). The analysis was carried out at a temperature of 30 °C and a flow rate of the mobile phase of 1.0 ml/min.

**Keywords:** HPLC, goldenrod, rutin, chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, quercetin, kaempferol, food supplements

## OBSAH

Seznam použitých zkratek .....	8
1 Úvod .....	9
2 Cíl a zadání práce .....	10
3 Teoretická část .....	11
3.1 Doplnky stravy .....	11
3.2 Zlatobýl .....	11
3.3 Zlatobýl obecný .....	12
3.3.1 Charakteristika .....	12
3.3.2 Obsahové látky .....	12
3.3.3 Účinky a použití .....	13
3.4 Rutin .....	14
3.4.1 Charakteristika .....	14
3.4.2 Účinky .....	15
3.5 Kyselina chlorogenová .....	16
3.5.1 Charakteristika .....	16
3.5.2 Účinky .....	17
3.6 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	17
3.6.1 Instrumentace v HPLC .....	18
3.7 Rešerše stanovení vybraných flavonoidů a fenolických kyselin .....	20
4 Experimentální část .....	22
4.1 Použité přístroje a pomůcky .....	22
4.1.1 Chromatografický systém .....	22
4.1.2 Testované kolony .....	22
4.1.3 Pomůcky .....	23
4.2 Použité chemikálie .....	23
4.2.1 Standardy .....	23
4.2.2 Rozpouštědla .....	23
4.3 Doplnky stravy .....	24
4.4 Příprava mobilní fáze .....	24
4.5 Příprava roztoků .....	24
4.5.1 Příprava rozpouštědla pro standardy a vzorky .....	24
4.5.2 Příprava zásobních roztoků standardů pro optimalizaci a validaci metody .....	24
4.5.3 Příprava pracovních roztoků standardů .....	25

4.5.4	Příprava roztoků pro kalibraci a opakovatelnost .....	26
4.5.5	Příprava roztoků pro správnost.....	26
4.5.6	Příprava roztoků pro přesnost.....	26
4.5.7	Příprava roztoku pro test vhodnosti chromatografického systému .....	27
4.6	Příprava analyzovaných vzorků .....	27
4.7	Parametry měření .....	27
5	Výsledky a diskuze .....	28
5.1	Vývoj analytické metody, optimalizované parametry.....	28
5.1.1	Volba vlnové délky.....	28
5.1.2	Volba kolony a gradientu.....	30
5.1.3	Volba složení mobilní fáze .....	40
5.1.4	Volba teploty .....	42
5.2	Validace vyvinuté metody .....	45
5.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému .....	45
5.2.2	Linearita.....	45
5.2.3	Opakovatelnost .....	51
5.2.4	Správnost.....	51
5.2.5	Přesnost.....	54
5.3	Stanovení vzorků .....	55
5.3.1	Hmotnost obsahu tobolek/tablet vybraných doplňků stravy .....	55
5.3.2	Stanovení obsahu doplňků stravy se zlatobýlem .....	56
5.3.3	Stanovení obsahu doplňků stravy s rutinem.....	59
5.3.4	Stanovení obsahu doplňků stravy se zelenou kávou.....	60
5.3.5	Vyhodnocení kvality doplňků stravy .....	60
5.3.6	Porovnání celkové koncentrace analyzovaných látek v kapkách se zlatobýlem s cenou doplňku stravy.....	61
6	Závěr.....	62
7	Použitá literatura.....	64

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$A_s$	faktor symetrie
ACN	acetonitril
AST	astragalin
BMI	Body Mass Index (index tělesné hmotnosti)
DAD	Diode array detector (detektor diodového pole)
DIK	kyselina 3,5-dikafeoylchinová
HPLC	High-performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
CHLO	kyselina chlorogenová
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii)
k	kapacitní faktor
KAE	kaempferol
MeOH	methanol
MS	Mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
QUE	quercetrin
QUI	quercitrin
$R_s$	rozlišení píků
RSD	relativní směrodatná odchylka
RUT	rutin
SD	směrodatná odchylka
$t_r$	retenční čas
UV	ultraviolet (ultrafialový)
$W_{50}$	šířka v polovině píku



## 1 ÚVOD

Doplňky stravy jsou zvláštní kategorií potravin, které mají doplňovat běžnou stravu o vitaminy, minerály a další látky s nutričním či fyziologickým účinkem. Jejich velkou nevýhodou je, že u nich není posuzována účinnost ani kontrola obsahu látek. Mají příznivě ovlivňovat zdravotní stav spotřebitele, nicméně nejsou určeny k léčbě nebo prevenci onemocnění [1].

Zlatobýl obecný je vytrvalá rostlina, která se pro své účinky na lidské zdraví často používá ve formě různých doplňků stravy. Známý je především jeho příznivý vliv na močové cesty, uplatnění nachází ale i v mnoha dalších oblastech. Obsahuje řadu farmakologicky zajímavých látek, například flavonoidy, fenolické kyseliny či saponiny [2].

Rutin je flavonoid vyskytující se ve více než sedmdesáti různých druzích rostlin. Mimo jiné působí antioxidačně, protizánětlivě a antimikrobně [3]. Kyselina chlorogenová je polyfenolická sloučenina, která je ve velkém množství obsažena především v zelené kávě. Vykazuje například antioxidační, antibakteriální, protizánětlivé a neuroprotektivní vlastnosti. Kromě toho hraje zásadní roli v regulaci metabolismu tuků a glukózy, čímž může být prospěšná v léčbě kardiovaskulárních onemocnění, diabetu, jaterní steatózy či obezity [4].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je separační analytická metoda, která nachází široké uplatnění jak ve výzkumu, tak v rutinním použití v různých analytických laboratořích. Principem HPLC je rozdílná distribuce látek mezi dvě nemísitelné fáze – pohyblivou mobilní fází a nepohyblivou stacionární fází, v jejímž důsledku dochází k separaci unášených látek [5]. Tato práce se zabývá vývojem a validací nové HPLC metody, která separuje a stanovuje současně kyselinu chlorogenovou, kyselinu 3,5-dikafeoylchinovou, rutin, quercetin a kaempferol. Metoda byla následně využita pro analýzu obsahu těchto látek ve vybraných doplňcích stravy.

## **2 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE**

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a validovat novou HPLC metodu pro stanovení kyseliny chlorogenové, kyseliny 3,5-dikafeoylchinové, rutinu, quercetinu a kaempferolu. Dále bylo úkolem stanovit obsah zmiňovaných látek v devíti doplňcích stravy na bázi zlatobýlu, testovány byly i dva přípravky obsahující samotný rutin a jeden doplněk stravy se zelenou kávou, u kterého výrobce deklaroval obsah kyseliny chlorogenové.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Doplnky stravy

Doplnky stravy představují zvláštní kategorii potravin, které mají za cíl doplňovat běžnou stravu. Jedná se o koncentrované zdroje vitaminů, minerálů a dalších látek s nutričním nebo fyziologickým účinkem [6]. Na rozdíl od léčivých přípravků jim výrobce nesmí přisuzovat preventivní či léčebné vlastnosti [1,7]. Na obalu, případně v reklamě může výrobce použít pouze zdravotní tvrzení schválená Evropskou komisí. Tato tvrzení jsou založena na všeobecně uznávaných vědeckých poznatcích a dělí se na funkční zdravotní tvrzení, tvrzení o snižování rizika onemocnění a tvrzení týkající se vývoje a zdraví dětí [8]. Před vstupem na trh má výrobce notifikační povinnost vůči Ministerstvu zemědělství, kam zasílá text české etikety daného doplňku stravy. Na obalu musí být uvedeno označení „doplňek stravy“. Účinnost doplňku stravy před uvedením na trh nemusí být ověřována [1,6]. Kontrola obsahu biologicky aktivních látek také není legislativou vyžadována. Na trhu v ČR, v lékárnách, drogeriích, specializovaných obchodech a zejména na internetu, se objevuje značné množství doplňků stravy a jejich nárůst je v posledních letech téměř exponenciální. To platí také pro doplňky stravy na bázi koncentrovaných rostlinných extraktů.

#### 3.2 Zlatobýl

Rod zlatobýl (*Solidago*) zahrnuje mnoho druhů vytrvalých rostlin pocházejících většinou ze Severní Ameriky. Taxonomicky se tento rod řadí do čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*). Na evropském kontinentu se vyskytuje pět druhů zlatobýlu – zlatobýl obecný (*Solidago virgaurea*), zlatobýl kanadský (*S. canadensis*), zlatobýl obrovský (*S. gigantea*), zlatobýl vysoký (*S. altissima*) a zlatobýl trávolistý (*S. graminifolia*). V Evropě je nejvíce používán zlatobýl obecný, a to především pro své prospěšné působení v oblasti ledvin a močových cest. Zlatobýl obecný je jediný původní druh v České republice, rostou zde ale i některé nepůvodní zlatobýly – především zlatobýl kanadský a zlatobýl obrovský, které patří mezi invazivní druhy [9–11]. Český lékopis rozlišuje dvě drogy získané ze zlatobýlu – *Solidaginis herba* získanou ze zlatobýlu kanadského nebo zlatobýlu obrovského a *Solidaginis virgaureae herba* ze zlatobýlu obecného [12,13].

### 3.3 Zlatobýl obecný

#### 3.3.1 Charakteristika

Zlatobýl obecný (*Solidago virgaurea*), též nazýván celík zlatobýl, je vytrvalá, 80 cm až 1 m vysoká rostlina. Má přímou lodyhu, která na vrcholu nese četné žluté úbory, 7–8 cm dlouhé, uspořádané v hroznu nebo v latě. Přízemní listy mají obvejčitý tvar, lodyžní listy jsou vejčité až eliptické až kopinaté a z obou stran lehce ochlupené. Plodem této rostliny jsou nažky s chmýrem. Podoba zlatobýlu je znázorněna na obrázku 1 [14]. Zlatobýl obecný se vyskytuje na severní polokouli, především v mírném pásu. Roste v listnatých, jehličnatých i smíšených lesích, také na mýtinách a okrajích lesů. Kvete od července do září [2,10,13,15].



Obrázek 1: Ilustrovaný obrázek *Solidago virgaurea* [14]

#### 3.3.2 Obsahové látky

Zlatobýl obecný obsahuje velké množství farmakologicky zajímavých látek. Důležitou skupinou jsou flavonoidy, které tvoří přibližně 1,5 % vysušené drogy [16]. Mezi nejvíce zastoupené patří rutin, quercetrin, astragalin, isoquercetin a kaempferol. Flavonoidy se zde vyskytují jak ve formě glykosidů, tak i ve formě samotných aglykonů [9,10]. Ve zlatobýlu jsou obsaženy i některé anthokyany [9,16]. Další významnou skupinou jsou fenolické glykosidy – leiokarposid a virgaureosid A. [9,17]. Obsaženy jsou i fenolické kyseliny, mezi nejvýznamnější patří deriváty kyseliny kafeoylchinové (například kyselina chlorogenová), dále pak kyselina kávová, ferulová, sinapová nebo kyselina homovanilová [9,16]. Zastoupeny jsou i saponiny, konkrétně triterpenické saponiny oleananového typu [16]. Podle studie [18] se ve zlatobýlu vyskytuje i zástupce kumarinů – umbeliferon (3-hydroxykumarin). Rostlina obsahuje také malé

množství silice, která je tvořena celou řadou látek, především terpenoidy. V největším množství se vyskytují  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, germakren-D, myrcen, limonen a sabinen [19]. Dalšími obsahovými látkami jsou polysacharidy [9].

### 3.3.3 Účinky a použití

Zlatobýl obecný má řadu využití v tradiční medicíně. Používá se zejména k léčbě zánětů ledvin a močových cest. Ve formě různých směsí nachází využití při léčbě nachlazení a revmatických potíží. Uplatňuje se i v dermatologii, kde podporuje léčbu ran a ekzémů. V neposlední řadě pomáhá ženám ztlumit silné menstruační krvácení [2,10].

Léčivé účinky zlatobýlu byly studovány v řadě pracích. Zlatobýl vykazuje například antioxidační vlastnosti. Hlavní látkou, zodpovědnou za tento účinek, je kyselina 3,5-dikafeoylchinová. Další látkou s tímto účinkem je kyselina chlorogenová. Obecně mají vyšší antioxidační potenciál kyseliny dikafeoylchinové než kyseliny monokafeoylchinové. Schopnost zhaset kyslíkové radikály mají i deriváty quercetinu [20].

Zlatobýl obecný působí také protizánětlivě. Za tuto vlastnost odpovídá více látek – triterpenické saponiny, fenolický glykosid leiokarposid, rutin a quercetin [9]. Významný efekt mají i kafeoylchinové kyseliny, z nichž nejlepších výsledků dosahuje kyselina 3,4,5-trikafeoylchinová. Ve studii *in vivo* dosahovala její protizánětlivá aktivita 88 % protizánětlivé aktivity indometacinu [21].

Zlatobýlu jsou dále připisovány i analgetické účinky. Ve studii [22] byla zkoumána schopnost vazby různých rostlinných extraktů ke třem receptorům zodpovědným za zprostředkování bolesti – k receptorům pro bradykinin, neurokinin 1 a CGRP (calcitonin gene related peptide). Bylo prokázáno, že látky obsažené ve zlatobýlu se váží k receptoru pro bradykinin. Nicméně po přidání polyvinylpyrrolidonu, který slouží k odstranění taninů a dalších polyfenolických látek, jež se na receptor vážou pouze nescificky, tento účinek značně klesá. Proto autoři spekulují, zda je vazba způsobena specifickou vazbou určité polyfenolické sloučeniny, nebo pouze nescifickou vazbou taninů. Analgeticky působí i leiokarposid, který v testu horkého talíře (hot plate test – test reakce na bolest u zvířat) uskutečňovaném na myších v první hodině vykazoval podobné výsledky jako aminofenazon, ve druhé hodině však účinky téměř vymizely [16].

U zlatobýlu obecného byl pozorován také spasmolytický efekt. V *in vitro* experimentu prováděném na hladké střevní svalovině morčete dosahovala spasmolytická aktivita necelých

15 % účinku papaverinu. Za tento účinek jsou pravděpodobně zodpovědné flavonoidy quercetin a kaempferol [16].

Zásadní účinky má zlatobýl v oblasti močové soustavy. Důležitý je diuretický efekt, který bývá připisován flavonoidům, především quercetinu a jeho derivátům. Kromě flavonoidů působí diureticky i leiokarpoid, avšak pouze ve formě glykosidu, samotná kyselina leiokarpová tento účinek nemá [9,16]. Zlatobýl působí prospěšně i v oblasti močového měchýře, využívá se například k léčbě hyperaktivního močového měchýře. Mechanismus účinku spočívá jak v inhibici kontrakce zprostředkované muskarinovými receptory, tak v nesespecifickém působení zlatobýlového extraktu [23].

Zkoumán byl také antibakteriální efekt zlatobýlu proti bakteriím nacházejícím se v urogenitálním traktu – *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*. Testován byl jak extrakt samotného zlatobýlu obecného, tak směs zlatobýlu obecného se škumpou vonnou, medvědicí lékařskou a pampeliškou lékařskou. Zlatobýl obecný působí antibakteriálně proti zmiňovaným bakteriím, nicméně efekt směsi byl významně vyšší [16].

V rámci snahy objevit nové antifungální látky bylo zjištěno, že deacylované triterpenické saponiny získané ze zlatobýlu obecného vykazují antimikrobiální aktivitu proti několika kvasinkám rodu *Candida*. Další studie potom prokázala antimykotickou aktivitu zlatobýlového extraktu proti několika dermatofytům [16].

Zajímavé jsou také antidiabetické a hypolipidemické účinky. Za těmito efekty nejspíše stojí antioxidační schopnost obsažených látek a schopnost těchto látek obnovovat  $\beta$ -buňky Langerhansových ostrůvků [24].

Podle dalších studií látky obsažené ve zlatobýlu obecném působí také protirakovinně a antimutageně. Jiné práce potom zlatobýlu přisuzují kardioprotektivní a hypotenzní efekt [9].

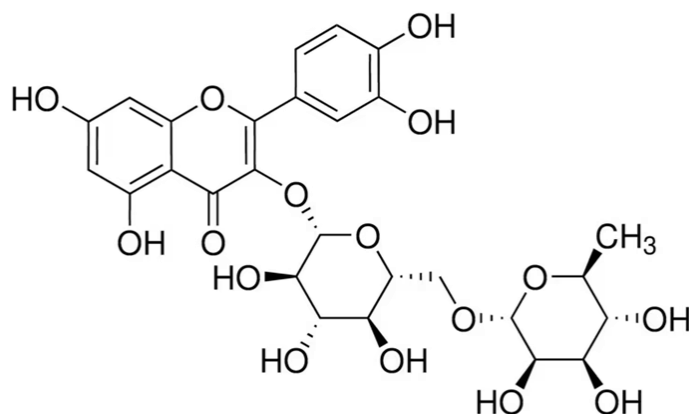
### **3.4 Rutin**

#### **3.4.1 Charakteristika**

Rutin je flavonoid vyskytující se ve více než sedmdesáti různých druzích rostlin. Jeho jméno pochází z latinského názvu routy vonné (*Ruta graveolens*), ve které se hojně vyskytuje. Poprvé byl objeven v pohance, dále je obsažen například v meruňkách, třešních, švestkách, grepech nebo pomerančích. Největší obsah (až 1,5 %) dosahuje v již zmiňované routě vonné, dále v jerlínu japonském, marantě běložilnaté či eukalyptu.

Patří mezi flavonoidy, což jsou nízkomolekulární polyfenolické látky s mnoha zdraví prospěšnými účinky. V rámci flavonoidů se řadí mezi takzvané flavonoly. Jinak se nazývá také rutosid, quercetin-3-rutinosid nebo sophorin. Bývá také označován jako vitamin P.

Po chemické stránce se jedná o glykosid skládající se z aglykonu quercetinu a disacharidu rutinosy (rhamnosa a glukosa) [3]. Chemický vzorec [25] a další vlastnosti rutinu [26] jsou uvedeny na obrázku a v tabulce níže.



Obrázek 2: Chemická struktura rutinu [25]

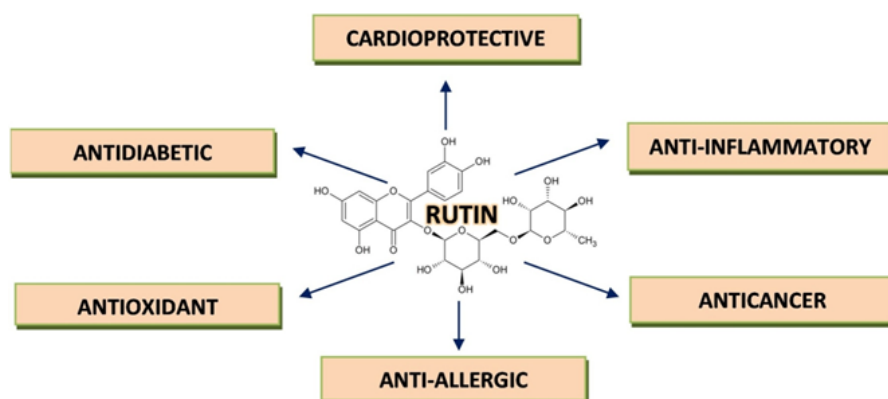
Tabulka 1: Základní fyzikální a chemické vlastnosti rutinu [26]

<b>sumární vzorec</b>	$C_{27}H_{30}O_{16}$
<b>molární hmotnost</b>	610,5 g/mol
<b>teplota tání</b>	125 °C
<b>rozpuštnost ve vodě</b>	125 mg/l
<b>skupenství</b>	pevné

### 3.4.2 Účinky

Rutin vykazuje celou řadu farmakologicky významných účinků, některé z nich jsou vyobrazeny na obrázku 3. Je to důležitý antioxidant, dále působí protizánětlivě, antiartriticky, antibakteriálně, anthelminticky a antifungálně. Vykazuje také antidiabetický, neuroprotektivní, kardioprotektivní, nefroprotektivní, hepatoprotektivní a hematoprotektivní efekt. Může působit i proti rakovině a testikulární toxicitě [3]. Dále byly objeveny jeho analgetické, antihypercholesterolemické, antiobezitické, antiulcerózní, antiastmatické a antiosteoporotické účinky. Uplatnění může mít i v oftalmologii, kde působí proti šedému zákalu a zvýšenému očnímu tlaku. Díky svému metabolitu quercetinu vykazuje diuretický efekt. Má pozitivní vliv na kůži, kterou chrání proti UV záření, stárnutí a pomáhá v boji

s atopickou dermatitidou. Navíc může působit i proti vypadávání vlasů. V neposlední řadě příznivě ovlivňuje imunitní systém [27,28].



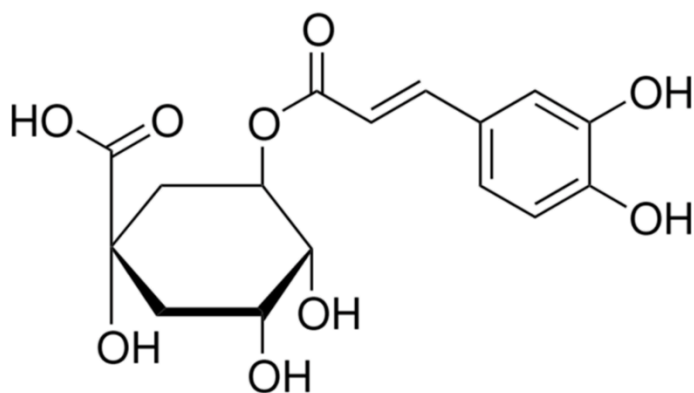
Obrázek 3: Vybrané farmakologické účinky rutinu [28]

### 3.5 Kyselina chlorogenová

#### 3.5.1 Charakteristika

Kyselina chlorogenová je polyfenolická sloučenina, jedná se o ester kyseliny kávové a kyseliny chinové, viz obrázek 4 [29]. V literatuře se vyskytují další dvě označení této látky – kyselina 3-kafeoylchinová a kyselina 5-kafeoylchinová. Častěji se užívá starší název kyselina 3-kafeoylchinová, přestože podle aktuálních pravidel IUPAC by se tato sloučenina měla nazývat druhým zmiňovaným názvem [4].

