

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra analytické chemie



**STANOVENÍ VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK V OVOCI**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: Ing. Lubor Zelený

Vedoucí katedry: prof. RNDr. Petr Solich CSc.

### Prohlášení

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

datum

podpis

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své vedoucí práce Doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a cenné rady při vypracovávání této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala RNDr. Anetě Bílkové a Ing. Luboru Zelenému. Dále děkuji celé katedře analytické chemie za příjemné pracovní prostředí. Ráda bych také poděkovala své rodině za podporu v průběhu celého studia.

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Martina Pechová

Školitel: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení vybraných fenolických látek v ovoci

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací HPLC metody pro stanovení vybraných fenolických látek – kyselina gallová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, katechin, epikatechin, rutin, kvercetin, kvercitrin, floretin a floridzin.

V této práci jsou zahrnuty informace o obecné charakteristice fenolických látek a o jejich struktuře. Dále je stručně popsána metoda HPLC a je zmíněna krátká rešerše odborných publikací týkajících se uvedeného tématu.

V rámci optimalizace bylo testováno několik typů gradientů mobilní fáze, stacionárních fází (chromatografických kolon typu C18, fenyl-hexyl, bifenyl, amino, kyano a monolitická kolona), další podmínky separace (teplota, extrakce) a byla provedena částečná validace metody.

K analýze vybraných látek byla použita předkolona Ascentis Express C18 (5 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) a kolona Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m). Detekce byla provedena pomocí DAD spektrofotometrického detektoru při vlnových délkách 255, 280, 320 a 365 nm, teplotě kolonového prostoru 30 °C s využitím gradientové eluce s mobilní fází acetonitril a voda s úpravou pH na 2,8 pomocí kyseliny octové. Nastříkovaný objem byl 10  $\mu$ l a průtoková rychlost 1ml/min. Při optimalizaci byly využity i reálné extrakty jablek – dužnina a slupka. Tato vyvinutá metoda je určená pro stanovení vybraných fenolických látek v různých odrůdách jablek při skladování v různých podmínkách

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Martina Pechová

Supervisor: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: Determination of selected phenolic compounds in fruit

This diploma work deals with development and optimization of HPLC method for determination of selected phenolic compounds – gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, catechin, epicatechin, rutin, quercetin, quercitrin, phloretin and phloridzin.

The diploma work includes information about the general characteristics of phenolic compounds and information about their structure. It further describes HPLC method and mentions the short review of scientific publications regarding this topic.

In the optimization step several types of gradients of mobile phase, stationary phase (chromatographic column of type C18, phenyl-hexyl, biphenyl, amino, cyano and monolithic column), other separation conditions (temperature, extraction) were tested and validation of the method was carried out.

For the analysis of selected compounds precolumn Ascentis Express C18 (5 x 4,6 mm x 5 µm) and the column Kinetex C18 column (150 x 4,6 mm x 5 µm) were used. The detection was performed by DAD spectrophotometric detector at wavelengths of 255, 280, 320 and 365 nm, column temperature of 30 °C using gradient elution with mobile phase of acetonitril and water with adjusted pH to 2,8 with acetic acid. Injection volume was 10 µl and the flow rate 1 ml/min. During the optimalization real apple extracts – the pulp and peel were also used. This developed method is intended for determination of selected phenolic compounds in different varieties of apples during storage under various conditions.

## Obsah

1	Seznam použitých zkratk	8
2	Úvod	9
3	Cíl a popis zadání práce	10
4	Teoretická část	11
4.1	Fenolické látky	11
4.1.1	Funkce fenolických látek	11
4.1.2	Struktura fenolických látek	12
4.1.3	Rozdělení fenolických látek	12
4.1.4	Popis vybraných fenolických látek	18
4.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	23
4.2.1	Vývoj HPLC metody pro separaci fenolických látek	24
4.3	Rešerše	26
5	Experimentální část	28
5.1	Přístroj, podmínky separace	28
5.2	Chemikálie (standarty a rozpouštědla)	29
5.3	Příprava roztoků	30
5.3.1	Příprava zásobních roztoků	30
5.3.2	Příprava pracovních roztoků	30
5.3.3	Příprava pracovního roztoku standardů pro optimalizace	30
5.3.4	Příprava roztoku standardů pro opakovatelnost	30
5.3.5	Příprava roztoků standardů pro linearitu	31
5.3.6	Zpracování rostlinného materiálu	31
6	Výsledky a diskuze	32
6.1	Optimalizace metody	32
6.1.1	Optimalizace gradientové eluce	32
6.1.2	Optimalizace stacionární fáze	38
6.1.3	Optimalizace pH, průtokové rychlosti, výběr rozpouštědla pro extrakci analytů	47
6.2	Validace	53
6.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému	53
6.2.2	Linearita	55
6.2.3	Robustnost	60
7	Souhrn	64
8	Závěr	66
9	Seznam obrázků, tabulek	67

9.1	Obrázky .....	67
9.2	Tabulky .....	69
10	Použitá literatura .....	70

## 1 Seznam použitých zkratk

$A_s$	faktor symetrie chromatografických píků
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
$k$	kapacitní faktor
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
$R_s$	rozlišení chromatografických píků
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
$t_r$	retenční čas
UV	ultrafialová oblast spektra světla



## 2 Úvod

Jablka a jiné druhy ovoce obsahují řadu prospěšných látek, mezi ně bezpochyby patří právě fenolické látky. Tyto látky jsou zodpovědné za mnoho prospěšných účinků nejen na lidské zdraví. Nejvýznamnější účinky jsou zde vyjmenovány, jedná se o antioxidační účinky, předchází kardiovaskulárním a neurodegenerativním onemocněním a vytváří ochranu proti virům a mikrobům. Fenolické látky jsou velmi širokou skupinou látek a je jich nepřeberné množství, proto nejsou všechny jejich vlastnosti zcela objasněny.