Bohatým zdrojem kyseliny chlorogenové je zelená káva, což je káva, která nebyla pražena [30]. Kromě zelené kávy se kyselina chlorogenová vyskytuje i v dalších rostlinách, například v bramborách, jahodách, jablcích a borůvkách [4,31]. Základní vlastnosti kyseliny chlorogenové jsou vyobrazeny v tabulce 2.



Obrázek 4: Chemická struktura kyseliny chlorogenové [29]



Tabulka 2: Základní fyzikální a chemické vlastnosti kyseliny chlorogenové [32]

<b>sumární vzorec</b>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>
<b>molární hmotnost</b>	354,3 g/mol
<b>teplota tání</b>	205 –209 °C
<b>rozpustnost ve vodě</b>	40 000 mg/l
<b>skupenství</b>	pevné

### 3.5.2 Účinky

Kyselina chlorogenová je hlavní účinnou složkou zelené kávy, která se ve formě různých doplňků stravy těší velké popularitě. Známa je především pro své účinky při hubnutí. V literatuře se uvádí, že konzumace extraktu zelené kávy vede ke snížení hmotnosti, BMI a obvodu pasu [33]. Kyselina chlorogenová má antidiabetické účinky a pozitivně působí i na metabolismus lipidů, čímž může být prospěšná v léčbě kardiovaskulárních onemocněních či jaterní steatózy. Dále má antioxidantní a protizánětlivý potenciál [4,34]. Ve studii [35] byla prokázána schopnost kyseliny chlorogenové významně snižovat krevní tlak u pacientů se středním stupněm hypertenze. Kyselina chlorogenová má také antimikrobní efekt [4].

### 3.6 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, anglicky High Performance Liquid Chromatography (HPLC), patří mezi separační analytické metody. Umožňuje hodnotit složky směsi jak kvalitativně, tak kvantitativně. Mezi její hlavní výhody patří krátký čas analýzy, citlivost stanovení, možnost automatizace a potřeba pouze malého množství vzorku [36].

Principem chromatografie je rozdílná distribuce látek mezi dvě nemísitelné fáze – pohyblivou mobilní fází a nepohyblivou stacionární fází. V HPLC mobilní fází představuje kapalina, zatímco stacionární fází je tuhá látka, případně kapalina ukotvená na tuhém nosiči. Vzorek je dávkován do mobilní fáze, která je unášena systémem, a jeho složky mohou interagovat se stacionární fází umístěnou v chromatografické koloně. Nejdříve jsou vymývány látky, které se stacionární fází interagují nejméně. Látky, které se stacionární fází interagují silněji, jsou zadržovány déle. Při průchodu směsi kolonou dochází k neustálému ustalování rovnováhy dělených látek mezi obě fáze. Distribuci složek mezi dvě fáze popisuje distribuční konstanta  $K_D$ , která se dá vypočítat jako poměr koncentrace separované složky ve stacionární a v mobilní fází. Čím vyšší je hodnota  $K_D$ , tím více je složka zadržována na stacionární fází. Aby se látky od sebe byly schopny oddělit, musí se lišit svými distribučními konstantami [5].

Podle toho, zda je složení mobilní fáze stále stejné, nebo se v čase mění, rozlišujeme dva typy eluce. U isokratické eluce je složení mobilní fáze v průběhu separace konstantní, a i eluční síla je tedy stále stejná. Tento typ eluce se využívá, mají-li separované látky podobné hodnoty  $K_D$ . Pokud se složení mobilní fáze v průběhu separace mění, hovoříme o gradientové eluci. V tomto případě v mobilní fázi postupně roste podíl složky s vyšší eluční silou. Při použití gradientové eluce se zkrátí čas analýzy u směsí obsahujících látky s výrazně odlišnými hodnotami  $K_D$ .

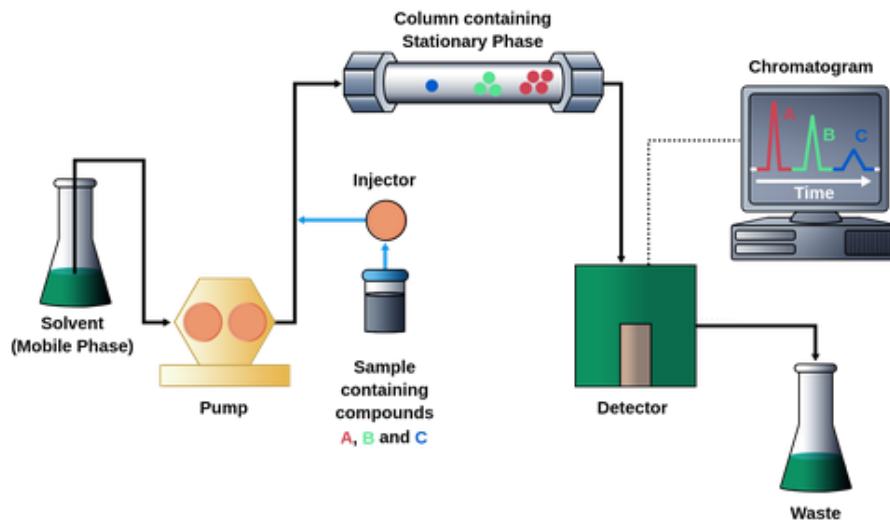
Výsledkem analýzy je chromatogram, který zobrazuje časovou závislost intenzity veličiny sledované detektorem (např. intenzita absorpance, intenzita fluorescence či intenzita iontů). Základní kvalitativní charakteristikou je retenční čas  $t_r$ , který představuje čas od nástřiku vzorku na kolonu k maximu chromatografického píku. Kvantitativní charakteristikou je plocha pod píkem, v případě velmi úzkých, vysokých a symetrických píků se dá použít i výška píku [5,36].

Analýzy HPLC se mohou provádět v různých separačních módech, mezi které patří například systém s normálními fázemi, systém s reverzními fázemi, iontově výměnná chromatografie či hydrofilní interakční chromatografie. V současnosti nejužívanějším systémem je systém reverzních fází, který byl použit i v této práci. V tomto uspořádání je mobilní fáze polárnější než fáze stacionární. Mobilní fáze má vodně-organický charakter, vodnou složku představuje voda, případně voda s přídavkem kyseliny, báze nebo pufru. Organickou složku tvoří organické rozpouštědlo mísitelné s vodou, například acetonitril či methanol. Stacionární fáze je nepolární, nejčastěji se jedná o silikagel modifikovaný chemicky vázaným ligandem. Nejrozšířenější je C18-silikagel, dalšími možnými ligandy jsou například alkylový řetězec C30, C8, C4, methyl, fenyl, hexyl, fenyl-hexyl, pentafluorofenyl, případně jiné další [5].

### **3.6.1 Instrumentace v HPLC**

Kapalinový chromatograf, přístroj pro provádění HPLC analýzy, se skládá z několika základních komponent. Mezi ně patří zásobníky mobilních fází a vysokotlaké čerpadlo, dávkovač vzorku (buď automatický, nebo manuální dávkovací ventil), chromatografická

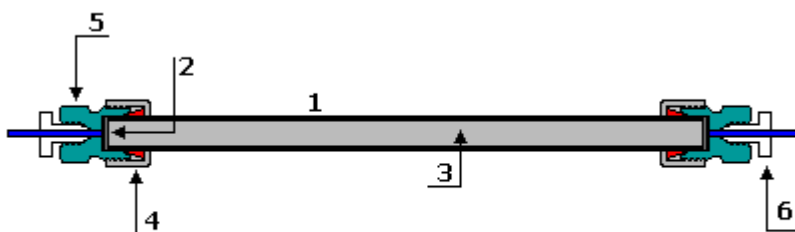
kolona s termostatem, detektor a počítač s vhodným softwarem [5]. Základní schéma chromatografického systému je zobrazeno na obrázku 5.



Obrázek 5: Základní schéma chromatografického systému [37]

### 3.6.1.1 Chromatografické kolony

Chromatografická kolona je trubice nebo kapilára, která je rovnoměrně naplněná, případně pokrytá stacionární fází. Plášť kolony musí být chemicky inertní, musí být schopen odolat vysokým tlakům a jeho vnitřní povrch musí být, pokud možno, dokonale hladký. Nejpoužívanějším materiálem pro výrobu pláště kolon je nerezová ocel (typ 316). Dnes používané kolony mají vnitřní průměr 2,1 až 5 mm a délku 50 až 300 mm. Jsou plněny částicemi o velikosti 1 až 5  $\mu\text{m}$  [5,38]. Znázornění kolony je na obrázku 6.



Obrázek 6: Chromatografická kolona, (1) - kovový plášť, (2) - porézní kovová frit, (3) - stacionární fáze, (4) - ochranný kroužek, (5) - koncová hlavice, (6) - vstup pro kapiláru se šroubem [38]

#### 3.6.1.1.1 Kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm; 2,7 μm částice

Kolona vybraná pro validaci chromatografické metody v této práci využívá moderní technologii fused-core (jiným názvem core-shell) částic. Tyto částice oproti běžným porézním částicím disponují užší distribucí velikosti, jejich použití zmenšuje příspěvek vířivé difúze a také redukuje odpor proti převodu hmoty. Díky těmto vlastnostem jsou analýzy prováděné na kolonách s fused-core částicemi rychlejší a mají vyšší rozlišení, citlivost i účinnost [39,40]. Fused-core částice se skládají z jádra, které je většinou pevné, a pláště, který je porézní. Podle toho, jak je jádro velké, a jak porézní je plášť a jaká je jeho tloušťka, jsou částice určeny pro různé typy chromatografie [41].

Jako stacionární fáze u této kolony slouží silikagel s navázanými dlouhými řetězci C18 a hydrofilním *endcappingem*, který zlepšuje retenci polárních látek. Typ *endcappingu* výrobce blíže nespecifikuje [5,40].

#### 3.6.1.2 Detektor DAD

Pro účely této diplomové práce byl využit detektor s diodovým polem (DAD). Tento typ detektoru dokáže snímat celé spektrum vlnových délek v reálném čase. Kromě retenčního času tak ke každé detekované látce získáváme její absorpční spektrum, což zvyšuje selektivitu detekce. Pomocí DAD detektoru také můžeme ověřovat spektrální čistotu píku [5].

### 3.7 Rešerše stanovení vybraných flavonoidů a fenolických kyselin

V experimentální části se zabývám stanovením vybraných flavonoidů a fenolických kyselin v doplňcích stravy na bázi zlatobýlu a dále stanovením rutinu, případně kyseliny chlorogenové v jednosložkových přípravcích. Bylo publikováno mnoho studií, které se věnují stanovování těchto látek jak v rostlinném materiálu, tak v doplňcích stravy či lidské plazmě. Z níže uvedené tabulky vyplývá, že nejčastější metodou používanou pro tyto účely je HPLC s kolonou obsahující stacionární fázi typu C18. K detekci se používají spektrofotometrické UV detektory nebo detektory s diodovým polem, některé práce využívají i hmotnostní spektrometrii.

Tabulka 3: Příklady publikovaných studií a podmínek separace vybraných flavonoidů a fenolických kyselin

Vzorek, zdroj	Stanovované látky	Typ kolony	Mobilní fáze	Separace/detektor
Potravní doplňky, [42]	rutin, troxerutin, diosmin, hesperidin	Ascentis Express RP-Amide 100 × 3,0 mm; 2,7 μm částice	ACN/vodný roztok CH <sub>3</sub> COOH o pH 3	HPLC/DAD
Potravní doplňky se zelenou kávou, [43]	kys. 3-kafeoylchinová, kys. 4-kafeoylchinová, kys. 5-kafeoylchinová, kys. 1,3-dikafeoylchinová, kys. 3,5-dikafeoylchinová	Ascentis Express RP-Amide 100 × 2,1 mm; 2,7 μm částice	ACN/5% HCOOH	UHPLC/DAD
Listy rakytníku řešetlákového, [44]	katechin, rutin, quercetin, kaempferol, isorhamnetin	HIQ SIL C18 V 250 × 4,6 mm; 5 μm částice	MeOH/ACN/H <sub>2</sub> O/1% CH <sub>3</sub> COOH	HPLC/DAD
Listy rostlin několika čeledí rodu zázvorníkotvaré ( <i>Zingiberales</i> ), [45]	rutin, kyselina chlorogenová, kyselina rozmarýnová	Hypersil ODS 280 × 4 mm; 5 μm částice	45% MeOH/0,01% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	HPLC/UV
Lidská plazma po p.o. aplikaci 500 mg rutinu, [46]	rutin	Luna ODS-2 150 × 2,1 mm; 5 μm částice	ACN/CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> + EDTA + ledová CH <sub>3</sub> COOH	HPLC/UV
Rostlinné doplňky stravy s obsahem flavonoidů, [47]	14 flavonoidů vč. rutinu, quercitrinu a quercetinu	Chromolith Fast Gradient Monolithic RP-18e 50 × 2 mm	ACN/0,05% CF <sub>3</sub> COOH	UHPLC/UV a UHPLC/MS/MS
Plody fíkovníku smokvoně, [48]	14 fenolických sloučenin vč. kys. chlorogenové, rutinu a quercetinu	Gemini NX-C18 150 × 3 mm; 3 μm částice	MeOH/0,1% HCOOH	HPLC/DAD
Listy <i>Pluchea indica</i> , [49]	kys. 3-kafeoylchinová, kys. 4-kafeoylchinová, kys. 5-kafeoylchinová, kys. 3,4-dikafeoylchinová, kys. 3,5-dikafeoylchinová, kys. 4,5-dikafeoylchinová	Hypersil BDS C18 100 × 4,6 mm; 3,5 μm částice	MeOH/0,5% CH <sub>3</sub> COOH	HPLC/DAD
Semena a slupky plodů révy vinné, [50]	katechin, epikatechin, quercetin, rutin, resveratrol	Acclaim 120 250 × 4,6 mm; 5 μm částice	MeOH/H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> COOH	HPLC/UV/VIS

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité přístroje a pomůcky

#### 4.1.1 Chromatografický systém

Chromatograf: Shimadzu Prominence LC-20AD

Detektor: spektrofotometrický detektor SPD-M20A Prominence UV/VIS DAD

Vyhodnocení: Software LC LabSolutions

#### 4.1.2 Testované kolony

Tabulka 4: Testované kolony

	Výrobce	Název, charakteristika
1	YMC CO., LTD.	YMC-Triart C-18 ExRS 100 × 4,6 mm; 3 μm částice
2	YMC CO., LTD.	YMC-Triart C-18 ExRS 150 × 4,6 mm; 3 μm částice
3	Supelco Analytical	Ascentis® Express 90 Å RP-Amide 150 × 4,6 mm; 2,7 μm částice
4	Supelco Analytical	Ascentis® Express Phenyl-Hexyl 100 × 4,6 mm; 5 μm částice
5	Phenomenex®	Kinetex® Biphenyl 100 Å, 150 × 4,6 mm; 5 μm částice
6	Phenomenex®	Kinetex® Phenyl-Hexyl 100 Å, 100 × 4,6 mm; 5 μm částice
7	Supelco Analytical	Ascentis® Express F5 150 × 4,6 mm; 5 μm částice
8	Supelco Analytical	Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm; 2,7 μm částice
9	Chromservis	CHROMSHELL® C18 Polar HPLC column, 150 × 4,6 mm; 2,6 μm částice
10	Phenomenex®	Kinetex® EVO C18 100 Å 150 × 4,6 mm; 2,6 μm částice
11	Avantor®	ACE® Phenyl-300 150 × 4,6 mm; 3 μm částice
12	Avantor®	ACE® C4-300 150 × 4,6 mm; 3 μm částice
13	Avantor®	ACE® C18-300 150 × 4,6 mm; 3 μm částice
14	Chromservis	CHROMSHELL® C18 Polar HPLC Column 250 × 4,6 mm; 2,6 μm částice

### 4.1.3 Pomůcky

Běžné laboratorní sklo

Automatické pipety (Brand)

Analytické váhy (Sartorius Secura)

Ultrazvuková lázeň (Bandelin Sonorex Digitec)

Plastové injekční stříkačky (Omnifix®)

PTFE filtry – velikost pórů 0,22 μm (Chromservis)

## 4.2 Použité chemikálie

### 4.2.1 Standardy

Kyselina chlorogenová ≥ 95% (Sigma-Aldrich)

Rutin ≥ 94% (Sigma-Aldrich)

Astragalin ≥ 98% (ChemFaces)

Quercitrin ≥ 78% (Sigma-Aldrich)

Quercetin ≥ 95% (Sigma-Aldrich)

Kaempferol ≥ 96% (Fluka)

Kyselina 3,5-dikafeoylchinová ≥ 98% (ChemFaces)

Kyselina 1,3-dikafeoylchinová ≥ 98% (ChemFaces)

Kyselina kumarová ≥ 97% (Sigma-Aldrich)

Kumarin ≥ 99% (Sigma-Aldrich)

### 4.2.2 Rozpouštědla

Methanol absolute HPLC gradient grade (Biosolve)

Acetonitrile LC-MS grade (Biosolve)

Kyselina fosforečná 85% (Lachema)

Ultračistá voda (systém Milli-Q, Millipore)

### 4.3 Doplnky stravy

Tabulka 5: Testované doplňky stravy

Název přípravku	Výrobce	Forma	Udávaný obsah
Celík zlatobýl	Valdemar Grešík	kapky	neuveďeno
Celík obecný BIO	Bylinné kapky	kapky	neuveďeno
Celík obecný	Bylinné kapky	kapky	neuveďeno
Zlatobýl obecný	Green Idea	kapky	neuveďeno
Zlatobýl – tinktura z pupenů	Serafin	kapky	neuveďeno
Zlatobýl – tinktura z bylin	Serafin	kapky	neuveďeno
Zlatobýlová směs	Dědek kořenář	kapky	neuveďeno
Zlatobýl	Inca Botanica	kapky	neuveďeno
Rutin	Solgar	tablety	500 mg rutinu
Rutin	Walmark®	tablety	50 mg rutinu
Celík	Ex Herbis	tvrdé tobolky	neuveďeno
Zelená káva	Botanic	tvrdé tobolky	50 % kyseliny chlorogenové

### 4.4 Příprava mobilní fáze

V průběhu analýz byla využita gradientová eluce. Jako organická fáze byl používán čistý acetonitril, v průběhu optimalizace byl zkoušen i čistý methanol. Jako vodná složka byla použita voda okyselená 85% kyselinou fosforečnou. Byla připravena přidáním 0,9 ml 85% kyseliny fosforečné k 900 ml ultračisté vody – vznikla tedy 0,085% kyselina fosforečná.

### 4.5 Příprava roztoků

#### 4.5.1 Příprava rozpouštědla pro standardy a vzorky

Jako rozpouštědlo byl použit čistý methanol.

#### 4.5.2 Příprava zásobních roztoků standardů pro optimalizaci a validaci metody

Roztoky standardů použitých látek byly připraveny dle níže uvedené tabulky. Pro rozpuštění standardů byla použita ultrazvuková lázeň. Roztoky standardů byly uchovávány v lednici, aby se předešlo jejich případné degradaci.



Tabulka 6: Příprava zásobních roztoků standardů

Látka	Navážka (mg)	Methanol (μl)	Koncentrace (mg/l)
Kyselina chlorogenová	1,00	1000	1000
Rutin	0,97	1000	970
Astragalín	0,97	1000	970
Quercitrín	1,02	1000	1020
Quercetin	1,02	1000	1020
Kaempferol	1,03	1000	1030
Kyselina 3,5-dikafeoylchinová	0,59	500	1180
Kyselina 1,3-dikafeoylchinová	0,56	500	1120
Kumarín	0,49	500	960
Kyselina kumarová	0,47	500	940

#### 4.5.3 Příprava pracovních roztoků standardů

Pracovní roztoky byly připraveny ředěním zásobních roztoků standardů methanolem. K 50 μl každého roztoku bylo přidáno 950 μl methanolu, roztoky byly tedy ředěny dvacetkrát. Byl připraven i směsný roztok standardů smísením 50 μl zásobních roztoků kyseliny chlorogenové, rutinu, astragalínu, quercitrínu, quercetinu a kaempferolu a doplněním methanolem do 1000 μl. V průběhu analýz došlo v pozdější fázi optimalizace HPLC metody k nahrazení astragalínu a quercitrínu kyselinou 3,5-dikafeoylchinovou, protože se v analyzovaných vzorcích vyskytovala ve větším množství, zatímco první dvě jmenované látky se ve vzorcích nevyskytovaly. Zkoušela se i přítomnost kyseliny 1,3-dikafeoylchinové, kumarínu a kyseliny kumarové, která ale nebyla potvrzena, a proto už tyto standardy nebyly dále používány. Pro validaci metody a stanovení obsahu látek v doplňcích stravy se tedy použilo následujících pět standardů: kyselina chlorogenová, rutin, kyselina 3,5-dikafeoylchinová, quercetin a kaempferol.

#### 4.5.4 Příprava roztoků pro kalibraci a opakovatelnost

Pro kalibraci bylo připraveno 8 směsných roztoků o koncentracích v rozmezí 2 až 100 mg/l. Do jedné vialky bylo napipetováno vždy dané množství každého z pěti zásobních roztoků standardů a ředěno methanolem do objemu 1000  $\mu$ l, viz tabulka níže. Pro opakovatelnost pak byly použity roztoky o koncentraci 5, 50 a 100 mg/l.

Tabulka 7: Příprava roztoků pro kalibraci a opakovatelnost

Objem každého standardu ( $\mu$ l)	Objem methanolu ( $\mu$ l)	Výsledná koncentrace (mg/l)
2	990	2
5	975	5
10	950	10
15	925	15
25	875	25
50	750	50
75	625	75
100	500	100

#### 4.5.5 Příprava roztoků pro správnost

Test správnosti metody byl proveden s kapkami Celík zlatobýl od firmy Valdemar Grešík. Byly připraveny 3 roztoky s obsahem 200  $\mu$ l přefiltrovaných kapek Grešík naředěných do 1000  $\mu$ l methanolem. Dále bylo připraveno 6 roztoků s 200  $\mu$ l kapek Grešík, s přídatkem 50  $\mu$ l každého z pěti zásobních roztoků standardů a 550  $\mu$ l methanolu. Nakonec byly připraveny ještě dva směsné roztoky standardů smísením 50  $\mu$ l od každého zásobního roztoku standardu se 750  $\mu$ l methanolu.

#### 4.5.6 Příprava roztoků pro přesnost

Pro určení přesnosti bylo použito šest roztoků připravených pro test správnosti obsahujících 200  $\mu$ l kapek Celík zlatobýl od výrobce Valdemar Grešík s přídatkem 250  $\mu$ l směsného roztoku standardů naředěné do 1000  $\mu$ l methanolem.

#### **4.5.7 Příprava roztoku pro test vhodnosti chromatografického systému**

Pro tento test byl využit směsný roztok standardů o koncentraci 50 mg/l naředěných methanolem do 1000 µl.

#### **4.6 Příprava analyzovaných vzorků**

Roztoky vzorků kapek byly připraveny protřepáním a přefiltrováním do vialky. Z této vialky bylo dále odebráno 200 µl do další vialky a doplněno methanolem na 1000 µl. Vzorky tobolek byly připraveny vysypáním obsahu 10 tobolek, byla zjištěna průměrná hmotnost jedné tobolky, a poté bylo odváženo 250 mg zhomogenizované směsi. Toto množství se v plastové zkumavce doplnilo 10 ml methanolu a bylo vloženo na 10 minut do ultrazvukové lázně s destilovanou vodou pokojové teploty. Vzorky tablet byly připraveny rozdrčením 10 tablet v porcelánové třence pomocí těrky. Byla zjištěna průměrná hmotnost jedné tablety a ze zhomogenizované směsi bylo odebráno 10 mg, přeneseno do plastové zkumavky a doplněno 10 ml methanolu. Opět byla zkumavka vložena na 10 minut do ultrazvukové lázně. Od kapek, tobolek i tablet byly vždy připraveny 3 vzorky.

#### **4.7 Parametry měření**

K analýze byl použit HPLC chromatograf Shimadzu Prominence LC-20AD a UV/VIS DAD spektrofotometrický detektor SPD-M20A. K vyhodnocení dat byl využíván software LC LabSolutions.

Separace probíhala při 30 °C na koloně Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm o velikosti částic 2,7 µm. Nástřik vzorku byl 10 µl. Jednotlivé píky byly detekovány při dvou vlnových délkách – píky kyseliny chlorogenové a kyseliny 3,5-dikafeoylchinové byly měřeny při 325 nm a píky rutinu, quercetinu a kaempferolu při 360 nm.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Vývoj analytické metody, optimalizované parametry

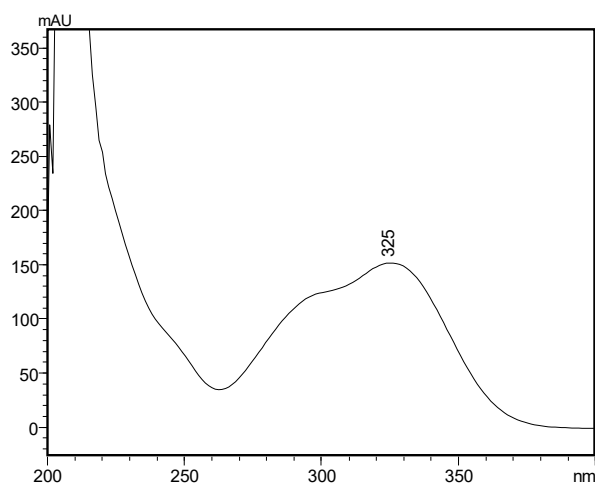
#### 5.1.1 Volba vlnové délky

Pro detekci byly vybrány dvě vlnové délky – 325 nm pro kyselinu chlorogenovou a kyselinu 3,5-dikafeoylchinovou a 360 nm pro rutin, quercetin a kaempferol. Tyto vlnové délky byly vybrány jako kompromis z naměřených absorpčních maxim jednotlivých látek, která byla získána pomocí DAD detektoru. Jednotlivá maxima a absorpční spektra látek jsou uvedena v následující tabulce a obrázcích.

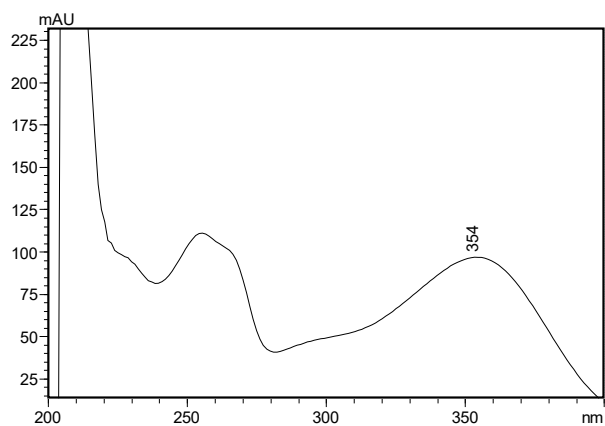
#### Absorpční maxima standardů

Tabulka 8: Absorpční maxima standardů

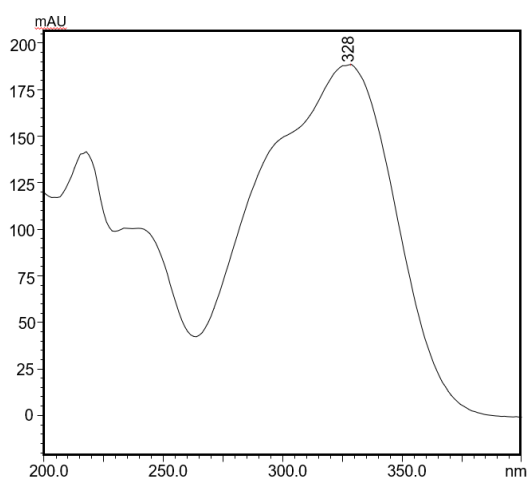
Standard	Vlnová délka (nm)
Kyselina chlorogenová	325
Rutin	354
Kyselina 3,5-dikafeoylchinová	328
Quercetin	369
Kaempferol	365



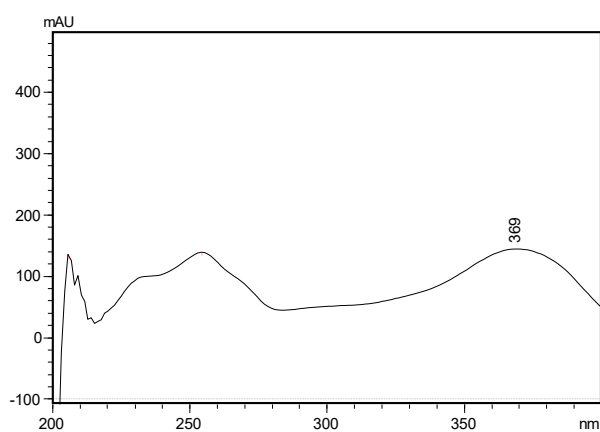
Obrázek 7: Absorpční spektrum kyseliny chlorogenové



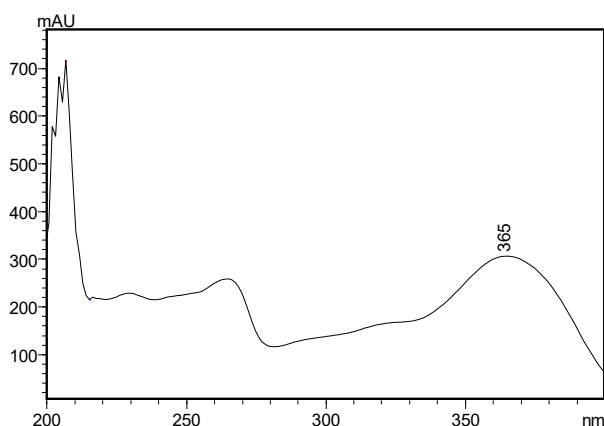
Obrázek 8: Absorpční spektrum rutinu



Obrázek 9: Absorpční spektrum kyseliny 3,5-dikafeoylchinové



Obrázek 10: Absorpční spektrum quercetinu



Obrázek 11: Absorpční spektrum kaempferolu

### 5.1.2 Volba kolony a gradientu

V rámci optimalizace separace bylo vyzkoušeno celkem 14 různých stacionárních fází. Přehled použitých kolon je uveden v tabulce 4. Zkoušení kolon probíhalo při teplotě 30 °C, délce analýzy 12 minut, nástřiku vzorku 10 µl a průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min. Detekce probíhala při univerzální vlnové délce 254 nm pro všechny analyty. Každá kolona byla zkoušena při 4 různých gradientech, podmínky jednotlivých gradientů jsou uvedeny v tabulkách 9 až 12. Jako vodná fáze byla použita okyselená ultračistá voda 0,085% kyselinou fosforečnou, jako organická fáze čistý acetonitril.

V první fázi diplomové práce byla optimalizace prováděna se šesti látkami – kyselinou chlorogenovou (CHLO), rutinem (RUT), astragalinem (AST), quercitrinem (QUI), quercetinem (QUE) a kaempferolem (KAE). Tyto látky byly zvoleny na základě stručné rešerše ohledně obsahových látek v extraktech ze zlatobýlu. Vzhledem k tomu, že se nepodařilo úplně rozseparovat třetí a čtvrtý pík, jež tvořily za všech podmínek kritický pár (astragalin a quercitrin), byly tyto látky později po testování separace na extraktech doplňků stravy vyřazeny a nahrazeny kyselinou 3,5-dikafeoylchinovou (DIK). Ta se po našem zjištění a hledání s pomocí různých testovaných látek v doplňcích stravy vyskytovala v různém množství, na rozdíl od astragalínu a quercitrinu, které nebyly v žádném doplňku stravy nalezeny. Níže jsou uvedeny chromatografické záznamy pořízené na vybraných kolonách.

Pro validaci metody a stanovení látek v doplňcích stravy byla nakonec vybrána kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm s velikostí částic 2,7 µm, která vykazovala nejvyšší separační účinnost i přijatelnou dobu analýzy. Použit byl gradient č. 4, při kterém byly všechny látky přítomné v extraktech nejlépe separovány.

Tabulka 9: Průběh gradientu č. 1

<b>Časový průběh gradientu (min)</b>	<b>Zastoupení vodné mobilní fáze (%)</b>
0,01 – 10,00	95–10
10,00 – 10,20	10–95
10,20 – 12,00	95
12,00	stop

Tabulka 10: Průběh gradientu č. 2

<b>Časový průběh gradientu (min)</b>	<b>Zastoupení vodné mobilní fáze (%)</b>
0,01 – 10,00	90–10
10,00 – 10,20	10–90
10,20 – 12,00	90
12,00	stop

Tabulka 11: Průběh gradientu č. 3

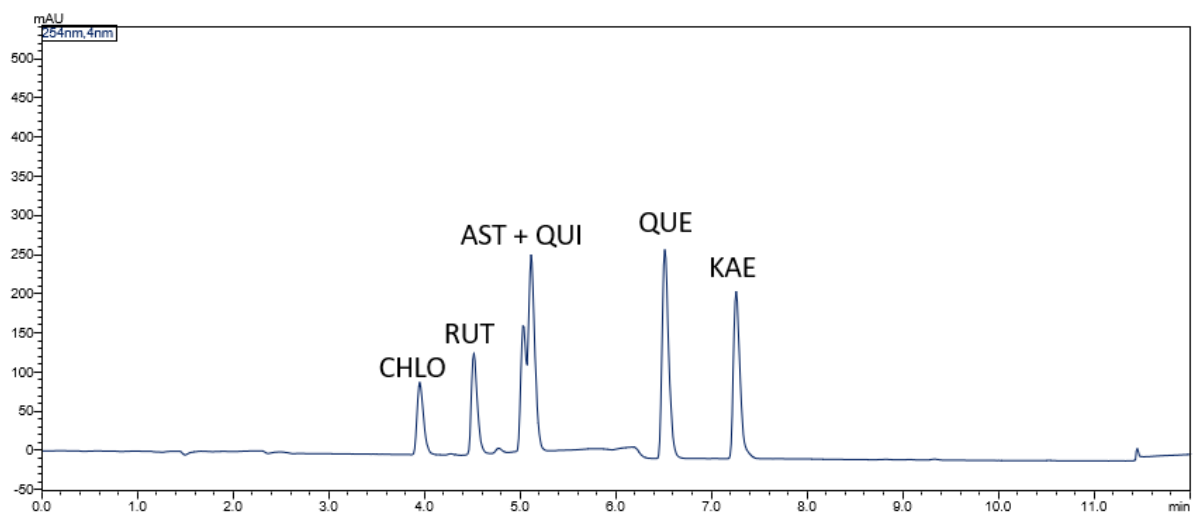
<b>Časový průběh gradientu (min)</b>	<b>Zastoupení vodné mobilní fáze (%)</b>
0,01 – 10,00	90–30
10,00 – 10,20	30–90
10,20 – 12,00	90
12,00	stop

Tabulka 12: Průběh gradientu č. 4

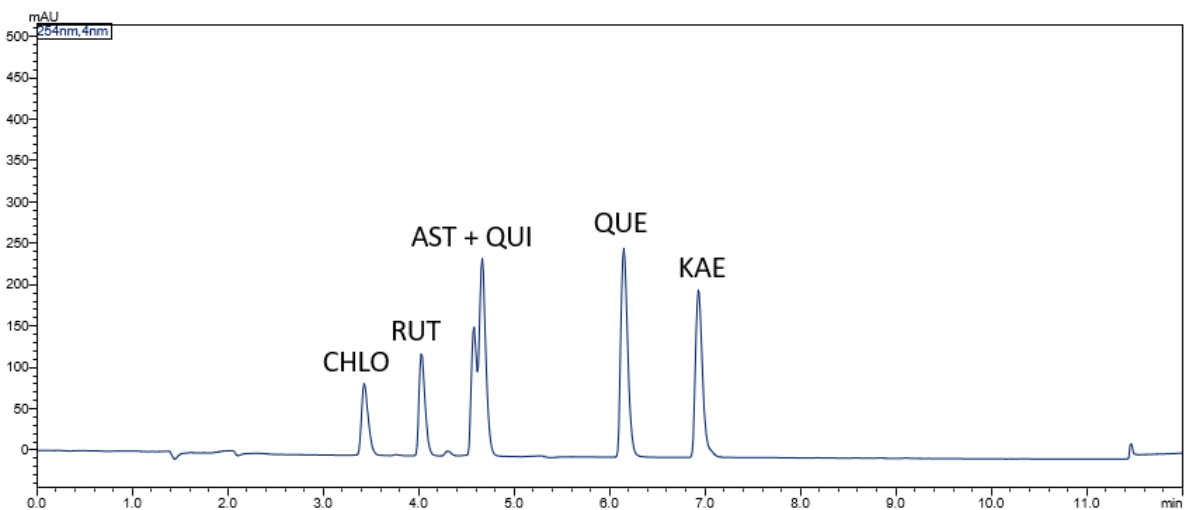
<b>Časový průběh gradientu (min)</b>	<b>Zastoupení vodné mobilní fáze (%)</b>
0,01 – 10,00	90–50
10,00 – 10,20	50–90
10,20 – 12,00	90
12,00	stop

Na následujících chromatogramech jsou uvedeny příklady separace standardů na některých vybraných kolonách. Je zřejmé, že u většiny stacionárních fází byl kritickým párem pro separaci dvojpík astragalinu a quercitrinu.

5.1.2.1 Kolona č. 2: YMC Triart C-18 ExRS 150 × 4,6 mm; 3 μm

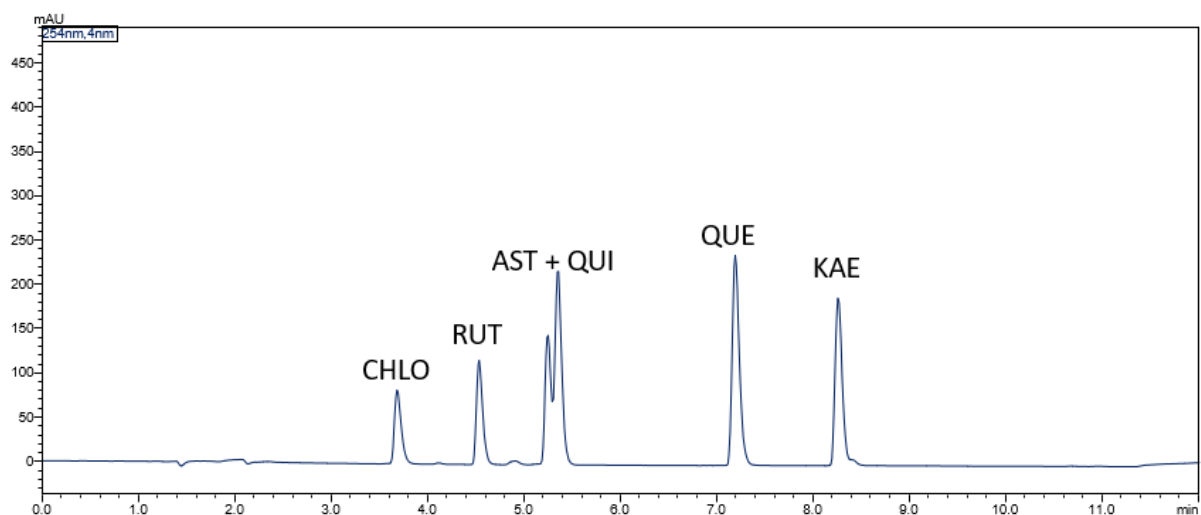


Obrázek 12: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 ExRS 150 × 4,6 mm; 3 μm při gradientu č. 1

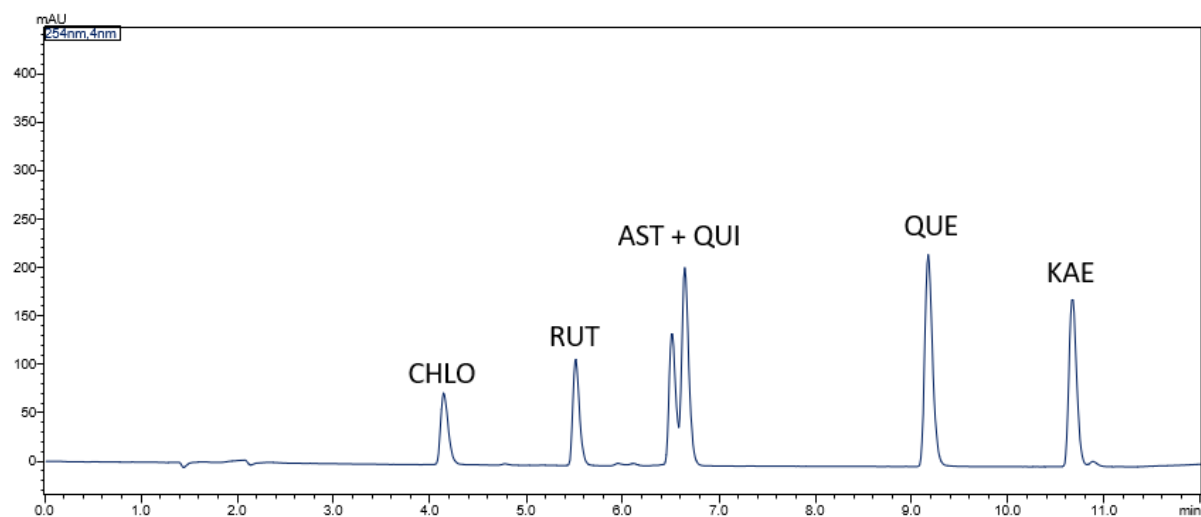


Obrázek 13: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 ExRS 150 × 4,6 mm; 3 μm při gradientu č. 2





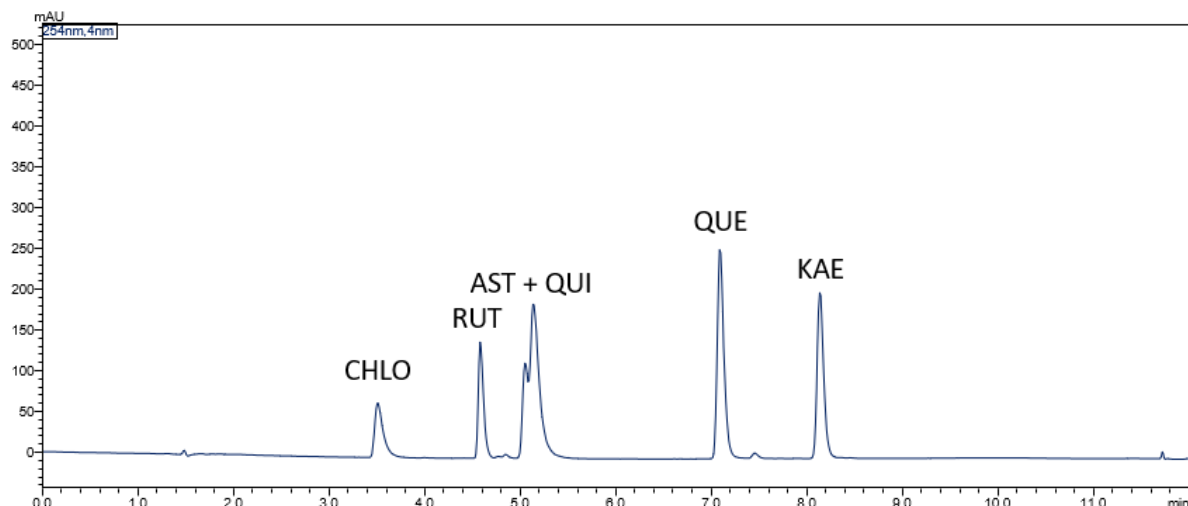
Obrázek 14: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 ExRS 150 × 4,6 mm; 3 μm při gradientu č. 3



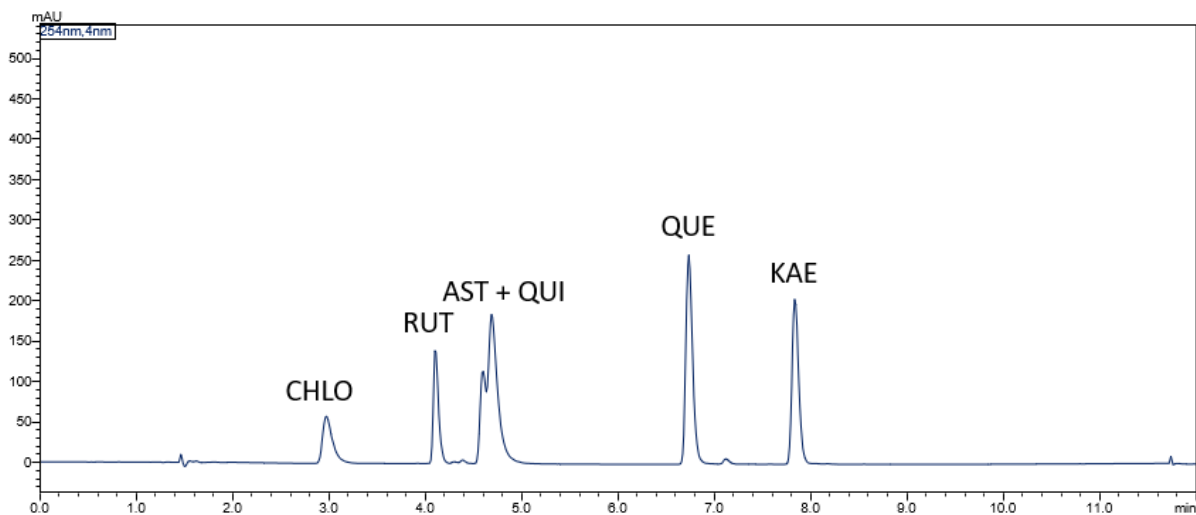
Obrázek 15: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 ExRS 150 × 4,6 mm; 3 μm při gradientu č. 4

Na této koloně tvořily astragalín a quercitrín dvojpík. Účinnost kolony nebyla dostatečná. Nejkratší čas analýzy byl dosažen u gradientu č. 2, naopak nejdelší u gradientu č. 4.