Pro stanovení fenolických látek bývá velmi často používána kapalinová chromatografie. V experimentální části této diplomové práce došlo k testování chromatografických podmínek pro nejvhodnější separaci těchto látek a také k vyvinutí vhodné chromatografické metody pro stanovení vybraných fenolických látek.

### **3 Cíl a popis zadání práce**

Cílem experimentální části této diplomové práce bude vyvinout vhodnou chromatografickou metodu pro stanovení vybraných fenolických sloučenin (kyselina gallová, chlorogenová, epikatechin, katechin, rutin, kyselina kávová, kvercitrin, kvercetin, floretin a floridzin) obsažených v jablečné slupce a dužnině pomocí HPLC. Budou testovány různé stacionární fáze (C18, fenyl-hexyl, bifenyl, amino, kyano a monolitická kolona), gradienty mobilní fáze složené z acetonitrilu a vody okyselené kyselinou octovou na pH 2,8 a následně bude provedena i částečná validace HPLC metody (test vhodnosti chromatografického systému, linearita a robustnost). Optimalizace bude provedena i s reálnými extrakci jablečné slupky a dužniny.

## **4 Teoretická část**

### **4.1 Fenolické látky**

Fenolické látky nazývané také jako polyfenoly se nacházejí v různých rostlinných druzích a jejich obsah se liší i v různých částech rostlin. Nejvíce zastoupeny jsou v epidermálních tkáních rostlin např. slupka ovoce, souvisí to s působením světla na metabolismus fenolických látek. Hlavními zdroji fenolických látek v potravě jsou zelenina a ovoce, vyskytují se jako sekundární metabolity chránící rostlinu před různými poškozeními (UV záření, hmyz, viry a bakterie). Rostlinné polyfenoly mají redukční účinky a jsou obsaženy v naší potravě. V různých druzích rostlin je rozdílné množství polyfenolů [1-6].

#### **4.1.1 Funkce fenolických látek**

Jedná se o přírodní látky s antioxidační aktivitou, které zabraňují a omezují působení volných radikálů. Antioxidanty jsou látky, které umožňují zachycení volných kyslíkových radikálů, které vznikají během metabolismu, pomáhají zabránit vzniku oxidace tuků, které mohou později poškodit buněčné membrány. Antioxidační aktivita fenolických sloučenin závisí na struktuře, a to zejména na počtu a poloze hydroxylových skupin a také na druhu substituce. Při nedostatku antioxidačních látek a jejich účinků může docházet k poškození buněk. K některým druhům potravin jsou záměrně přidávány tyto fenolické látky, které prodlužují stabilitu [1, 5, 7, 8].

Rostlinné fenolické látky obsažené v plodech i ovocných šťávách udávají produktům charakteristické organoleptické vlastnosti (chuť, vůně, barva). Na chuť se podílejí nejčastěji flavanony, katechiny a taniny, jsou významné především svojí hořkou chutí. Anthokyaniny a anthoxanthiny dávají rostlinným produktům jejich charakteristickou barvu, čím více těchto látek obsahují, tím je jejich barva sytější. Anthokyaniny vytváří spíše červeno-modré zbarvení, zatímco anthoxanthiny žluté [1, 2, 4, 5, 9, 10, 11].