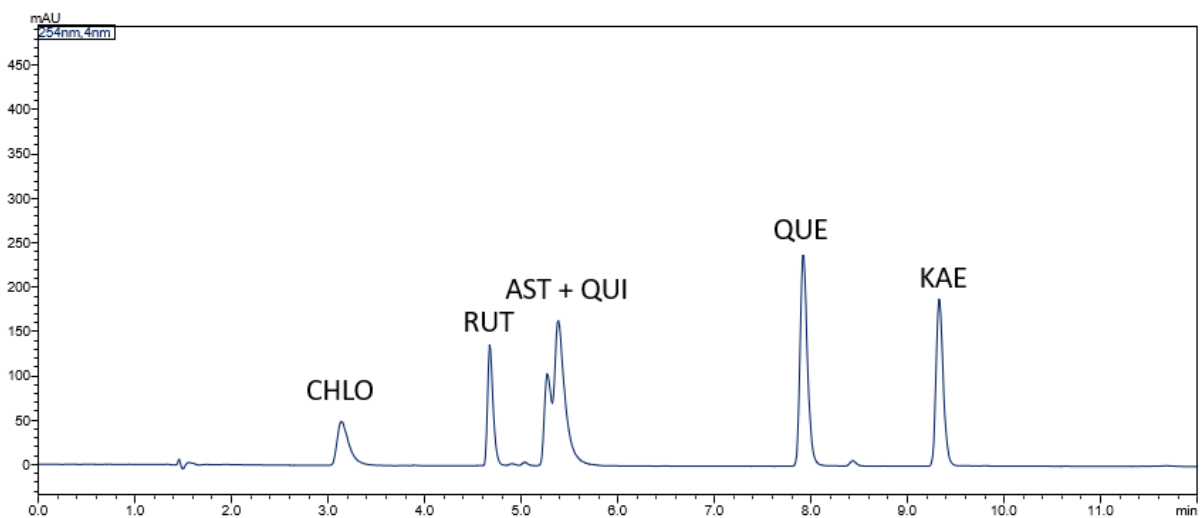
### 5.1.2.2 Kolona č. 3: Ascentis Express 90 RP-Amide 150 × 4,6 mm; 2,7 μm



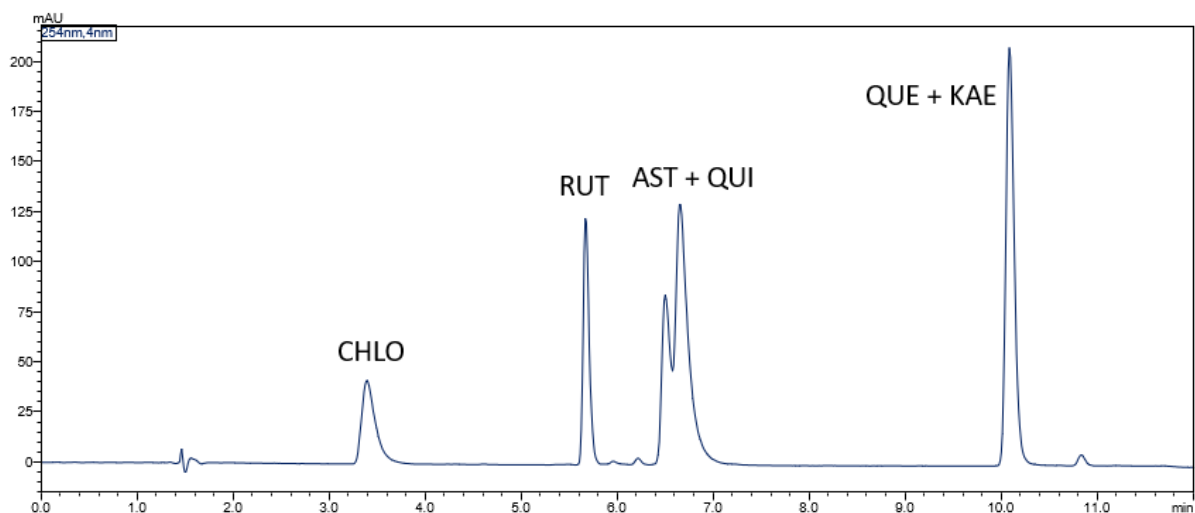
Obrázek 16: Chromatogram separace na koloně Ascentis® Express 90 RP-Amide 150 × 4,6 mm; 2,7 μm při gradientu č. 1



Obrázek 17: Chromatogram separace na koloně Ascentis® Express 90 RP-Amide 150 × 4,6 mm; 2,7 μm při gradientu č. 2



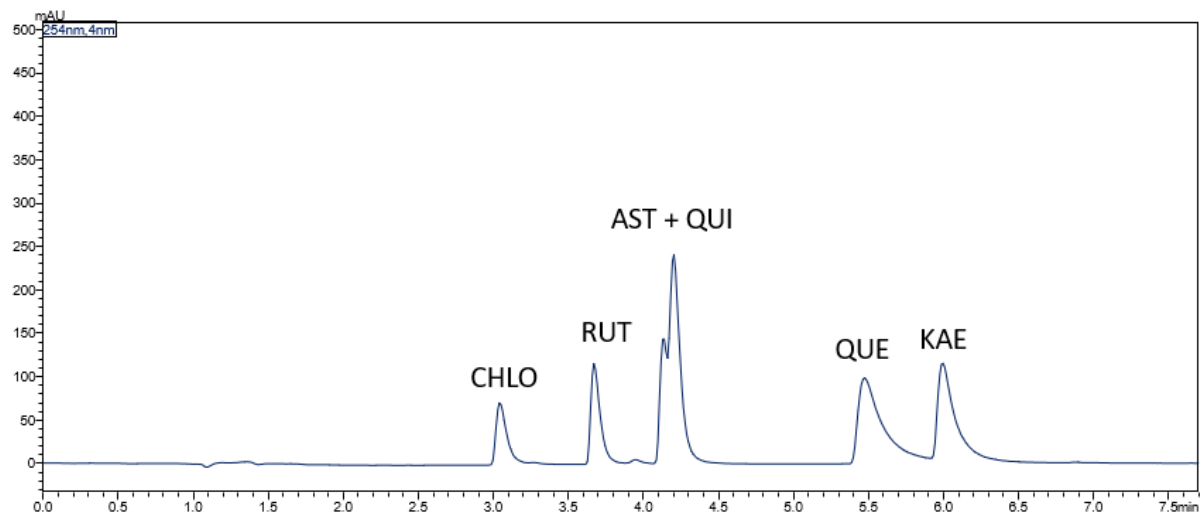
Obrázek 18: Chromatogram separace na koloně Ascentis® Express 90 RP-Amide 150 × 4,6 mm; 2,7 μm při gradientu č. 3



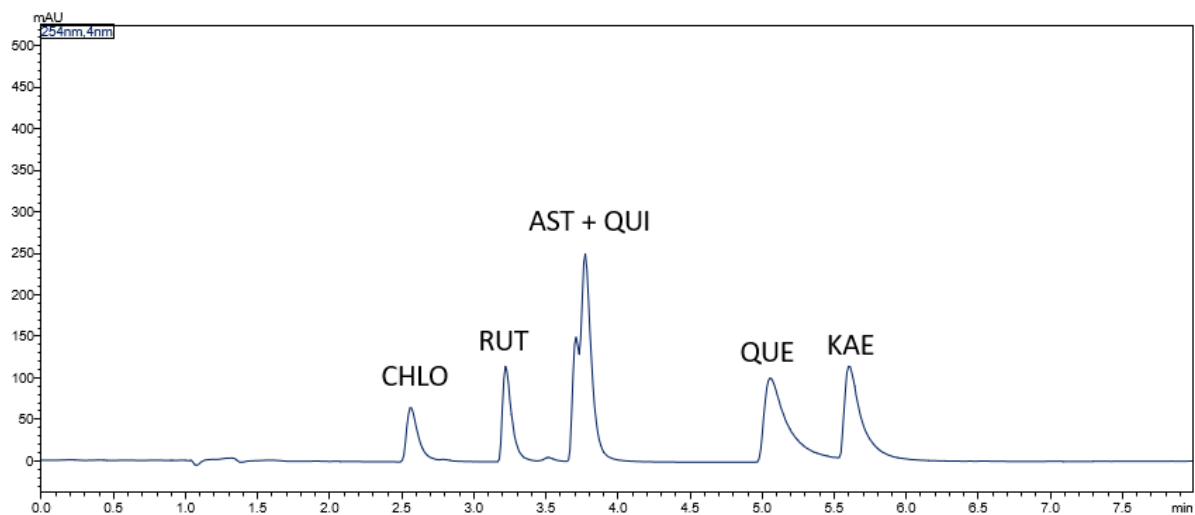
Obrázek 19: Chromatogram separace na koloně Ascentis® Express 90 RP-Amide 150 × 4,6 mm; 2,7 μm při gradientu č. 4

Na této koloně tvořily opět astragalín s quercitrínem dvojpík, při gradientu č. 4 se navíc spojily i píky quercetinu a kaempferolu do jednoho píku. Tato kolona byla vyhodnocena jako nevhodná.

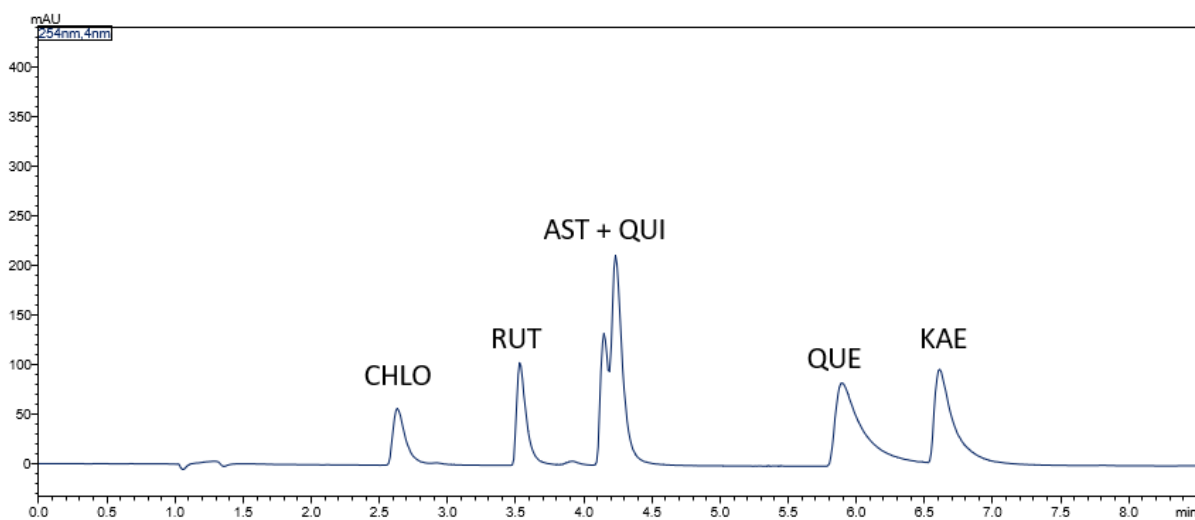
#### 5.1.2.3 Kolona č. 6: Kinetex® Phenyl-Hexyl 100 Å, 100 × 4,6 mm; 5 μm



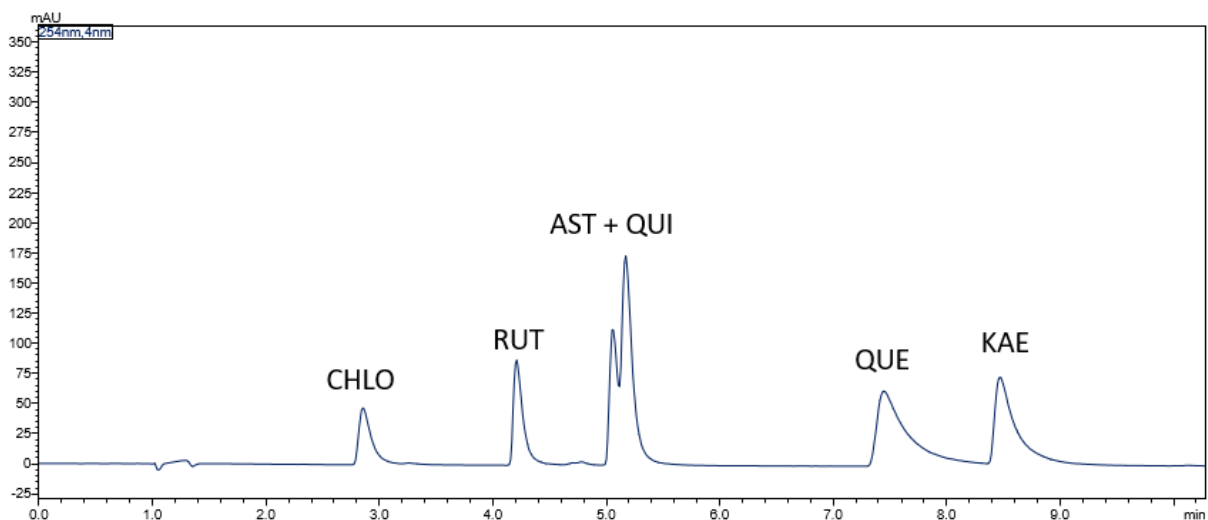
Obrázek 20: Chromatogram separace na koloně Kinetex® Phenyl-Hexyl 100 Å, 100 × 4,6 mm; 5 μm při gradientu č. 1



Obrázek 21: Chromatogram separace na koloně Kinetex® Phenyl-Hexyl 100 Å, 100 × 4,6 mm; 5 μm při gradientu č. 2



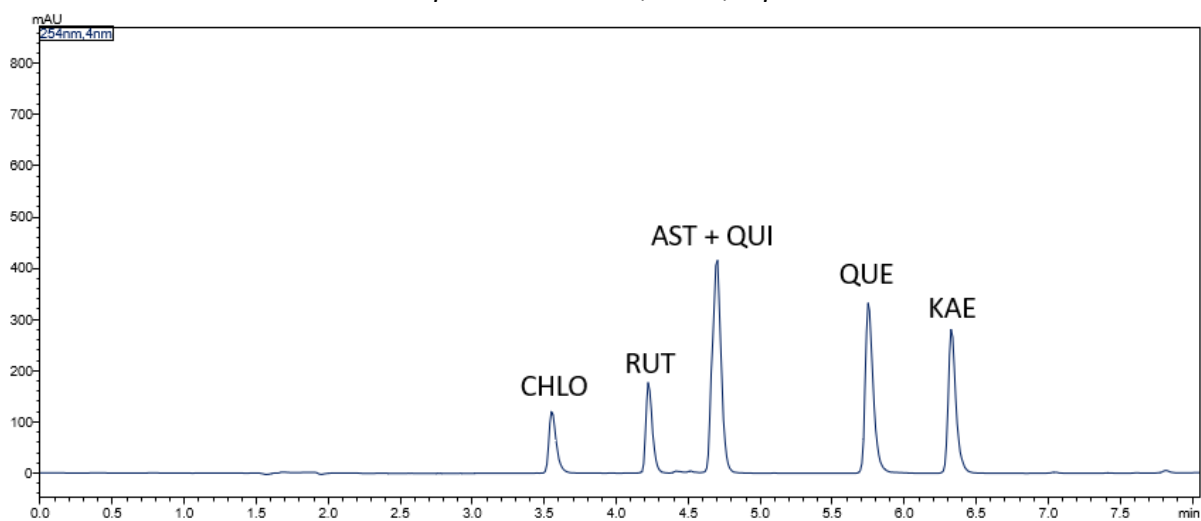
Obrázek 22: Chromatogram separace na koloně Kinetex® Phenyl-Hexyl 100 Å, 100 × 4,6 mm; 5 μm při gradientu č. 3



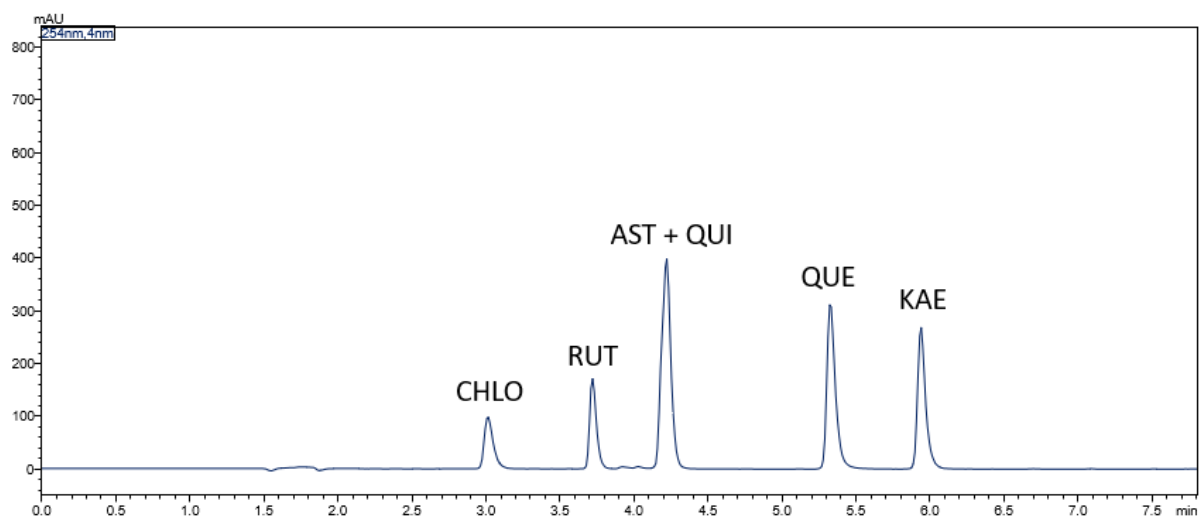
Obrázek 23: Chromatogram separace na koloně Kinetex® Phenyl-Hexyl 100 Å, 100 × 4,6 mm; 5 μm při gradientu č. 4

Na této koloně se opět nepodařilo dostatečně rozseparovat pík astragalínu a quercitrínu. Píky navíc chvostují, což je vidět především u píků quercetinu a kaempferolu. Tato kolona byla vyhodnocena jako nevhodná.

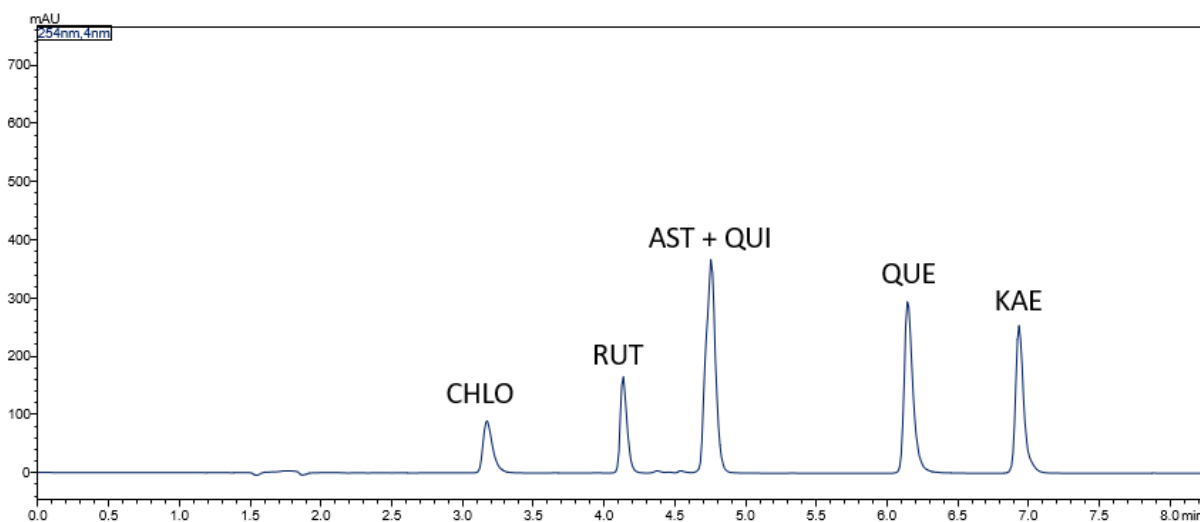
#### 5.1.2.4 Kolona č. 7: Ascentis® Express F5 150 × 4,6 mm, 5 μm



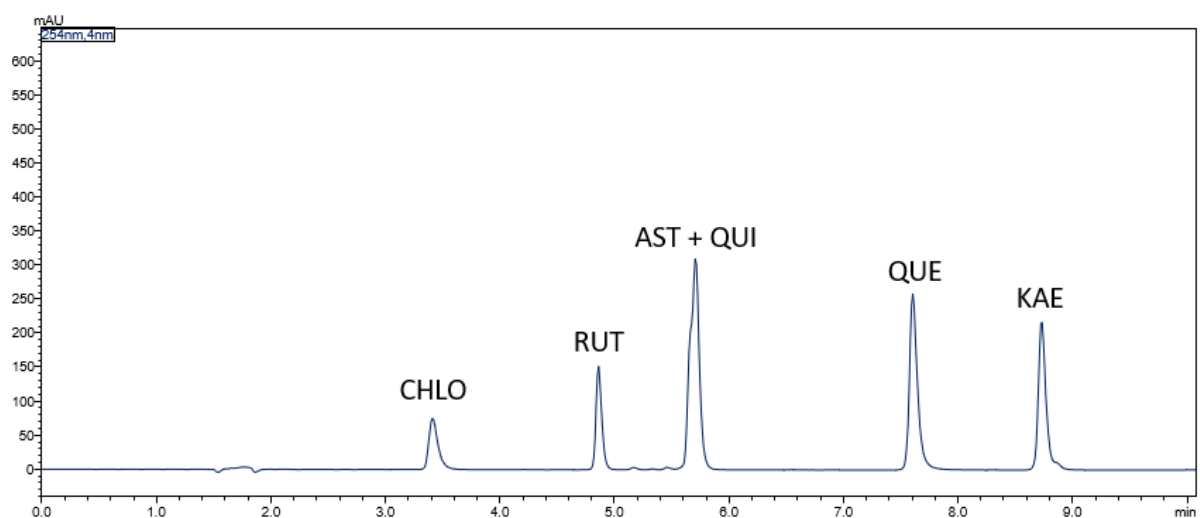
Obrázek 24: Chromatogram separace na koloně Ascentis® Express F5 150 × 4,6 mm, 5 μm při gradientu č. 1



Obrázek 25: Chromatogram separace na koloně Ascentis® Express F5 150 × 4,6 mm, 5 μm při gradientu č. 2



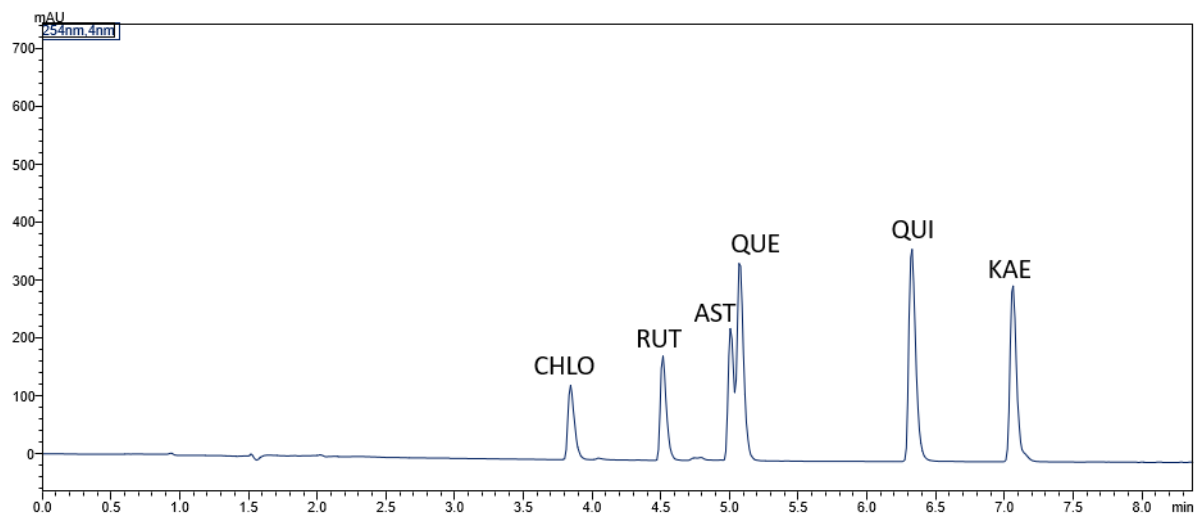
Obrázek 26: Chromatogram separace na koloně Ascentis® Express F5 150 × 4,6 mm, 5 μm při gradientu č. 3



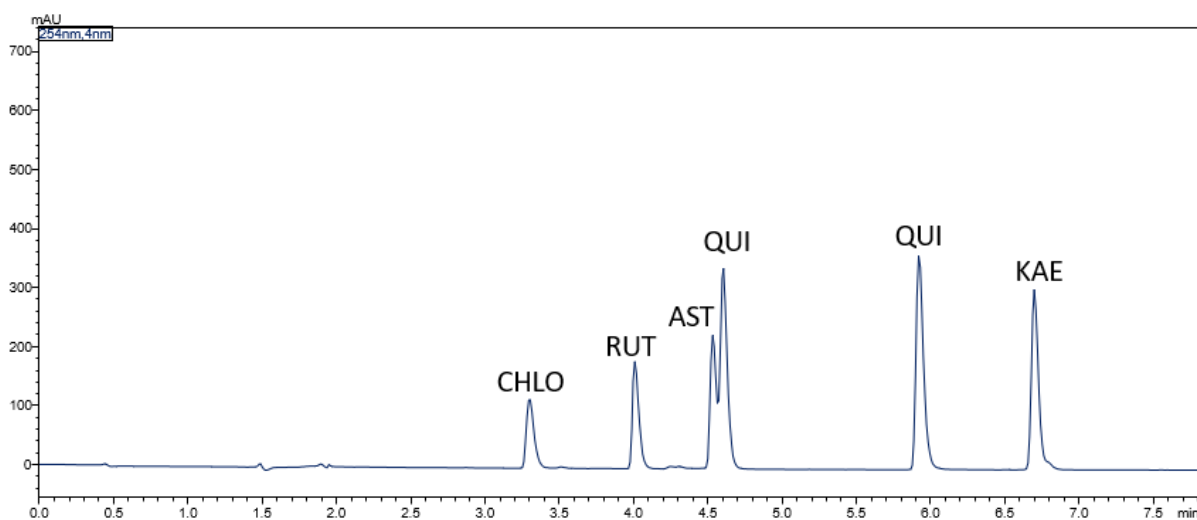
Obrázek 27: Chromatogram separace na koloně Ascentis® Express F5 150 × 4,6 mm, 5 μm při gradientu č. 4

Separční účinnost této kolony byla nedostatečná – píky astragalínu a quercitrínu tvoří při všech gradientech jeden společný pík.

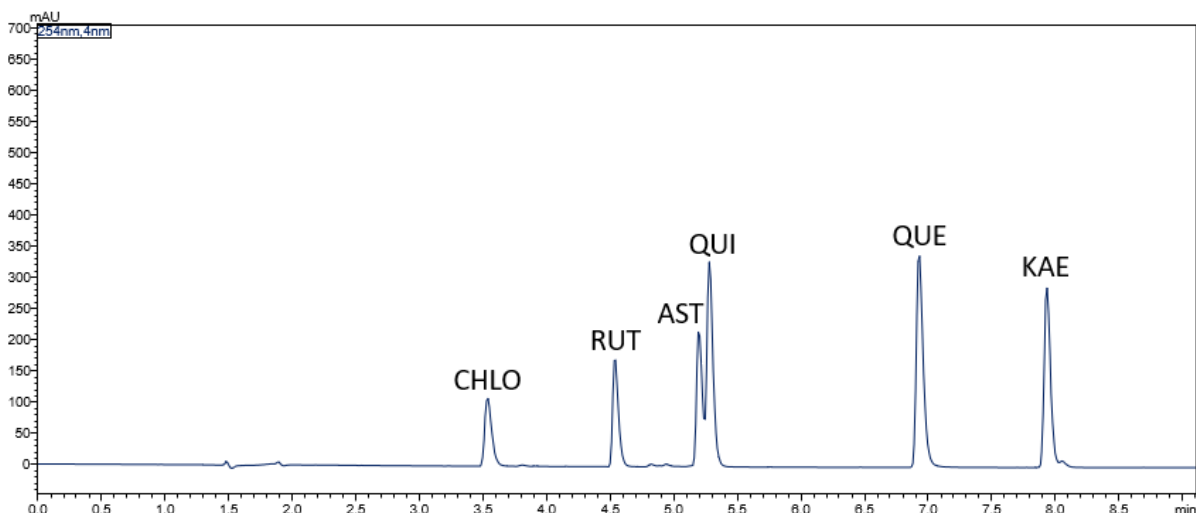
### 5.1.2.5 Kolona č. 8: Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm



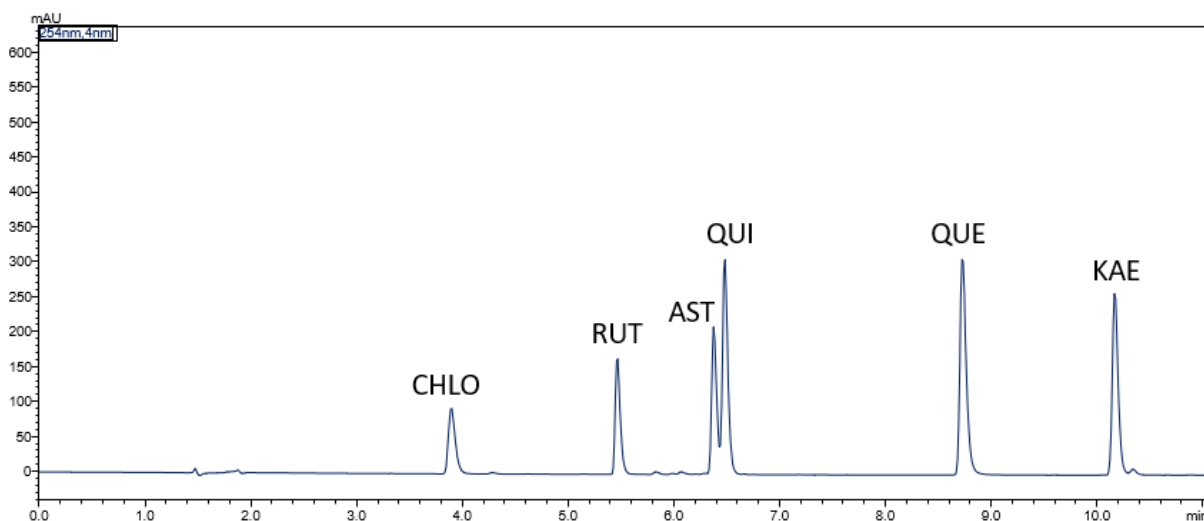
Obrázek 28: Chromatogram separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm při gradientu č. 1



Obrázek 29: Chromatogram separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm při gradientu č. 2



Obrázek 30: Chromatogram separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm při gradientu č. 3



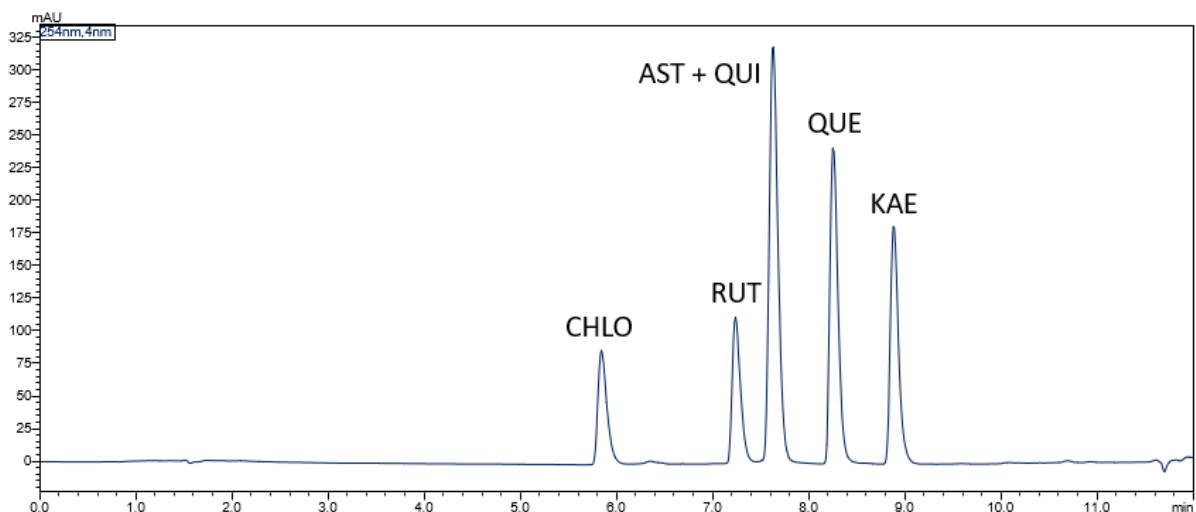
Obrázek 31: Chromatogram separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm při gradientu č. 4

Separáčnı́ účinnost této kolony byla ze všech kolon nejvyšší, proto byla tato kolona vybrána pro validaci metody a stanovení látek v doplňcích stravy.

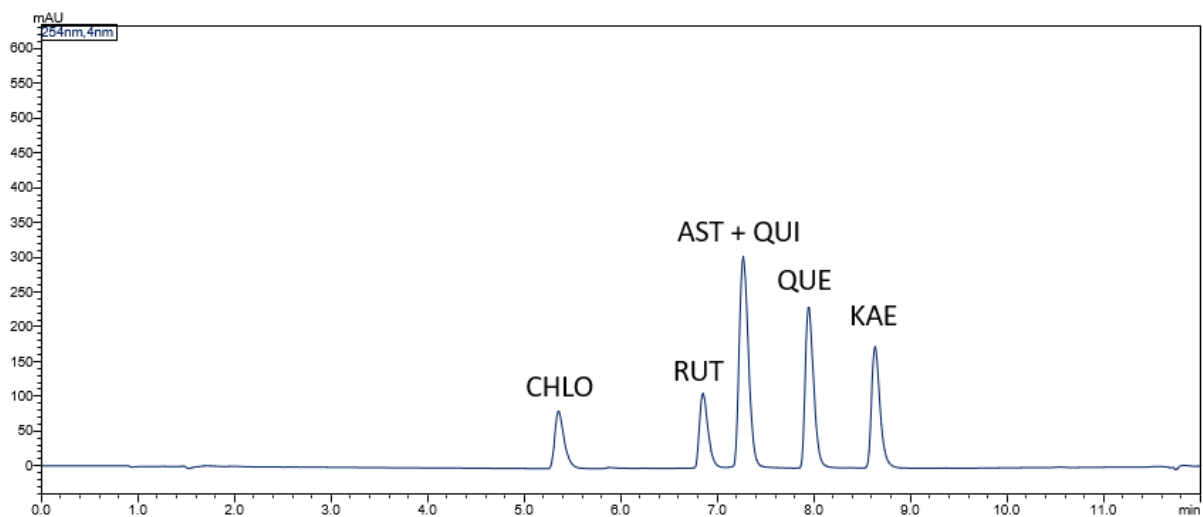
### 5.1.3 Volba složení mobilní fáze

Během optimalizace separace byl na vybraných kolonách jako organická mobilní fáze místo acetonitrilu zkoušen i 100% methanol. Toto rozpouštědlo se ale neosvědčilo, separace byla v porovnání se separací za použití acetonitrilu méně účinná a vyžadovala delší čas. Níže jsou uvedeny chromatogramy separace na koloně č. 2 - YMC Triart C-18 ExRS 150 x 4,6 mm; 3 μm za použití methanolu. Záznamy separace na stejné koloně při použití acetonitrilu jsou uvedeny na obrázcích 12–15.

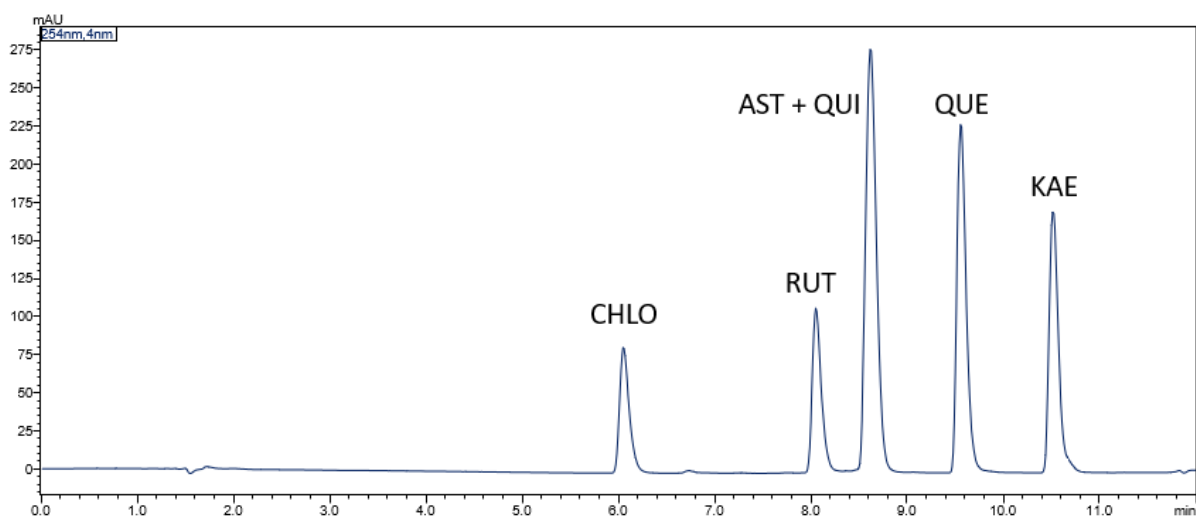




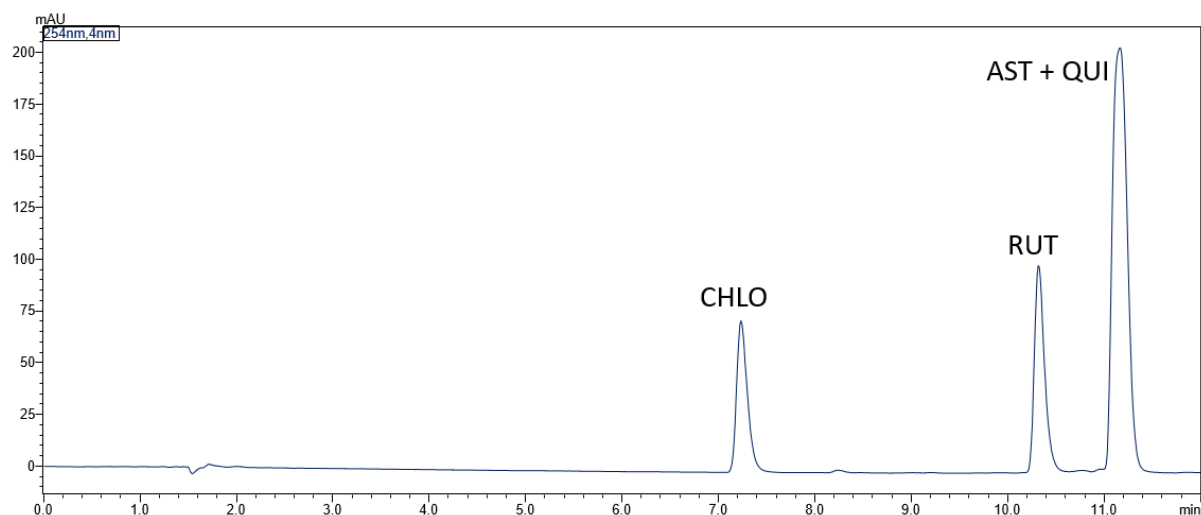
Obrázek 32: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 ExRS 150 × 4,6 mm; 3 μm při gradientu č. 1 za použití methanolu jako organické mobilní fáze



Obrázek 33: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 ExRS 150 × 4,6 mm; 3 μm při gradientu č. 2 za použití methanolu jako organické mobilní fáze



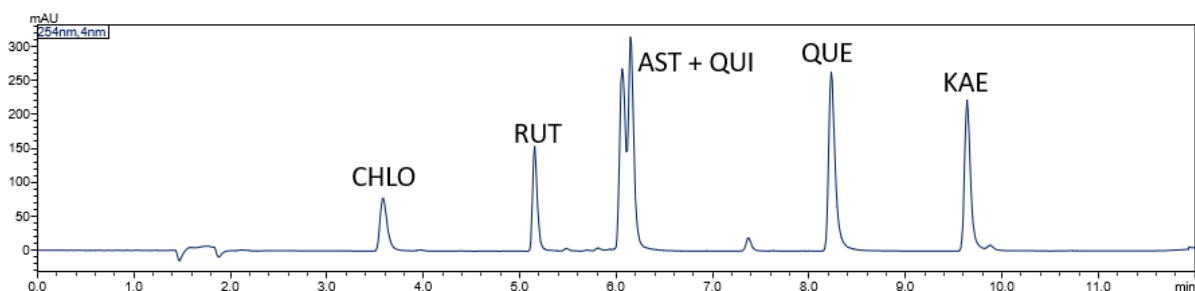
Obrázek 34: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 ExRS 150 × 4,6 mm; 3 μm při gradientu č. 3 za použití methanolu jako organické mobilní fáze



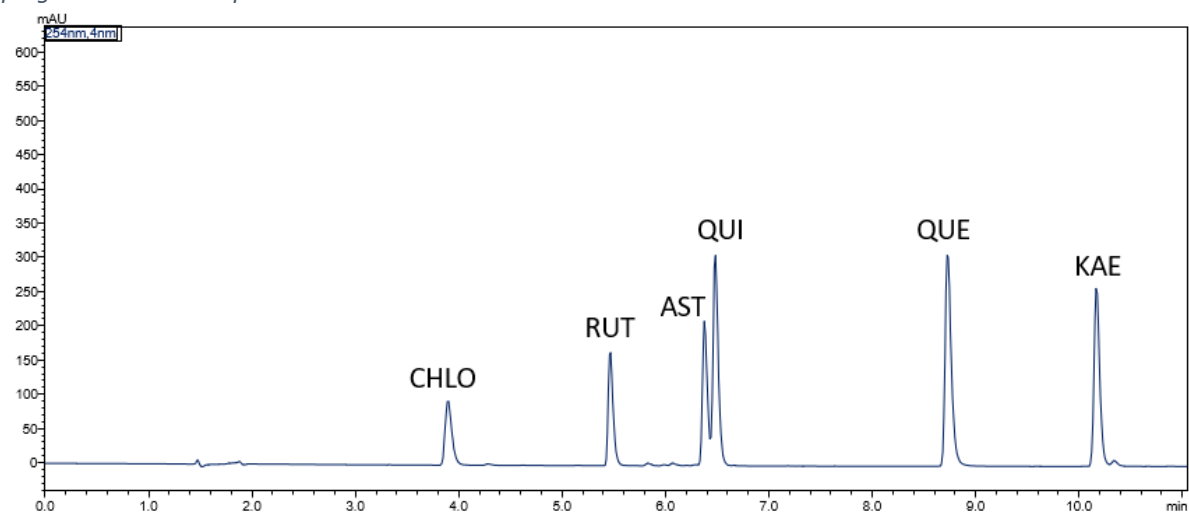
Obrázek 35: Chromatogram separace na koloně YMC Triart C-18 ExRS 150 × 4,6 mm; 3 μm při gradientu č. 4 za použití methanolu jako organické mobilní fáze

### 5.1.4 Volba teploty

Za účelem urychlení separace byla zkoušena i vyšší teplota – 40 °C. Doba separace se sice mírně zkrátila, účinnost ale byla nedostatečná, a proto se pro optimalizaci a stanovení látek v doplňcích stravy použila původní teplota 30 °C.