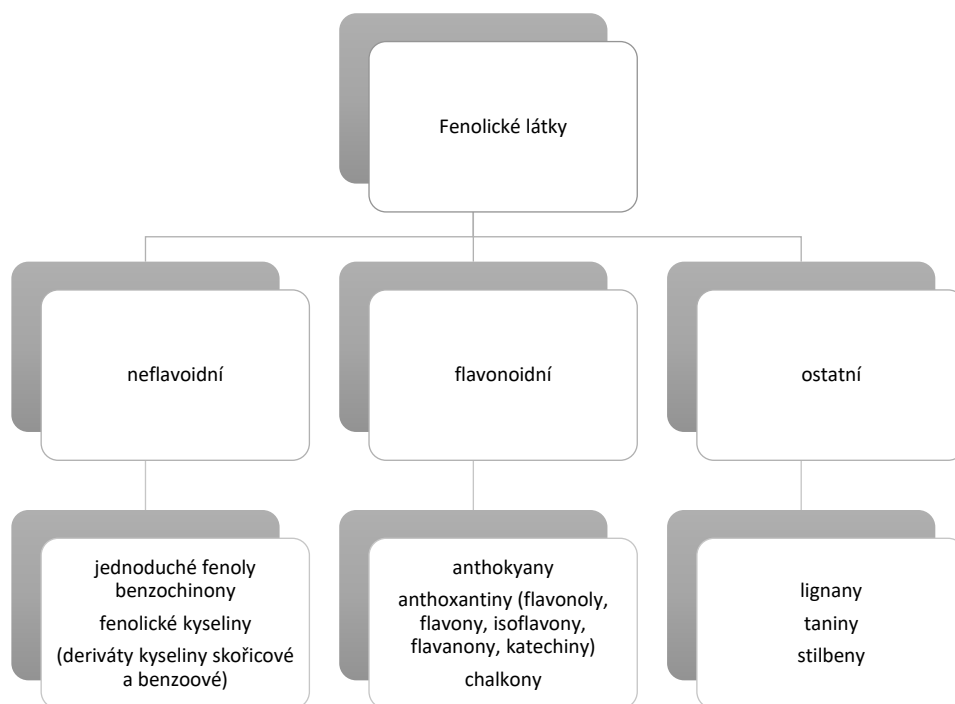
Fenolické sloučeniny hrají důležitou roli v růstu a rozmnožování rostlin, poskytují jim ochranu proti patogenům a predátorům. Mezi jejich hlavní funkce patří léčba a prevence kardiovaskulárních chorob (ateroskleróza), neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova, Parkinsonova choroba), některých druhů rakoviny, působí proti virům a ovlivňují enzymatické a hormonální řízení v lidském organismu. Zároveň polyfenoly působí antimikrobiálně, antitromboticky, protizánětlivě a mají mnoho dalších vlastností prospěšných pro zdraví člověka [1, 2, 3, 5, 7, 8, 10].

#### 4.1.2 Struktura fenolických látek

Fenolické látky tvoří velkou skupinu sloučenin mající různorodou strukturu. Jedná se o organické látky obsahující minimálně jedno aromatické jádro a více než jednu hydroxylovou skupinu. Dále dochází na těchto strukturách k hydroxylaci, methylaci a glykosylaci. Syntéza fenolických látek probíhá tzv. šikimátovou dráhou, následnými reakcemi vzniká fenylalanin, který je považován za nejčastější prekurzor pro syntézu fenolických látek. Aromatická aminokyselina fenylalanin je přeměňována na kyselinu skořicovou [1, 2, 3, 8, 12, 13].

#### 4.1.3 Rozdělení fenolických látek

Podle struktury jsou fenolické látky rozděleny do tří skupin. Jedná se o neflavonoidní, flavonoidní a ostatní, toto dělení je znázorněno na obrázku 1 [1, 2, 11].



Obr. 1 Grafické znázornění rozdělení fenolických látek

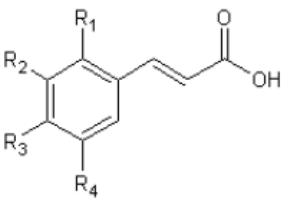
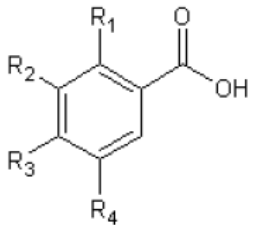
##### 4.1.3.1 Neflavonoidní látky

Mezi neflavonoidní fenolické látky patří jednoduché fenoly a benzochinony, fenolické kyseliny, acetofenony, fenyloctové kyseliny, skořicové kyseliny, fenypropeny, kumariny a naftochinony. Jednoduché fenoly a benzochinony jsou látky, které obsahují šesti-uhlíkatý základ a působí v potravinách jako vonné složky [11].

Fenolické kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a skořicové) jsou nejjednoduššími aromatickými kyselinami, obsahují jeden aromatický kruh, který musí mít alespoň jeden

vodík substituovaný hydroxylovou skupinou. Významným zástupcem rozšířeným v mnoha rostlinných druzích je kyselina benzoová, vyskytuje se jak v ovoci, tak i v zelenině ve velmi nízkých koncentracích. Fenolické kyseliny se dělí na deriváty kyseliny benzoové a skořicové, jak je zobrazeno v tabulce 1. Od kyseliny skořicové jsou odvozeny další látky např. kyselina ferulová, kávová, kumarová a sinapová. Mezi významné skořicové kyseliny patří p-kumarová kyselina, která se nachází hlavně v jahodách, a také kyselina kávová, která zaujímá v ovoci ze skořicových kyselin největší procentuální zastoupení. Významnými deriváty kyseliny benzoové jsou kyselina gallová, gentisová, salicylová a vanilová. V ovoci se kyselina gallová vyskytuje jako dimer [1, 2, 5, 11].