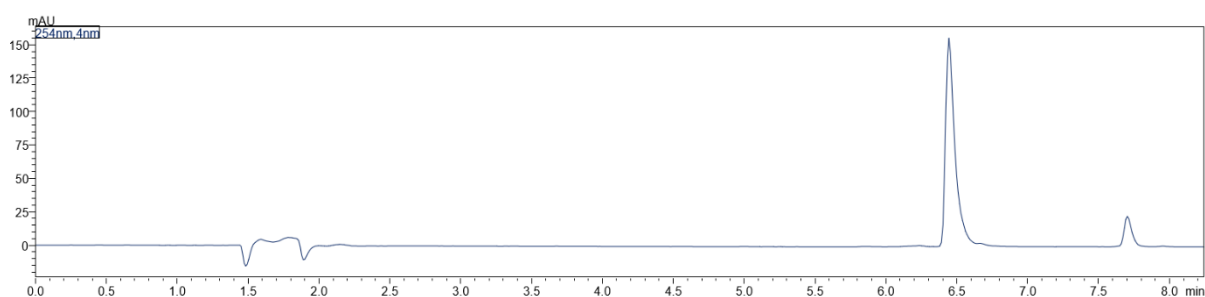


Obrázek 36: Chromatogram separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm při gradientu č. 4 a teplotě 40 °C

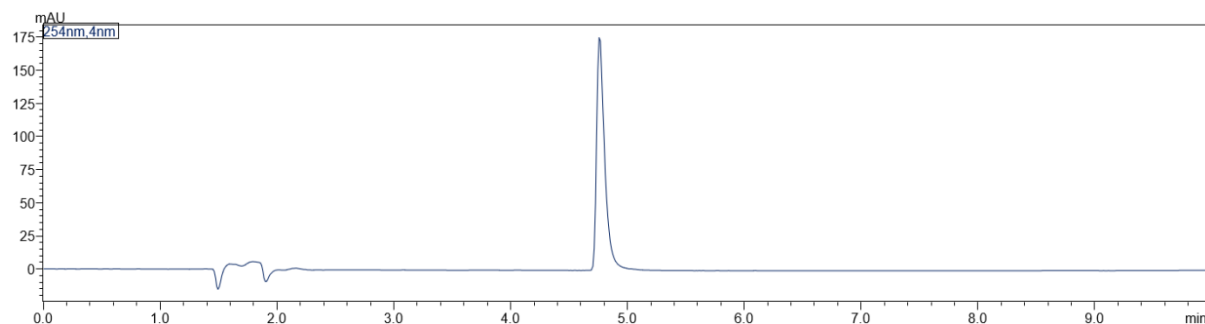


Obrázek 37: Chromatogram separace na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm při gradientu č. 4 a teplotě 30 °C

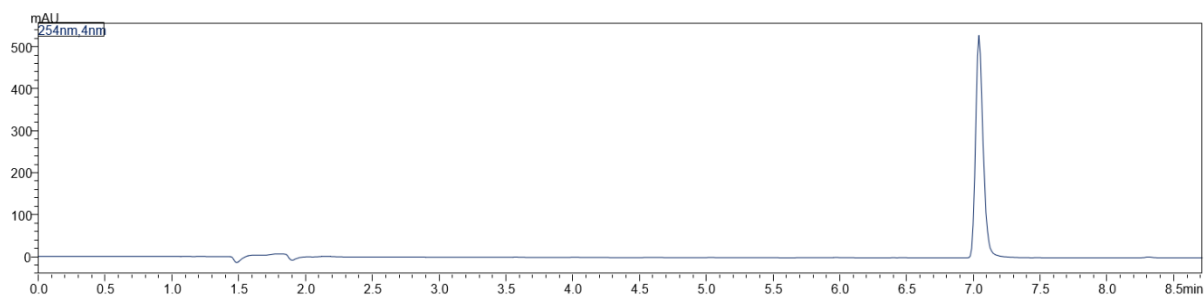
Jak již bylo uvedeno výše, po následném testování metody na reálných extraktech bylo na základě spektrálních dat a retenčních časů zjištěno, že astragalin a quercitrin nejsou v doplňcích stravy přítomny a v retenčním čase kritického páru byla detekována jiná látka, která byla po dalších experimentech potvrzena jako kyselina 3,5-dikafeoylchinová. Její přítomnost byla zjištěna na základě testování retenčního času a spekter dalších testovaných analytů, kde právě kyselina 3,5-dikafeoylchinová vykazovala shodu v retenčním čase i absorpčním spektru s látkou přítomnou v extraktech. Mezi dalšími testovanými analyty byla kyselina 1,3-dikafeoylchinová, kyselina kumarová a kumarin. Níže jsou uvedeny chromatogramy testovaných látek i chromatogram konečné směsi, na které potom byla provedena validace.



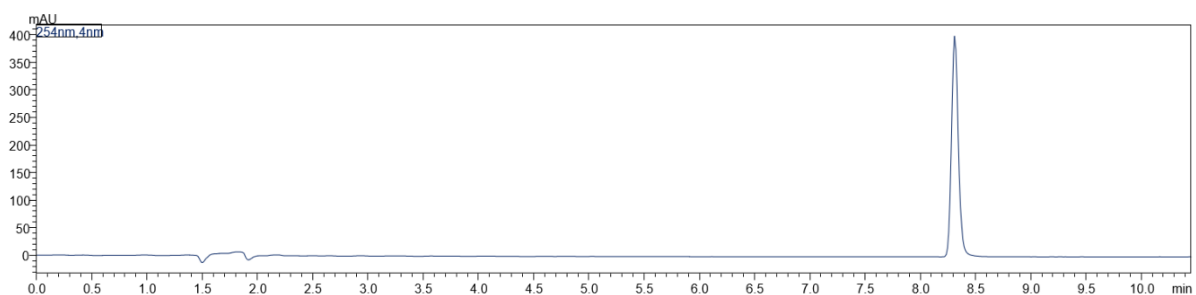
Obrázek 38: Chromatogram kyseliny 3,5-dikafeoylchinové na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm při gradientu č. 4



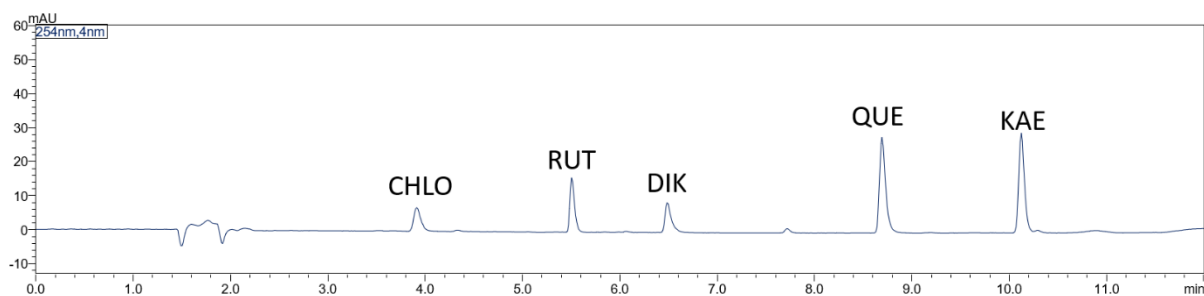
Obrázek 39: Chromatogram kyseliny 1,3-dikafeoylchinové na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm při gradientu č. 4



Obrázek 40: Chromatogram kyseliny kumarové na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm při gradientu č. 4



Obrázek 41: Chromatogram kumarinu na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm při gradientu č. 4



Obrázek 42: Chromatogram separace analyzované směsi na koloně Ascentis Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm, 2,7 μm za validovaných podmínek

## 5.2 Validace vyvinuté metody

### 5.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Pro test vhodnosti chromatografického systému byl použit roztok standardů na koncentrační hladině 50 mg/l. Směsný roztok standardů byl dávkován šestkrát v objemu 10  $\mu$ l. Byly hodnoceny následující parametry: opakovatelnost retenčních časů ( $t_r$ ), šířka v polovině píku ( $w_{50}$ ), kapacitní faktor ( $k$ ), faktor symetrie ( $A_s$ ) a rozlišení píků ( $R_s$ ).

Tabulka 13: Test vhodnosti chromatografického systému

Standard	$t_r$ (min)	$t_r$ RSD (%)	$w_{50}$ (min)	$k$	$A_s$	$R_s$
Kyselina chlorogenová	3,83	0,15	0,08	1,10	1,52	12,47
Kyselina 3,5-dikafeoylchinová	6,42	0,11	0,07	2,52	1,97	8,23
Rutin	5,40	0,13	0,06	1,96	1,38	11,98
Quercetin	8,66	0,09	0,07	3,74	1,39	16,44
Kaempferol	10,11	0,08	0,06	4,53	1,24	11,08

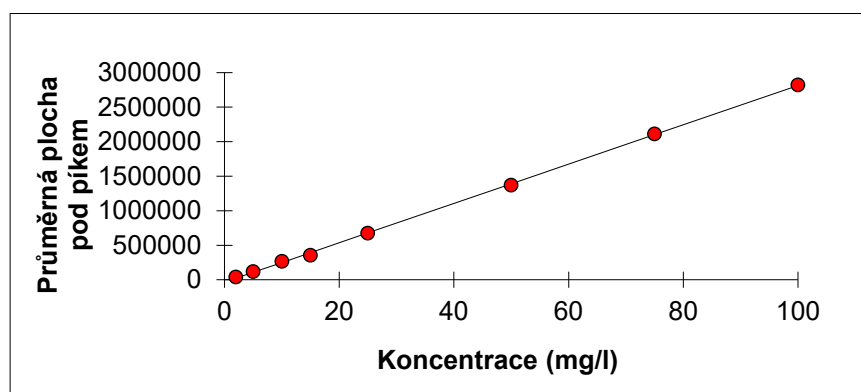
### 5.2.2 Linearita

Ke stanovení linearity bylo použito osm roztoků v rozmezí koncentrací 2–100 mg/l, popis přípravy je uveden v kapitole 4.5.4. Byly provedeny 3 analýzy od každé koncentrace, k hodnocení byly použity průměrné hodnoty ploch pod píky. Výsledky byly hodnoceny metodou lineární regrese, jako závislost průměru plochy píku na koncentraci.

## Kalibrační závislost kyseliny chlorogenové

Tabulka 14: Kalibrační závislost pro kyselinu chlorogenovou

Koncentrace roztoku (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2	38541
5	119609
10	265056
15	352227
25	674486
50	1370935
75	2110071
100	2820784



Obrázek 43: Kalibrační závislost pro kyselinu chlorogenovou

Tabulka 15: Parametry lineární regrese pro kyselinu chlorogenovou

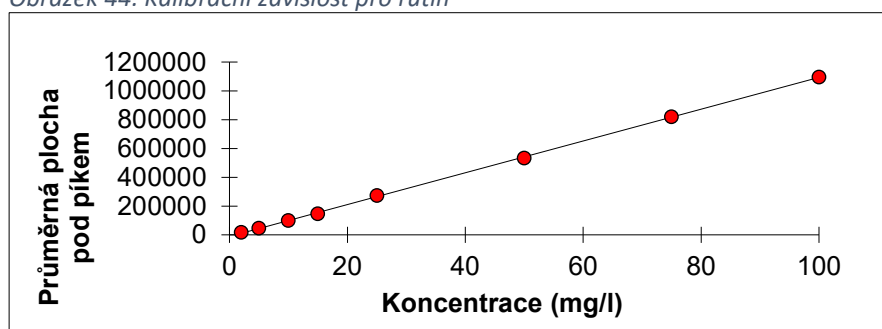
Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$			
Počet bodů	n	8	Odhad chyby ± 222,7623 ± 10885,76
Směrnice	k	28493,91	
Absolutní člen	q	-35446,82	
Korelační koeficient	r	0,999817	
Reziduální odchylka	s	21324,18	

## Kalibrační závislost rutinu

Tabulka 16: Kalibrační závislost pro rutin

Koncentrace roztoku (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2	15800
5	44821
10	97938
15	146344
25	271892
50	532691
75	820373
100	1094754

Obrázek 44: Kalibrační závislost pro rutin



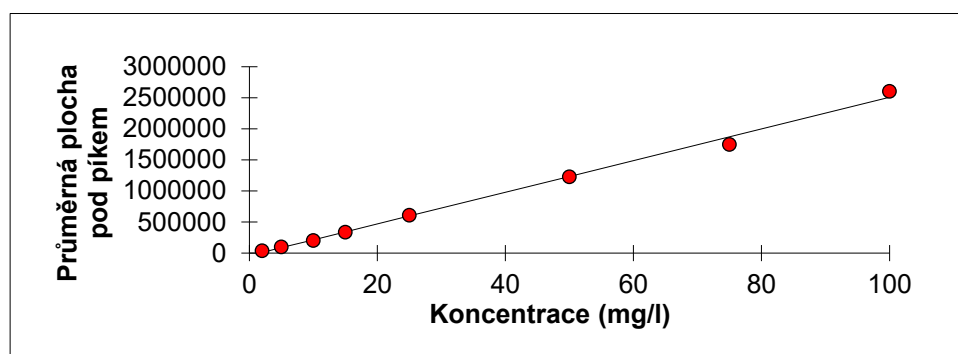
Tabulka 17: Parametry lineární regrese pro rutin

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$			
Počet bodů	n	8	Odhad chyby ± 63,70796 ± 3113,228
Směrnice	k	11049,04	
Absolutní člen	q	-11401,97	
Korelační koeficient	r	0,9999	
Reziduální odchylka	s	6098,519	

### Kalibrační závislost kyseliny 3,5-dikafeoylchinové

Tabulka 18: Kalibrační závislost pro kyselinu 3,5-dikafeoylchinovou

Koncentrace roztoku (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2	37169
5	100055
10	204286
15	337770
25	609279
50	1226710
75	1745421
100	2604497



Obrázek 45: Kalibrační závislost pro kyselinu 3,5-dikafeoylchinovou

Tabulka 19: Parametry lineární regrese pro kyselinu 3,5-dikafeoylchinovou

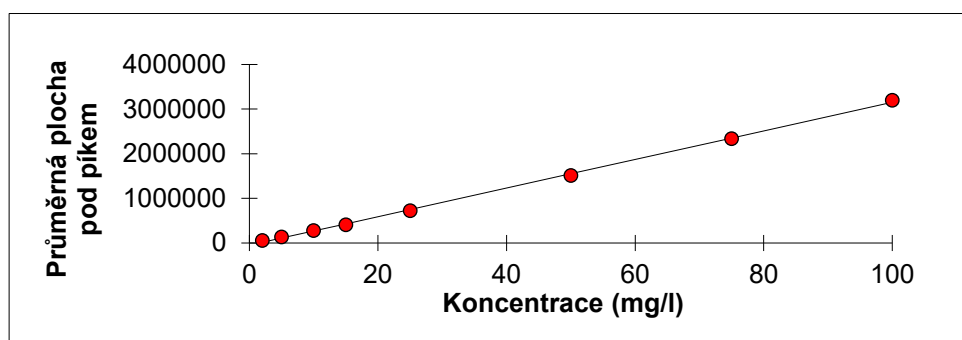
Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$			
Počet bodů	n	8	Odhad chyby ± 691,1163 ± 33772,9
Směrnice	k	25493,53	
Absolutní člen	q	-40498,44	
Korelační koeficient	r	0,997802	
Reziduální odchylka	s	66157,92	



## Kalibrační závislost quercetinu

Tabulka 20: Kalibrační závislost pro quercetin

Koncentrace roztoku (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2	52093
5	135083
10	275188
15	408888
25	724506
50	1510069
75	2335942
100	3195066



Obrázek 46: Kalibrační závislost pro quercetin

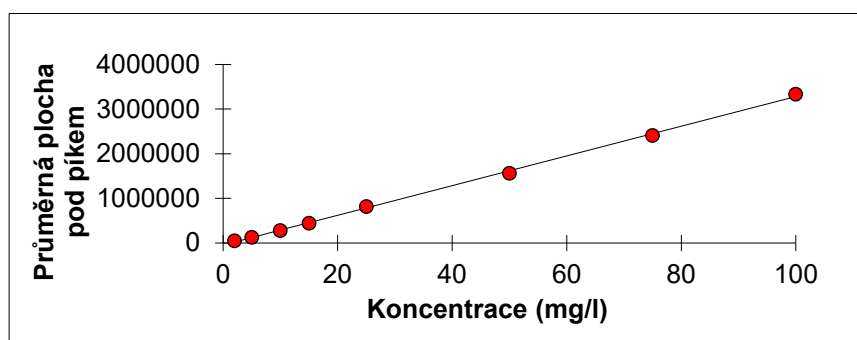
Tabulka 21: Parametry lineární regrese pro quercetin

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$			
Počet bodů	n	8	Odhad chyby ± 356,6942 ± 17430,63
Směrnice	k	32033,04	
Absolutní člen	q	-49560,11	
Korelační koeficient	r	0,999628	
Reziduální odchylka	s	34144,97	

## Kalibrační závislost kaempferolu

Tabulka 22: Kalibrační závislost pro kaempferol

Koncentrace roztoku (mg/l)	Průměrná plocha pod píkem
2	49050
5	128763
10	280439
15	442713
25	817209
50	1561173
75	2411018
100	3334127



Obrázek 47: Kalibrační závislost pro kaempferol

Tabulka 23: Parametry lineární regrese pro kaempferol

Statistické parametry pro regresi: $y = kx + q$			
Počet bodů	n	8	Odhad chyby ± 414,8512 ± 20272,6
Směrnice	k	33262,57	
Absolutní člen	q	-44444,18	
Korelační koeficient	r	0,999534	
Reziduální odchylka	s	39712,12	

### 5.2.3 Opakovatelnost

Pro vyhodnocení opakovatelnosti byly využity směsné roztoky standardů kyseliny chlorogenové, kyseliny 3,5-dikafeoylchinové, rutinu, quercetinu a kaempferolu na koncentračních hladinách 5 mg/l, 50 mg/l a 100 mg/l. Příprava roztoků je popsána v kapitole 4.5.4. Každý vzorek byl dávkován osmkrát v objemu 10  $\mu$ l. Relativní směrodatná odchylka byla u všech vzorků pod 1 %.

Tabulka 24: Výsledky opakovatelnosti

Standard	RSD (%) dle koncentrační hladiny		
	5 mg/l	50 mg/l	100 mg/l
Kyselina chlorogenová	0,42	0,45	0,54
Kyselina 3,5-dikafeolchinová	0,76	0,70	0,96
Rutin	0,69	0,27	0,97
Quercetin	0,37	0,17	0,70
Kaempferol	0,77	0,39	0,46

### 5.2.4 Správnost

Pro vyhodnocení správnosti byl analyzován přípravek Celík zlatobýl od firmy Valdemar Grešík. Bylo připraveno 6 roztoků vzorku s přidavkem všech pěti standardů, dva směsné roztoky standardů a tři roztoky vzorku. Detailní popis přípravy roztoků je uveden v kapitole 4.5.5. Každý roztok byl dávkován třikrát v objemu nástřiku 10  $\mu$ l. Správnost se u jednotlivých látek pohybovala v rozmezí 93 až 103 %.