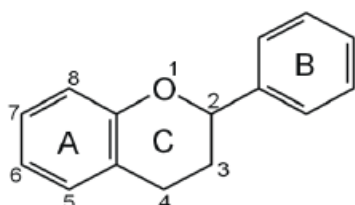
Tab. 1 Struktura derivátů fenolických kyselin [2]

Struktura kyseliny skořicové (R <sub>1-4</sub> = H)					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Název
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	ferulová kyselina
	H	OH	OH	H	kávová kyselina
	H	OH	OH	OH	hydroxykávová kyselina
	H	OH	H	H	m-kumarová kyselina
	H	H	OH	H	p-kumarová kyselina
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	sinapová kyselina
Struktura benzoové kyseliny (R <sub>1-4</sub> = H)					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Název
	OH	H	H	OH	gentisová kyselina
	OH	OH	OH	H	gallová kyselina
	H	OH	H	H	p-hydroxybenzoová kyselina
	OH	OH	H	H	protocatechinová kyselina
	OH	H	H	H	salicylová kyselina
	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	vanilová kyselina

#### 4.1.3.2 Flavonoidní látky

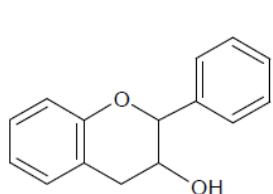
Flavonoidy jsou nejvíce prostudovanou a také nejrozsáhlejší skupinou fenolických látek. Jejich společná struktura obsahuje dva aromatické benzoové kruhy spojené tříuhlíkatým řetězcem. Jedná se o C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> uspořádání. Flavonoidy jsou odvozeny

od flavanu (kyslíkatá heterocyklická sloučenina zvaná 2H-chromen, která je substituovaná v poloze C2 fenylovou skupinou), struktura je znázorněna na obrázku 2. V rostlinách se flavonoidy vyskytují jako konjugáty s cukry, jedná se o tzv.  $\beta$ -glykosidy. Sacharidovou složkou jsou nejčastěji glukóza nebo rhamnóza. Díky spojení s cukry jsou lépe rozpustné ve vodě a ovlivňují chuť, vůni a barvu [1, 2, 4, 9].

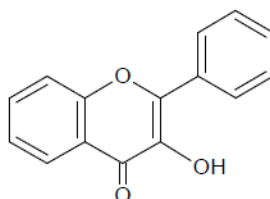


*Obr. 2 Struktura flavonoidů [4]*  
(skelet flavanu je tvořen dvěma benzenovými kruhy (A,B) a kruhem odvozeným od 2H- pyranu (C))

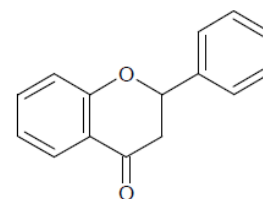
Flavonoidní látky jsou rozděleny do několika podtříd, jedná se o flavony, flavonoly, isoflavony, flavanony, flavonony, 3-flavanoly (katechiny), chalkony a anthokyanidiny. Jejich struktury jsou vyobrazeny na obrázku 3 [1, 2, 4, 5, 9].



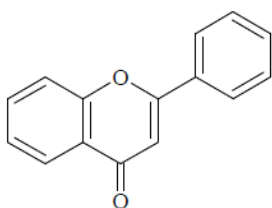
katechiny



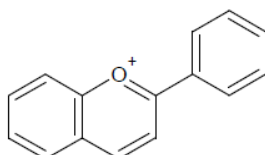
flavonoly



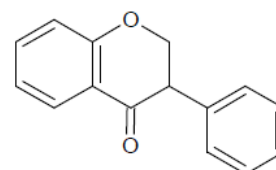
flavanony



flavony



anthokyanidiny



isoflavony

*Obr. 3 Obecná struktura flavonoidních látek [11]*

#### 4.1.3.2.1 Flavonoly

Flavonoly jsou nejvíce zastoupeny v rostlinách ve formě glykosidů, jejich cukernou částí bývá převážně glukóza, rhamnóza, galaktóza, arabinóza a fruktóza. Mezi zástupce flavonolů patří kvercetin, kaempferol a myricetin [1, 3].

#### 4.1.3.2.2 Flavony

Flavony postrádají oproti flavonolům hydroxylovou skupinu. Nacházejí se hlavně v rostlinách, méně v ovoci a zelenině, a patří mezi žlutá barviva. Hlavními zástupci jsou apigenin a luteolin [1, 2].

#### 4.1.3.2.3 Isoflavony

Isoflavony jsou sloučeniny, které vycházejí ze struktury flavonoidů, pouze mají aromatický kruh B spojený s pyranovým kruhem C v poloze C3, jak je znázorněno na obrázku 3. Mezi zástupce patří např. genistein a daidzein, Jsou strukturně podobné s estrogeny, a proto se váží na estrogenové receptory a využívají se při léčbě rakoviny prsu a prostaty. Tato skupina látek je méně rozšířenou a vyskytuje se pouze v čeledi bobovitých (sójové boby) [1, 2, 9, 11].

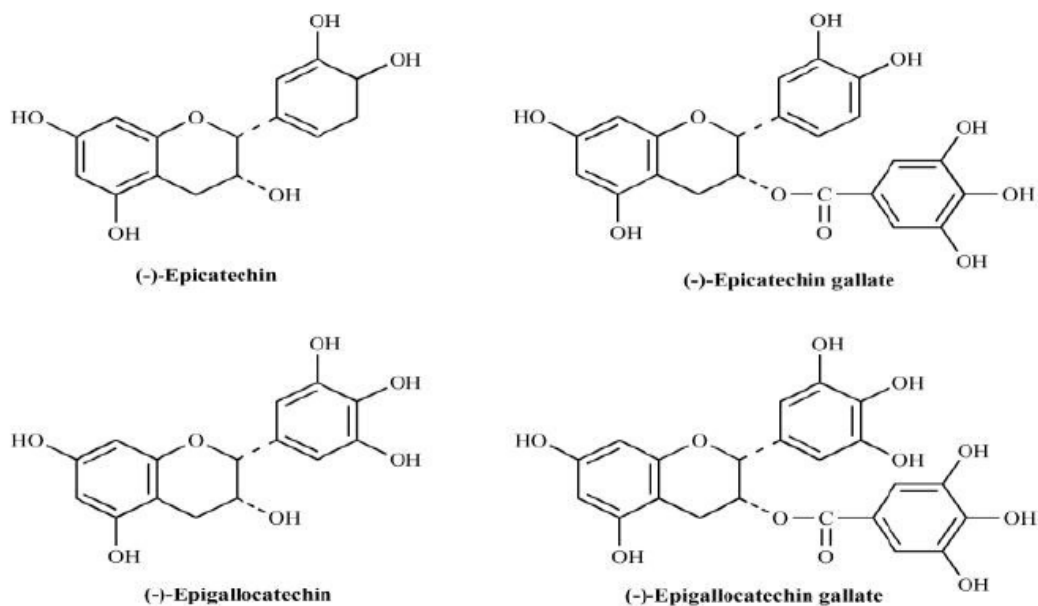
#### 4.1.3.2.4 Flavanony

Flavanony se na rozdíl od předchozích skupin běžně nevyskytují v zelenině, jsou spíše přídatnými látkami v rostlinách. Flavanony jsou obsaženy převážně v citrusových plodech. U grepu jsou zodpovědné za hořkou chuť, a proto jsou spíše považovány za chuťové látky. Nejčastěji se setkáváme s konjugovanými sloučeninami (glykosidy). Hlavní zástupce představují naringerin, hesperidin a jejich glykosidy. Působí antioxidantně, mají hypocholesterolemickou a hypoglykemickou aktivitu a přispívají k prevenci proti nádorům [1, 2, 11, 14].

#### 4.1.3.2.5 Flavanoly

Katechiny (flavanoly) neboli flavan-3-oly mají hned 2 chirální centra, tím vznikají čtyři izomery. Jedná se o bezbarvé a ve vodě rozpustné látky. V přírodě se nacházejí pouze (+)katechiny, (+)gallokatechiny, (-)epikatechiny a (-)epigallokatechiny znázorněny na obrázku 4. Katechiny jsou nestabilní látky díky epimerní struktuře. Při změně teploty dochází k epimerizaci (změna konfigurace na chirálních centrech).

Vyskytují se jako monomery, oligomerní nebo polymerní sloučeniny, které poté vytvářejí kondenzované taniny [2, 3, 4, 15].



Obr. 4 Struktury čtyř hlavních katechinů [4]

#### 4.1.3.2.6 Anthokyanidiny

Glykosidy anthokyanidinů vytvářejí anthokyany. Anthokyany patří mezi nejvýznamnější přírodní barviva, která jsou dobře rozpustná ve vodě. Tato barviva se nacházejí v listech, květech i plodech v barevné škále od oranžové až po fialovou a modrou. Vyskytují se ve formě glykosidů pomocí substituce např. glukózou, galaktózou, arabinózou, rhamnózou a dalšími, jak je zobrazeno v tabulce 2 [1, 2, 11, 14].

Tab. 2 Substituce a přehled anthokyanů [2]

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Název
OH	OH	H	glukosa	Kyanidin-3-glukosid
OH	OH	H	rutinosa	Kyanidin-3-rutinoid
OH	OH	OH	glukosa	Delfinidin-3-glukosid
OH	OH	OH	rutinosa	Delfinidin-3-rutinoid
OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	glukosa	Malvidin-3-glukosid
OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	rutinosa	Malvidin-3-rutinoid
H	OH	H	rutinosa	Pelargonidin-3-rutinoid
OCH <sub>3</sub>	OH	H	glukosa	Peonidin-3-glukosid
OCH <sub>3</sub>	OH	H	rutinosa	Peonidin-3-rutinoid
OCH <sub>3</sub>	OH	OH	glukosa	Petunidin-3-glukosid
OCH <sub>3</sub>	OH	OH	rutinosa	Petunidin-3-rutinoid



#### 4.1.3.2.7 Chalkony

Další podtřídu představují chalkony popř. dihydrochalkony. Hlavními zástupci této skupiny jsou floretin a floridzin. Chalkony jsou známy především kvůli své schopnosti ovlivnit žluté zbarvení rostlin. Dihydrochalkony vznikají redukcí chalkonů a jsou významné díky své sladké chuti [5, 16, 17].

#### 4.1.3.3 Ostatní látky (stilbeny, lignany, taniny)

Mezi ostatní látky patřící do skupiny fenolických látek patří především ligniny, taniny a stilbeny, tyto látky nespĺňují charakter chemické struktury a vlastností předchozích skupin [2, 11].