## Kyselina chlorogenová

Tabulka 25: Výsledky správnosti pro kyselinu chlorogenovou

	<b>Průměr ploch</b>	<b>Výtěžnost (%)</b>
<b>Vzorek 1</b>	3181147	101,84
<b>Vzorek 2</b>	3132716	98,60
<b>Vzorek 3</b>	3113113	97,29
<b>Vzorek 4</b>	3208413	103,66
<b>Vzorek 5</b>	3174902	101,42
<b>Vzorek 6</b>	3198161	102,97
<b>Průměr</b>	3168075	<b>100,96</b>
<b>Směrodatná odchylka SD</b>	34208	
<b>RSD (%)</b>	1,08	

## Kyselina 3,5-dikafeoylchinová

Tabulka 26: Výsledky správnosti pro kyselinu 3,5-dikafeoylchinovou

	<b>Průměr ploch</b>	<b>Výtěžnost (%)</b>
<b>Vzorek 1</b>	1914090	93,74
<b>Vzorek 2</b>	1898430	92,62
<b>Vzorek 3</b>	1892033	92,17
<b>Vzorek 4</b>	1920029	94,16
<b>Vzorek 5</b>	1914242	93,75
<b>Vzorek 6</b>	1900104	92,74
<b>Průměr</b>	1906488	<b>93,19</b>
<b>Směrodatná odchylka SD</b>	10132	
<b>RSD (%)</b>	0,53	

## Rutin

Tabulka 27: Výsledky správnosti pro rutin

	<b>Průměr ploch</b>	<b>Výtěžnost (%)</b>
<b>Vzorek 1</b>	1312939	104,91
<b>Vzorek 2</b>	1285601	100,53
<b>Vzorek 3</b>	1269290	97,91
<b>Vzorek 4</b>	1308086	104,13
<b>Vzorek 5</b>	1288622	101,01
<b>Vzorek 6</b>	1314954	105,23
<b>Průměr</b>	1296582	<b>102,29</b>
<b>Směrodatná odchylka SD</b>	16665	
<b>RSD (%)</b>	1,29	

## Quercetin

Tabulka 28: Výsledky správnosti pro quercetin

	<b>Průměr ploch</b>	<b>Výtěžnost (%)</b>
<b>Vzorek 1</b>	1722955	97,29
<b>Vzorek 2</b>	1729381	97,66
<b>Vzorek 3</b>	1763059	99,61
<b>Vzorek 4</b>	1781520	100,68
<b>Vzorek 5</b>	1706190	96,32
<b>Vzorek 6</b>	1740861	98,32
<b>Průměr</b>	1740661	<b>98,31</b>
<b>Směrodatná odchylka SD</b>	25167	
<b>RSD (%)</b>	1,45	

## Kaempferol

Tabulka 29: Výsledky správnosti pro kaempferol

	<b>Průměr ploch</b>	<b>Výtěžnost (%)</b>
<b>Vzorek 1</b>	1727544	97,82
<b>Vzorek 2</b>	1738576	98,45
<b>Vzorek 3</b>	1733409	98,16
<b>Vzorek 4</b>	1670260	94,53
<b>Vzorek 5</b>	1711093	96,87
<b>Vzorek 6</b>	1686642	95,47
<b>Průměr</b>	1711254	<b>96,88</b>
<b>Směrodatná odchylka SD</b>	25130	
<b>RSD (%)</b>	1,47	

### 5.2.5 Přesnost

K vyhodnocení přesnosti bylo využito 6 roztoků, jejichž příprava byla popsána v kapitole 4.5.6. Každý roztok byl analyzován třikrát v dávkovaném objemu 10  $\mu$ l. Relativní odchylka nepřekročila u žádného ze vzorků 1,5 %.

Tabulka 30: Výsledky přesnosti pro kapky Celík zlatobýl od firmy Valdemar Grešík

	<b>Průměr ploch</b>	<b>SD</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>Kyselina chlorogenová</b>	3168075	34208	1,08
<b>Kyselina 3,5-dikafeoylchinová</b>	1906488	10132	0,53
<b>Rutin</b>	1296582	16665	1,29
<b>Quercetin</b>	1740661	25167	1,45
<b>Kaempferol</b>	1711254	25130	1,47

### 5.3 Stanovení vzorků

Vyvinutá a validovaná metoda byla použita ke stanovení obsahu vybraných látek u dvanácti doplňků stravy. Byl stanovován obsah kyseliny chlorogenové (CHLO), kyseliny 3,5-dikafeoylchinové (DIK), rutinu (RUT), quercetinu (QUE) a kaempferolu (KAE). Od každého doplňku stravy byly připraveny tři vzorky k analýze, které byly měřeny vždy ve dvou nástřících o objemu 10  $\mu$ l. Z průměrných ploch píků byl potom stanoven průměr. Výsledná koncentrace látek v kapkách nebo obsah látek v tabletách či tobolkách byl vypočítán pomocí rovnice lineární regrese získané při měření vzorků standardů. Při výpočtu obsahu analyzovaných látek bylo zohledněno ředění, čistota a navážka standardu, a navážka odpovídající části tobolky/tablety. U tablet a tobolek byl vypočítán obsah daných látek v jedné tabletě/tobolce.

#### 5.3.1 Hmotnost obsahu tobolek/tablet vybraných doplňků stravy

Tabulka 31: Hmotnost obsahu tobolek/tablet vybraných doplňků stravy

Doplňěk stravy	Hmotnost 10 tobolek/tablet (g)	Průměrná hmotnost 1 tobolky/tablety (g)
<b>Celík (Ex Herbis)</b>	2,5103	0,25103
<b>Rutin (Solgar)</b>	10,0746	1,00746
<b>Rutin (Walmart®)</b>	2,3405	0,23405
<b>Zelená káva (Botanic)</b>	4,9648	0,49648

V následujících tabulkách je uvedeno zjištěné množství zkoumaných látek v doplňcích stravy. U kapek byly vypočítány koncentrace látek v mg/l, u tobolek a tablet byl zjištěný obsah látek vztažen na 1 tobolku/tabletu. U doplňků stravy Rutin (Walmart®), Rutin (Solgar) a Zelená káva (Botanic) je uvedeno srovnání s hodnotou, kterou uvádí výrobce. U kapek ani u tobolek Celík (Ex Herbis) tyto údaje nejsou uvedeny. Níže jsou zobrazeny chromatogramy separace vybraných doplňků stravy.

### 5.3.2 Stanovení obsahu doplňků stravy se zlatobýlem

Tabulka 32: Stanovení obsahu kapek se zlatobýlem (v mg/l)

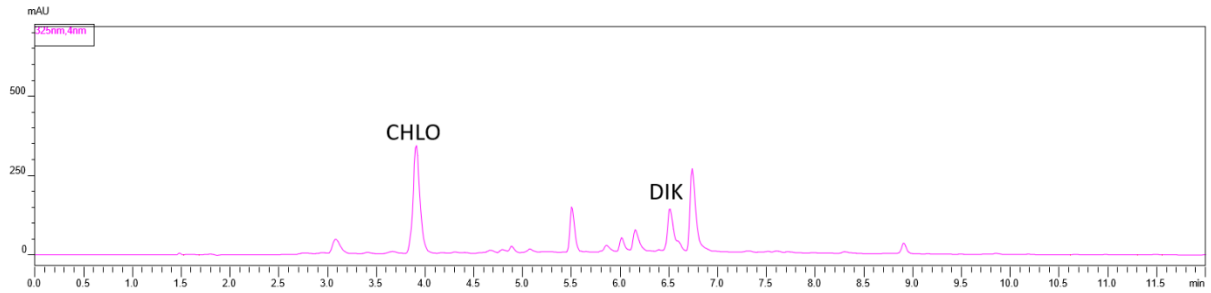
	<b>CHLO (mg/l)</b>	<b>DIK (mg/l)</b>	<b>RUT (mg/l)</b>	<b>QUE (mg/l)</b>	<b>KAE (mg/l)</b>	<b>Suma všech látek (mg/l)</b>
<b>Celík zlatobýl (Valdemar Grešík)</b>	303,72	111,92	223,81	9,15	9,50	658,09
<b>Celík obecný BIO (Bylinné kapky)</b>	108,18	35,80	29,02	12,79	11,22	197,00
<b>Celík obecný (Bylinné kapky)</b>	95,34	273,50	98,61	12,68	9,93	490,06
<b>Zlatobýl obecný (Green Idea)</b>	58,79	ne	707,00	13,80	8,44	788,03
<b>Zlatobýl – tinktura z pupenů (Serafin)</b>	42,94	22,08	18,31	ne	ne	83,32
<b>Zlatobýl – tinktura z bylin (Serafin)</b>	ne	ne	9,61	ne	ne	9,61
<b>Zlatobýlová směs (Dědek kořenář)</b>	290,33	171,19	291,74	15,24	19,09	787,59
<b>Zlatobýl (Inca Botanica)</b>	775,61	701,98	323,96	18,57	15,99	1836,11

Tabulka 33: Stanovení obsahu tobolek se zlatobýlem (v mg v 1 tobolce)

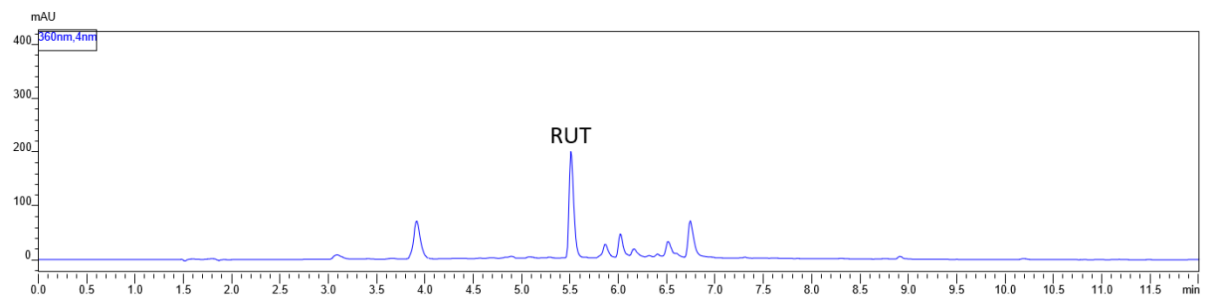
	<b>CHLO (mg)</b>	<b>DIK (mg)</b>	<b>RUT (mg)</b>	<b>QUE (mg)</b>	<b>KAE (mg)</b>	<b>Všech 5 látek (mg)</b>
<b>Celík (Ex Herbis)</b>	0,96	2,07	1,05	0,04	0,02	4,14



### 5.3.2.1 Celík zlatobýl (Valdemar Grešík)

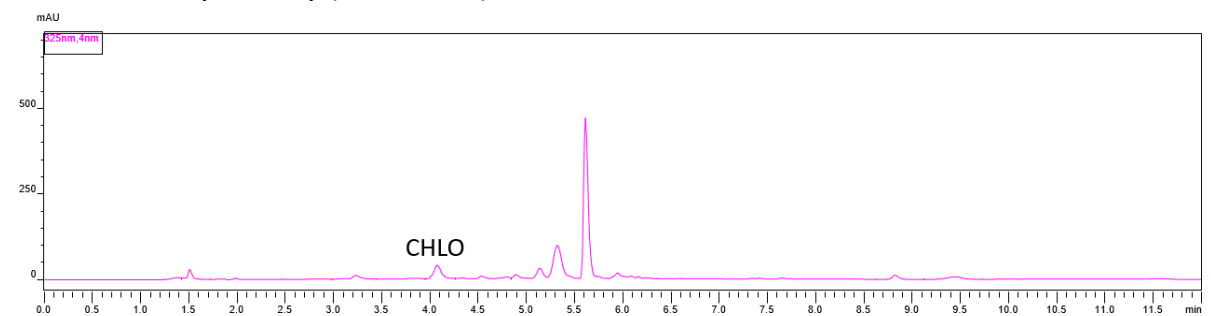


Obrázek 48: Chromatogram doplňku stravy Celík zlatobýl (Valdemar Grešík) při 325 nm

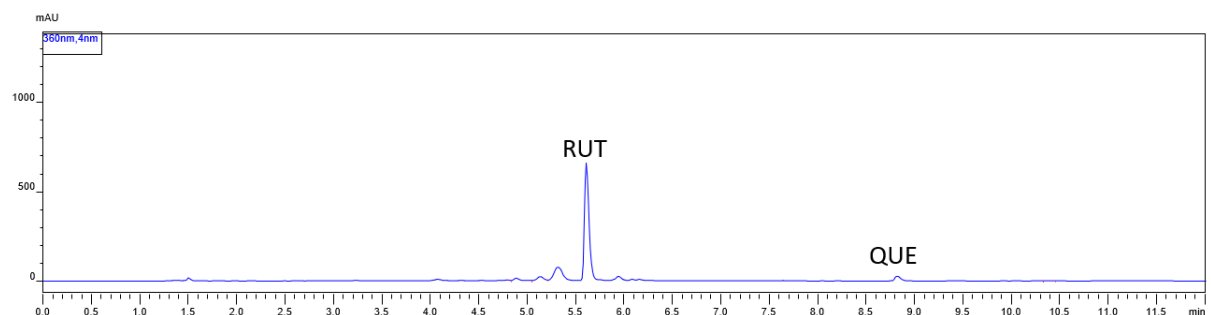


Obrázek 49: Chromatogram doplňku stravy Celík zlatobýl (Valdemar Grešík) při 360 nm

### 5.3.2.2 Zlatobýl obecný (Green Idea)

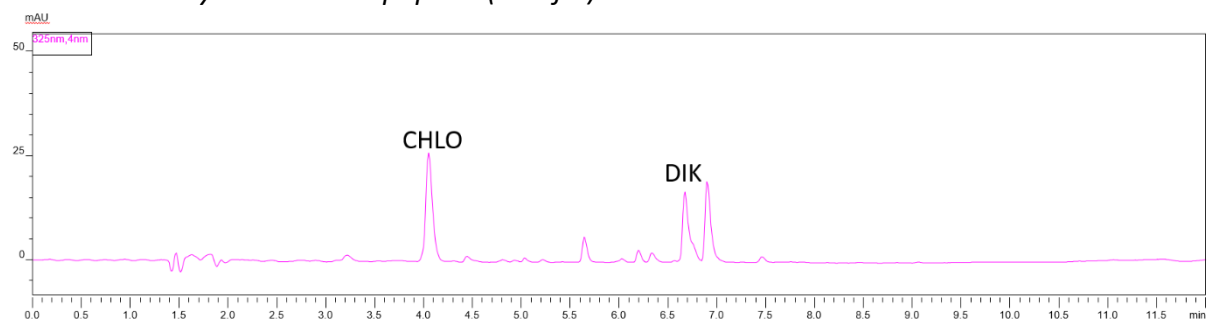


Obrázek 50: Chromatogram doplňku stravy Zlatobýl obecný (Green Idea) při 325 nm

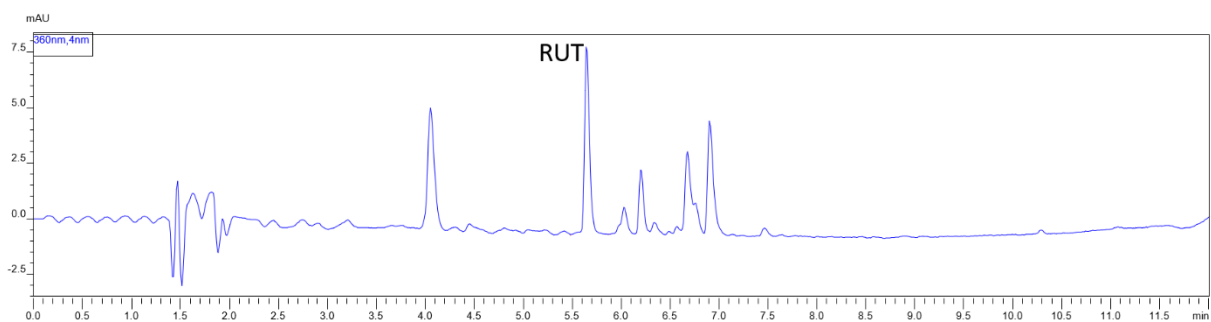


Obrázek 51: Chromatogram doplňku stravy Zlatobýl obecný (Green Idea) při 360 nm

### 5.3.2.3 Zlatobýl – tinktura z pupenů (Serafin)

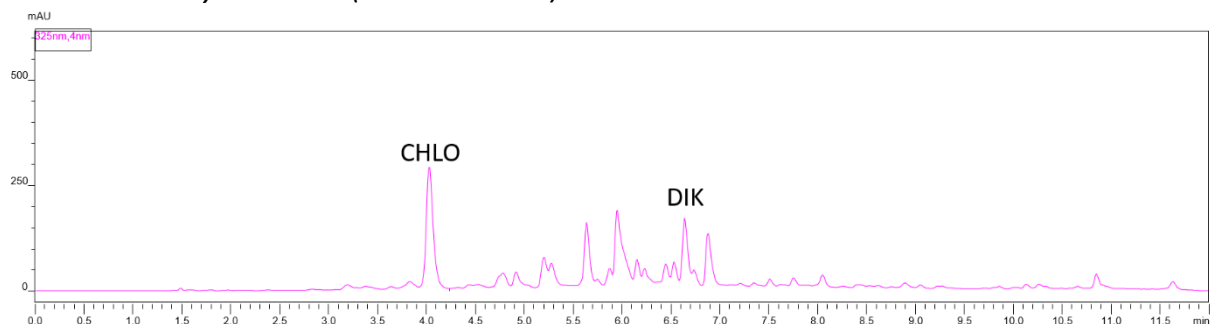


Obrázek 52: Chromatogram doplňku stravy Zlatobýl – tinktura z pupenů (Serafin) při 325 nm

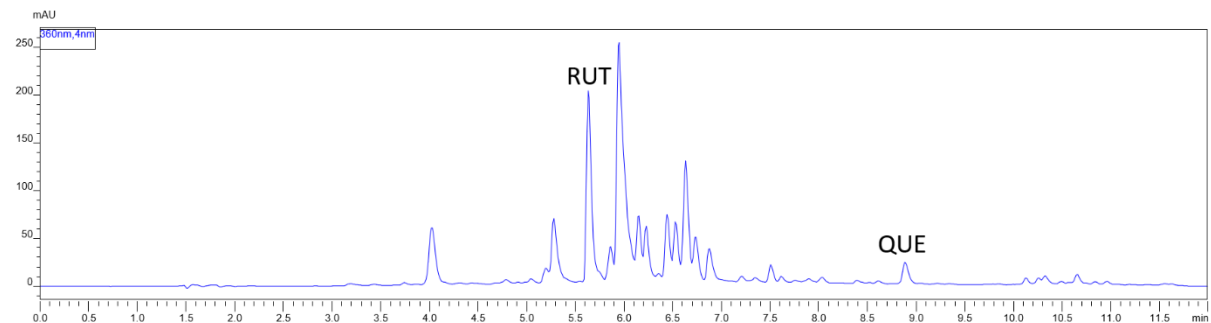


Obrázek 53: Chromatogram doplňku stravy Zlatobýl – tinktura z pupenů (Serafin) při 360 nm

### 5.3.2.4 Zlatobýlová směs (Dědek kořenář)

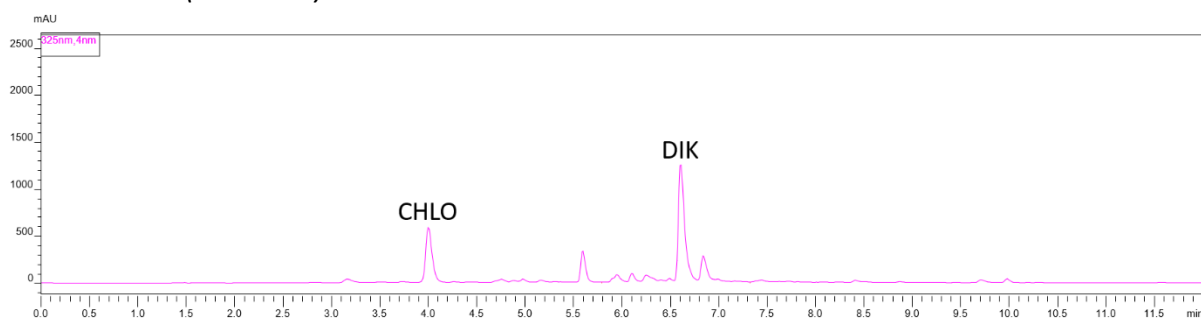


Obrázek 54: Chromatogram doplňku stravy Zlatobýlová směs (Dědek kořenář) při 325 nm

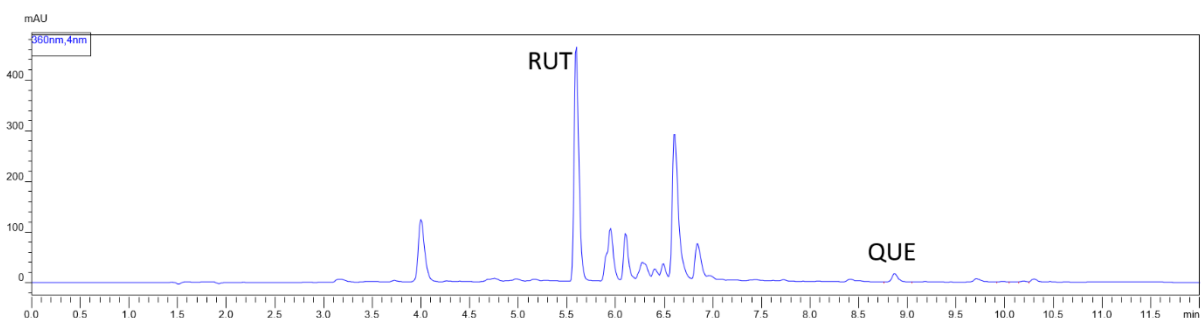


Obrázek 55: Chromatogram doplňku stravy Zlatobýlová směs (Dědek kořenář) při 360 nm

### 5.3.2.5 Celík (Ex Herbis)



Obrázek 56: Chromatogram doplňku stravy Celík (Ex Herbis) při 325 nm

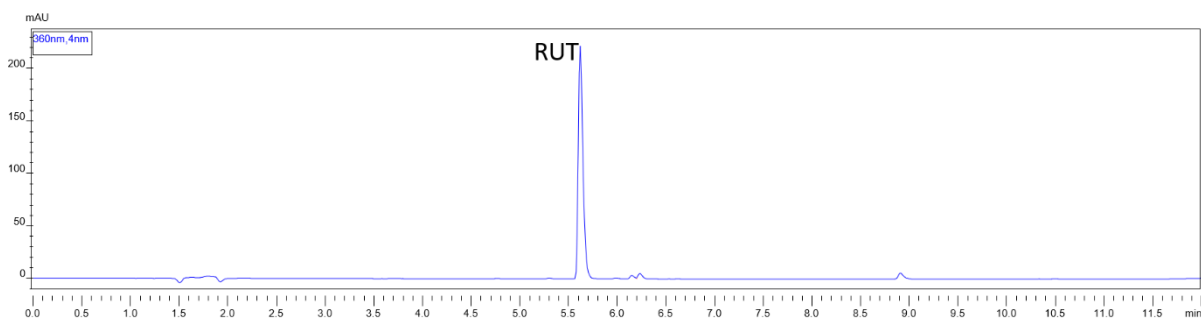


Obrázek 57: Chromatogram doplňku stravy Celík (Ex Herbis) při 360 nm

### 5.3.3 Stanovení obsahu doplňků stravy s rutinem

Tabulka 34: Stanovení obsahu doplňků stravy s rutinem

	Množství rutinu v 1 tabletě (mg)	Porovnání s deklarovaným množstvím (%)
Rutin (Solgar)	577,25	115,45
Rutin (Walmark®)	51,62	103,24