Lignany jsou díky své struktuře řazeny mezi fenylypropanoidy. Vznikají šikimátovou dráhou redukcí alkoholů a spojením dvou fenylypropanových jednotek C6-C3-C3-C6, vytváří dimery. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je lignin, který spolu s ostatními zástupci umožňuje ochranu rostlinám proti patogenům, dále působí antikarcinogenně. Nachází se především v obilovinách (kukuřice, pšenice, žito). Dalšími zástupci jsou sekoizolariciresinol, matairesinol, pinoresinol a mnoho dalších [1, 2, 11, 14].

Taniny, taky nazývané jako třísloviny, jsou látky s velkým počtem hydroxylových skupin. Jedná se především o sloučeniny s velkou molekulovou hmotností, což mají rozdílné oproti ostatním flavonoidům. Mohou vytvářet komplexy se sacharidy a proteiny, po tomto spojení se stávají téměř nerozpustné ve vodě. Při konzumaci potravin bohatých na taniny lze pocítit trpkou chuť, která je zapříčiněná navázáním taninů na proteiny obsažené ve slinách. Taniny lze dělit na dvě skupiny – hydrolyzované a kondenzované. Významnější jsou kondenzované taniny, které lze také nazývat jako proanthokyanidiny. Tyto látky jsou polymerní flavanoly a jedná se o sloučeniny se strukturou flavanu. Hořká chuť se projevuje při kondenzaci 2-10 jednotek flavanových jednotek. Proanthokyanidiny se skládají z (-)-epikatechinu nebo (+)-katechinu [1, 2, 5, 11, 14].

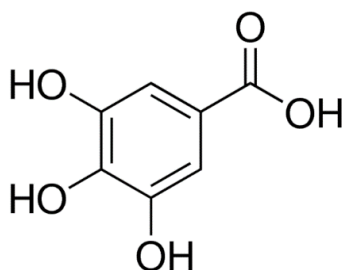
Stilbeny obsahují dva benzenové kruhy spojené dvěma uhlíky. Tyto látky jsou zastoupeny v rostlinách minimálně. Významným zástupcem je resveratrol, nachází se především ve slupkách ovoce (rybíz, hroznové víno). Dalšími zástupci jsou hydroxytyrozol a oleuropein. Stilbeny působí hlavně fungistaticky a tím dochází k zpomalení růstu plísní [2, 14].

#### 4.1.4 Popis vybraných fenolických látek

Mezi testované fenolické látky byly vybrány kyselina gallová, chlorogenová, kávová, rutin, katechin, epikatechin, kvercetin, kvercitrin, floridzin a floretin.

##### 4.1.4.1 Kyselina gallová

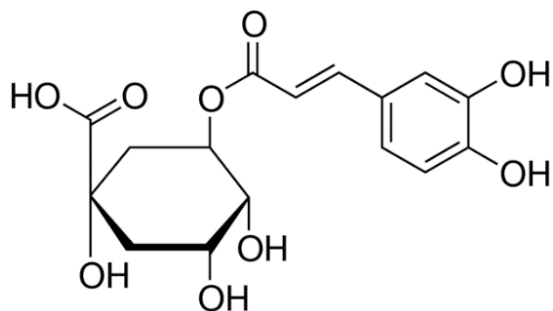
Kyselina gallová, patří mezi fenolické kyseliny, je derivátem kyseliny benzoové. Tato kyselina je bezbarvý krystalický prášek, ve vodě rozpustný a působí jako antioxidant. Nachází se v mnoha rostlinách a tvoří základ hydrolyzovaných taninů. Má antikarcinogenní a antiangiogenní účinky. Její struktura je znázorněna na obrázku 5 [1, 18].



Obr. 5 Struktura kyseliny gallové [19]

##### 4.1.4.2 Kyselina chlorogenová

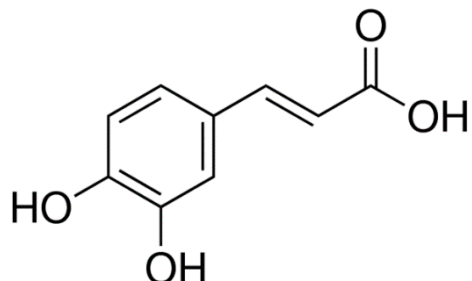
Kyselina chlorogenová patří mezi deriváty kyseliny hydroxyskořicové a je významnou sloučeninou v dužnině jablek. Během dozrávání ovoce dochází k oxidaci fenolických látek a následně k enzymatickému hnědnutí, substrátem těchto enzymů je právě kyselina chlorogenová. Tato kyselina má ale také pozitivní vlivy, zejména působí antivirově, antibakteriálně a protizánětlivě, dále ovlivňuje činnost srdce a potlačuje možné poškození DNA. Její chemická struktura je znázorněna na obrázku 6 [11, 18, 20].