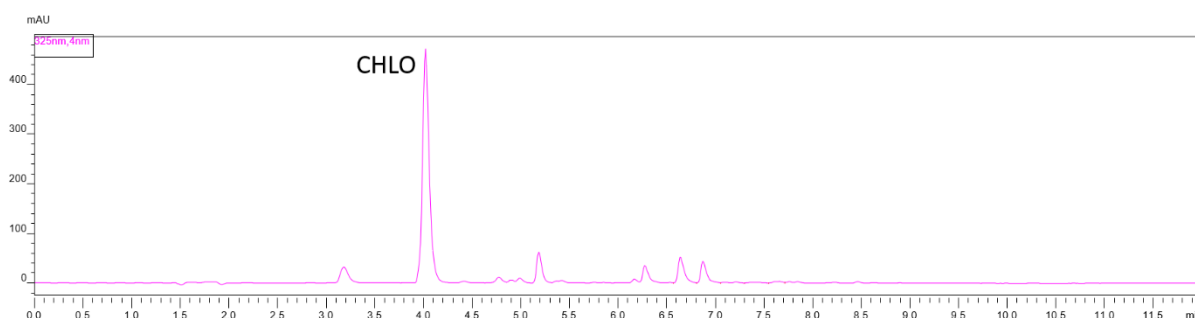


Obrázek 58: Chromatogram doplňku stravy Rutin (Walmark®) při 360 nm

### 5.3.4 Stanovení obsahu doplňků stravy se zelenou kávou

Tabulka 35: Stanovení obsahu doplňků stravy se zelenou kávou

	Množství k. chlorogenové v 1 tobolce (mg)	Porovnání s deklarovaným množstvím (%)
Zelená káva (Botanic)	167,01	67,28



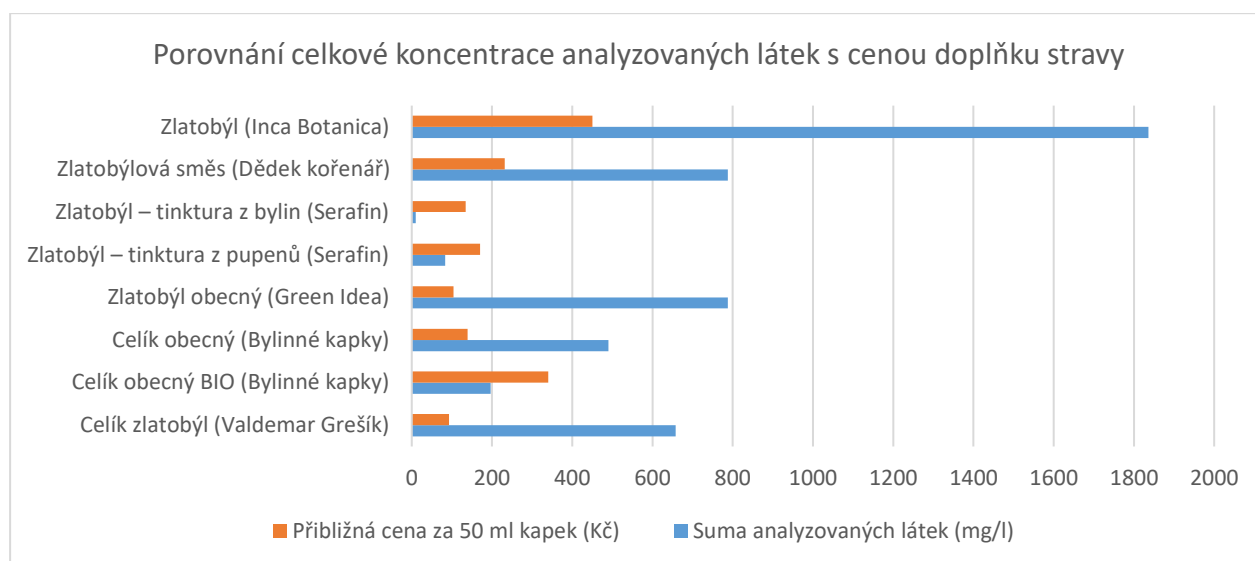
Obrázek 59: Chromatogram doplňku stravy Zelená káva (Botanic) při 325 nm

### 5.3.5 Vyhodnocení kvality doplňků stravy

Obsahy zkoumaných látek v jednotlivých kapkách zlatobýlu se mezi sebou výrazně lišily. Největší celkovou koncentraci všech zkoumaných látek dosáhl přípravek Zlatobýl od výrobce Inca Botanica – 1836 mg/l, následovaly přípravky Zlatobýlová směs (Dědek kořenář) a Zlatobýl obecný (Green Idea) – 788 mg/l, dále pak Celík zlatobýl (Valdemar Grešík) – 658 mg/l. Naopak nejméně látek obsahoval přípravek Zlatobýl – tinktura z bylin od výrobce Serafin – pouze 10 mg/l. V tobolkách Celík od firmy Ex Herbis bylo nalezeno pouze nízké množství zkoumaných látek – 4,1 mg v jedné tobolce. V přípravcích byly přítomné i další látky, které se ale nepodařilo identifikovat a které navíc zhoršovaly i spolehlivou kvantifikaci kyseliny 3,5-dikafeoylchinové. Proto získané hodnoty pro kyselinu 3,5-dikafeoylchinovou nelze brát za zcela správné. Oba doplňky stravy s obsahem rutinu převyšovaly svým obsahem množství rutinu, které deklaroval výrobce – přípravek firmy Solgar o 15 % a přípravek firmy Walmark® o 3 %. U přípravku Zelená káva od firmy Botanic bylo zjištěno menší množství kyseliny chlorogenové, než bylo udáváno – pouze 67 %.

### 5.3.6 Porovnání celkové koncentrace analyzovaných látek v kapkách se zlatobýlem s cenou doplňku stravy

Na obrázku 60 je znázorněno porovnání celkové koncentrace analyzovaných látek v kapkách se zlatobýlem (modře) s přibližnou cenou doplňku stravy uváděnou na internetu (oranžově). V poměru cena/obsah je pro zákazníka nejvýhodnější přípravek Zlatobýl obecný (Green Idea), následovaný přípravky Celík zlatobýl (Valdemar Grešík) a Zlatobýl (Inca Botanica). Naopak nejhůře v tomto hodnocení dopadl přípravek Zlatobýl – tinktura z bylin (Serafin).



Obrázek 60: Porovnání celkové koncentrace analyzovaných látek s cenou doplňku stravy

## 6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a validovat vhodnou HPLC metodu pro stanovení vybraných obsahových látek v doplňcích stravy na bázi zlatobýlu. Byl zkoumán obsah následujících látek: rutin, kyselina chlorogenová, kyselina 3,5-dikafeoylchinová, kaempferol a quercetin. Bylo vybráno devět potravních doplňků na bázi zlatobýlu – kapky Celík zlatobýl (Valdemar Grešík), Celík obecný BIO (Bylinné kapky), Celík obecný (Bylinné kapky), Zlatobýl obecný (Green Idea), Zlatobýl – tinktura z pupenů (Serafin), Zlatobýl – tinktura z bylin (Serafin), Zlatobýlová směs (Dědek kořenář) a Zlatobýl (Inca Botanica) a tobolky Celík (Ex Herbis). Analyzovány byly i dva doplňky stravy obsahující pouze rutin – tablety od firem Solgar a Walmark®. Jako poslední byl analyzován doplněk stravy Zelená káva (Botanic), u kterého výrobce deklaroval obsah 50 % kyseliny chlorogenové.

K analýze byla vybrána kolona Ascentis® Express 90 Å AQ-C18 150 × 4,6 mm s velikostí částic 2,7 μm. Separace probíhala v gradientovém režimu, jako organická složka byl zvolen čistý acetonitril, vodnou složku představovala 0,085% kyselina fosforečná. Analýza probíhala 12 minut, při 30 °C a rychlosti průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min. Na kolonu bylo dávkováno 10 μl vzorku.

Látky byly detekovány pomocí DAD detektoru při dvou vlnových délkách – 325 nm pro kyselinu chlorogenovou a kyselinu 3,5-dikafeoylchinovou a 360 nm pro rutin, quercetin a kaempferol.

V rámci validace metody byla ověřena linearita všech pěti stanovovaných látek v koncentračním rozmezí 2 – 100 mg/l. Bylo dosaženo korelačních koeficientů 0,9998 pro kyselinu chlorogenovou, 0,9999 pro rutin, 0,9978 pro kyselinu 3,5-dikafeoylchinovou, 0,9996 pro quercetin a 0,9995 pro kaempferol. Opakovatelnost metody měřena na koncentračních hladinách 5 mg/l, 50 mg/l a 100 mg/l a vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka byla zjištěna u všech koncentrací < 1 %. Test správnosti byl proveden na kapkách Celík zlatobýl od firmy Valdemar Grešík a pro jednotlivé látky byly dosaženy hodnoty výtěžnosti v rozmezí 93 – 103 %. Na stejných kapkách byla měřena i přesnost, která byla popsána relativní směrodatnou odchylkou – u jednotlivých látek se pohybovala do 1,5 %.

Byl proveden test vhodnosti chromatografického systému, ve kterém byly získány hodnoty faktoru symetrie pro jednotlivé látky od 1,24 do 1,97. Rozlišení píků se pohybovalo mezi 8,23 a 16,44. Kapacitní faktor nabýval hodnot od 1,10 do 4,53. Opakovatelnost

retenčních časů vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou nepřesahovala hodnotu 0,15 %. Šířka v polovině píku se u jednotlivých látek pohybovala od 0,06 do 0,08 minut.

Obsah látek v kapkách se zlatobýlem byl značně proměnlivý, největší součet zkoumaných látek obsahovaly kapky od výrobce Inca Botanica – 1836 mg/l, naopak nejméně kapky Zlatobýl – tinktura z bylin od firmy Serafin – necelých 10 mg/l. Při hodnocení přípravků poměrem cena/obsah je pro zákazníka nejvýhodnější přípravek Zlatobýl obecný (Green Idea), naopak nejméně výhodný je přípravek Zlatobýl – tinktura z bylin (Serafin). V tobolkách Celík od výrobce Ex Herbis bylo nalezeno pouze 4,1 mg stanovovaných látek v jedné tobolce.

U obou doplňků stravy s obsahem rutinu bylo nalezeno vyšší množství rutinu, než bylo deklarováno – u přípravku od firmy Solgar o 15 % a u přípravku firmy Walmark® o 3 %. V případě produktu Zelená káva od firmy Botanic bylo stanoveno pouze 67 % udávaného množství kyseliny chlorogenové.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] SÚKL, Rozlišení doplňků stravy od léčivých přípravků, (n.d.). <https://www.sukl.cz/leciva/rozliseni-doplňku-stravy-od-levicvych-pripravku> (accessed October 30, 2023).
- [2] Zlatobýl obecný: bioaktivní látky, (2022). <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=1257> (accessed September 19, 2023).
- [3] R. Prasad, S.B. Prasad, A review on the chemistry and biological properties of Rutin, a promising nutraceutical agent, *Asian J Pharm Pharmacol* 5 (2019) 1–20. <https://doi.org/10.31024/ajpp.2019.5.s1.1>.
- [4] M. Naveed, V. Hejazi, M. Abbas, A.A. Kamboh, G.J. Khan, M. Shumzaid, F. Ahmad, D. Babazadeh, X. FangFang, F. Modarresi-Ghazani, L. WenHua, Z. XiaoHui, Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research, *Biomed Pharmacother* 97 (2018) 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.064>.
- [5] L. Nováková, M. Douša, P. Česla, *Moderní HPLC separaci v teorii a praxi I., 2., Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, Brno, 2021.*
- [6] Bezpečnost potravin, Doplnky stravy, (n.d.). <https://bezpecnostpotravin.cz/kategorie/doplňky-stravy/> (accessed October 30, 2023).
- [7] SÚKL, Jaký je rozdíl mezi doplňky stravy a volně prodejnými léčivými přípravky?, (n.d.). <https://www.sukl.cz/leciva/jaky-je-rozdil-mezi-doplňky-stravy-a-volne-prodejnymi> (accessed October 30, 2023).
- [8] Státní zdravotní ústav, Doplnky stravy, zdravotní tvrzení, (n.d.). <https://szu.cz/temata-zdravi-a-bezpecnosti/zdravi-vyziva-a-bezpecnost-potravin-a-predmetu-bezneho-uzivani/doplňky-stravy-zdravotni-tvrzeni/zdravotni-tvrzeni/> (accessed December 31, 2023).
- [9] C. Fursenco, T. Calalb, L. Uncu, M. Dinu, R. Ancuceanu, *Solidago virgaurea L.: A Review of Its Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry, and Pharmacological Activities*, *Biomolecules* 10 (2020) 1619. <https://doi.org/10.3390/biom10121619>.
- [10] *Solidago virgaurea: obsahové látky*, (2011). <http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=443> (accessed September 19, 2023).
- [11] *Zlatobýl kanadský a obrovský*, (n.d.). <http://invaznirostliny.ibot.cas.cz/druhy/zlatobyl-kanadsky-a-obrovsky/> (accessed September 19, 2023).
- [12] *Český lékopis 2017 – Doplněk 2020*, 1., Grada Publishing, a.s., Praha, 2020.
- [13] L. Jahodář, *Farmaceuticky významné semenné rostliny*, 1., Nakladatelství Karolinum, Praha, 2022.
- [14] *Zlatobýl obecný (Solidago virgaurea)*, (n.d.). [https://www.prirodak.in/cs/atlas-organism.php?id\\_org=715](https://www.prirodak.in/cs/atlas-organism.php?id_org=715) (accessed October 31, 2023).
- [15] D. Aichele, *Co tu kvete? [400 divoce rostoucích květin střední Evropy]*, 1., Beta, Praha, 2006.
- [16] European Medicines Agency, *Assessment report on Solidago Virgaurea L., herba*, (2008).
- [17] B. Thiem, M. Wesołowska, L. Skrzypczak, J. Budzianowski, Phenolic compounds in two *Solidago L.* species from in vitro culture., *Acta Pol Pharm* 58 (2001) 277–81.
- [18] P. Dobiáš, P. Pavlíková, M. Adam, A. Eisner, B. Beňová, K. Ventura, Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity, *Open Chem* 8 (2010) 87–95. <https://doi.org/10.2478/s11532-009-0125-9>.
- [19] D. Kalemba, Constituents of the essential oil of *Solidago virgaurea L.*, *Flavour Fragr J* 13 (1998) 373–376. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199811/12\)13:6<373::AID-FFJ749>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199811/12)13:6<373::AID-FFJ749>3.0.CO;2-G).



- [20] M. Marksa, K. Zymone, L. Ivanauskas, J. Radušienė, A. Pukalskas, L. Raudone, Antioxidant profiles of leaves and inflorescences of native, invasive and hybrid *Solidago* species, *Ind Crops Prod* 145 (2020) 112123. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112123>.
- [21] A. Abdel Motaal, S.M. Ezzat, M.G. Tadros, H.I. El-Askary, *In vivo* anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats, *Pharm Biol* 54 (2016) 2864–2870. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1190381>.
- [22] J.H. Sampson, J.D. Phillipson, N.G. Bowery, M.J. O'Neill, J.G. Houston, J.A. Lewis, Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic compounds: indication of *in vitro* biological activity in receptor binding assays, *Phytother Res* 14 (2000) 24–29. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(200002\)14:1<24::AID-PTR537>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(200002)14:1<24::AID-PTR537>3.0.CO;2-9).
- [23] V.E. Borchert, P. Czyborra, C. Fetscher, M. Goepel, M.C. Michel, Extracts from *Rhois aromatica* and *Solidaginis virgaurea* inhibit rat and human bladder contraction, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369 (2004) 281–286. <https://doi.org/10.1007/s00210-004-0869-x>.
- [24] F.A.-A. Sanad, S.F. Ahmed, W.H. El-Tantawy, Antidiabetic and hypolipidemic potentials of *Solidago virgaurea* extract in alloxan-induced diabetes type 1, *Arch Physiol Biochem* 128 (2022) 716–723. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1722705>.
- [25] Sigma-Aldrich, Rutin, (n.d.). <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/search/rutin?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=rutin&type=product> (accessed December 29, 2023).
- [26] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 5280805, Rutin, (2023). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rutin> (accessed September 24, 2023).
- [27] A. Ganeshpurkar, A.K. Saluja, The Pharmacological Potential of Rutin, *Saudi Pharm J* 25 (2017) 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.025>.
- [28] R. Semwal, S.K. Joshi, R.B. Semwal, D.K. Semwal, Health benefits and limitations of rutin - A natural flavonoid with high nutraceutical value, *Phytochem Lett* 46 (2021) 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.10.006>.
- [29] Sigma-Aldrich, Chlorogenic acid, (n.d.). <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/substance/chlorogenicacid35431327979> (accessed December 29, 2023).
- [30] O. Nikpayam, A.H. Faghfour, O.M. Tavakoli-Rouzbehani, S.-M. Jalali, M. Najafi, G. Sohrab, The effect of green coffee extract supplementation on lipid profile: A systematic review of clinical trial and *in-vivo* studies, *Diabetes Metab Syndr CRR* 14 (2020) 1521–1528. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.07.043>.
- [31] L. Wang, X. Pan, L. Jiang, Y. Chu, S. Gao, X. Jiang, Y. Zhang, Y. Chen, S. Luo, C. Peng, The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review, *Front Nutr* 9 (2022). <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.943911>.
- [32] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Summary for CID 1794427, Chlorogenic Acid, (2023). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorogenic-Acid> (accessed October 22, 2023).
- [33] O. Asbaghi, M. Sadeghian, S. Rahmani, M. Mardani, M. Khodadost, V. Maleki, A. Pirouzi, S. Talebi, O. Sadeghi, The effect of green coffee extract supplementation on anthropometric measures in adults: A comprehensive systematic review and dose-response meta-analysis of randomized clinical trials, *Complement Ther Med* 51 (2020) 102424. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102424>.
- [34] N. Tajik, M. Tajik, I. Mack, P. Enck, The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature, *Eur J Nutr* 56 (2017) 2215–2244. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1379-1>.

- [35] T. Watanabe, Y. Arai, Y. Mitsui, T. Kusaura, W. Okawa, Y. Kajihara, I. Saito, The Blood Pressure-Lowering Effect and Safety of Chlorogenic Acid from Green Coffee Bean Extract in Essential Hypertension, *Clin Exp Hypertens* 28 (2006) 439–449. <https://doi.org/10.1080/10641960600798655>.
- [36] J. Klimeš, *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, 2.*, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2015.
- [37] Principles of HPLC, Labster Theory (n.d.). <https://theory.labster.com/hplc-principles/> (accessed September 28, 2023).
- [38] Chromatografická kolona, HPLC.cz (n.d.). <http://www.hplc.cz/> (accessed September 29, 2023).
- [39] Fused-Core Columns Technology, (n.d.). <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/fused-core-advantage> (accessed October 29, 2023).
- [40] Ascentis® Express 90 Å AQ-C18, 2.7 µm HPLC Column, (n.d.). <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/supelco/577337u#product-documentation> (accessed October 29, 2023).
- [41] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *J Chromatogr A* 1357 (2014) 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.010>.
- [42] D. Šatínský, K. Jägerová, L. Havlíková, P. Solich, A New and Fast HPLC Method for Determination of Rutin, Troxerutin, Diosmin and Hesperidin in Food Supplements Using Fused-Core Column Technology, *Food Anal Methods* 6 (2013) 1353–1360. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9551-y>.
- [43] J. Fibigr, M. Majorová, H. Kočová Vlčková, P. Solich, D. Šatínský, A validated UHPLC method for the determination of caffeoylquinic and di-caffeoylquinic acids in green coffee extracts using an RP-Amide fused-core column, *J Pharm Biomed Anal* 151 (2018) 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.023>.
- [44] Y. Zu, C. Li, Y. Fu, C. Zhao, Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD, *J Pharm Biomed Anal* 41 (2006) 714–719. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.04.052>.
- [45] Y. Abdullah, B. Schneider, M. Petersen, Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species, *Phytochem Lett* 1 (2008) 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2008.09.010>.
- [46] K. Ishii, T. Furuta, Y. Kasuya, Determination of rutin in human plasma by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 759 (2001) 161–168. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00224-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00224-9).
- [47] S. Magiera, I. Baranowska, A. Lautenszleger, UHPLC–UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities, *J Pharm Biomed Anal* 102 (2015) 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.004>.
- [48] L. Kébal, K. Pokajewicz, N. Djebli, N. Mostefa, A. Poliwoda, P.P. Wieczorek, HPLC-DAD profile of phenolic compounds and In vitro antioxidant activity of *Ficus carica* L. fruits from two Algerian varieties, *Biomed Pharmacother* 155 (2022) 113738. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113738>.
- [49] S. Kongkiatpaiboon, S. Chewchinda, B. Vongsak, Optimization of extraction method and HPLC analysis of six caffeoylquinic acids in *Pluchea indica* leaves from different provenances in Thailand, *Rev Bras Farmacogn* 28 (2018) 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.03.002>.

- [50] P. Iacopini, M. Baldi, P. Storchi, L. Sebastiani, Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions, *J Food Compos Anal* 21 (2008) 589–598. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.011>.