Obr. 6 Struktura kyseliny chlorogenové [19]

#### 4.1.4.3 Kyselina kávová

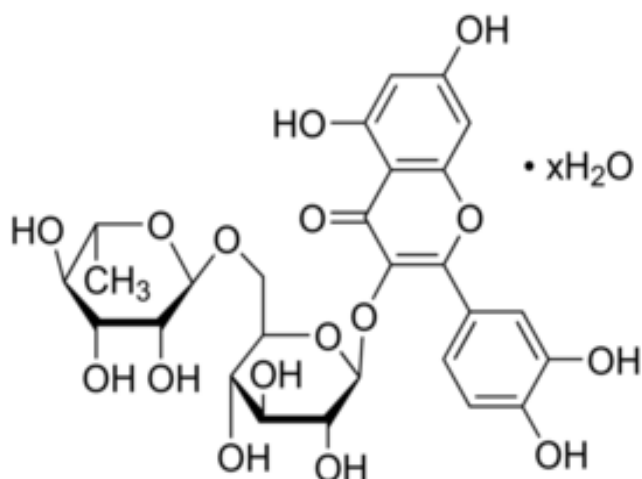
Kyselina kávová je součástí skupiny fenolických kyselin, je odvozena od kyseliny skořicové, jak je znázorněno na obrázku 7. Vytváří rostlinám ochranu, působí jako antioxidant a inhibuje vznik karcinogenních látek [14, 18].



Obr. 7 Struktura kyseliny kávové [19]

#### 4.1.4.4 Rutin

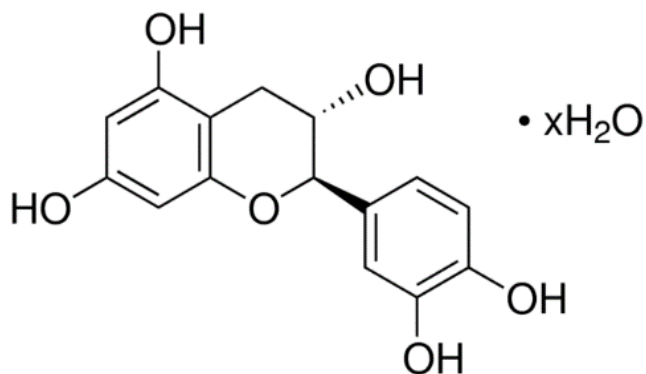
Rutin je žlutý krystalický prášek, působí jako antioxidant a patří do skupiny flavonoidů. Jeho hlavním účinkem je vychytávání oxidu dusnatého v organismu a dále působí na elasticitu a permeabilitu cév. Struktura rutinu je zobrazena na obrázku 8 [1, 3, 18].



Obr. 8 Struktura rutinu [19]

#### 4.1.4.5 Katechin

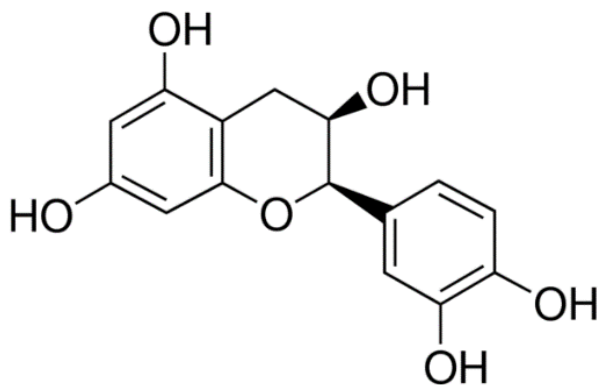
Katechin je jedním z hlavních zástupců flavanolů. Je hlavně přítomný v čaji a ovoci. Flavanolů se nejčastěji vyskytují ve slupce, tudíž pokud dojde k oloupaní např. jablka, odstraní se významné množství katechinů. Chemický vzorek katechinu je znázorněn na obrázku 9 [14, 15].



Obr. 9 Struktura katechinu [19]

#### 4.1.4.6 Epikatechin

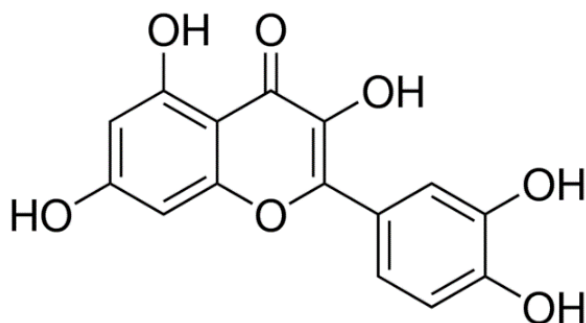
Stejně jako katechin patří epikatechin do skupiny flavanolů a jeho chemický vzorec je zobrazen na obrázku 10. Obecně tato skupina ovlivňuje hořkost a působí antioxidačně. Je znám ve dvou formách (stereoisomerech) a to jako (+)-epikatechin a (-)-epikatechin [3, 18].



Obr. 10 Struktura epikatechinu [19]

#### 4.1.4.7 Kvercetin

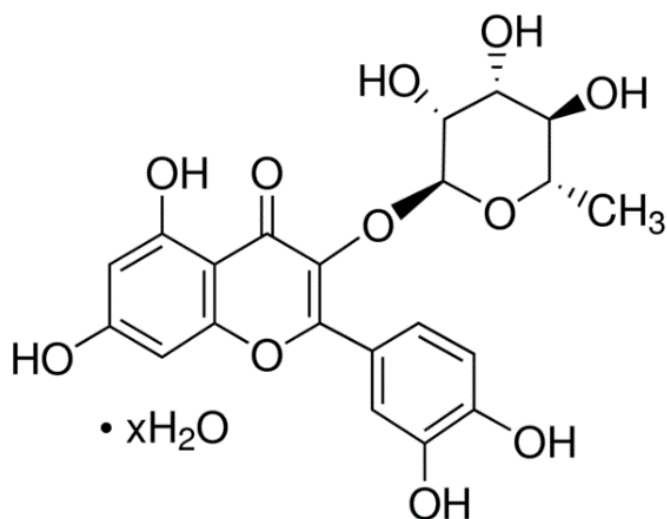
Kvercetin patří do skupiny flavonolů. Je široce rozšířen v rostlinách a má také antioxidační aktivitu. Tato látka chrání před oxidací LDL lipoprotein a zabraňuje shlukování krevních destiček, inhibuje proliferaci karcinogenních buněk. Při dostatečném příjmu kvercetinu dochází ke snížení plazmatické hladiny lipidů, lipoproteinů a cholesterolu. Nachází se v cibuli, jablkách, kapustě a čaji. Jeho chemickou strukturu lze vidět na obrázku 11 [1, 3, 14].



Obr. 11 Struktura kvercetinu [19]

#### 4.1.4.8 Kvercitrin

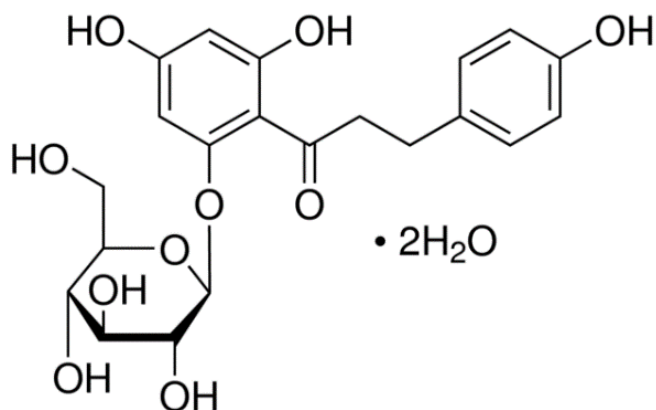
Kvercitrin je rostlinné barvivo a patří mezi flavonoidy. Nachází se v různých potravinách (červené víno, cibule, čaj, jablka) a využívá se k léčbě kardiovaskulárních chorob. Jedná se o žlutou krystalickou látku a jeho struktura je zobrazena na obrázku 12 [1, 18].



Obr. 12 Struktura kvercitrinu [19]

#### 4.1.4.9 Floridzin

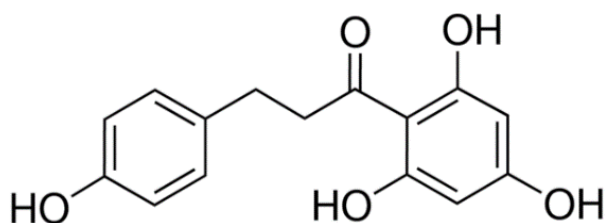
Floridzin, glykosid floretinu (floreitin-2-O-glukosid), jeho struktura viz obrázek 13, patří mezi dihydrochalkony. Tato sloučenina se využívá ke kontrole jakosti jablečné šťávy a dalších jablečných produktů [16, 21].



Obr. 13 Struktura floridzinu [19]

#### 4.1.4.10 Floretin

Floretin, zástupce skupiny dihydrochalkonů má opět jako spousta dalších fenolických látek antioxidační aktivitu, dále však disponuje i protinádorovou, antimykotickou, antibakteriální a antivirovou aktivitou. Nachází se především v jablkách, kůře jabloní a v dalších jablečných produktech. Má žluté zbarvení a sladkou chuť. Jeho struktura je znázorněna na obrázku 14 [16, 17].



Obr. 14 Struktura floretinu [19]

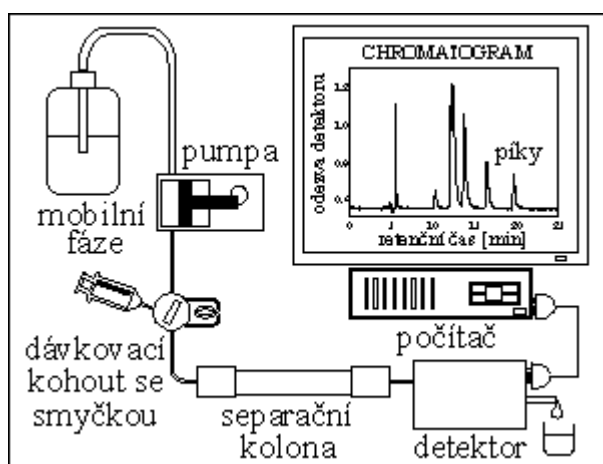
## **4.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

HPLC (high performance liquid chromatography) vysokoučinná kapalinová chromatografie patří mezi separační metody, jejíž princip je založen na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze (dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek mezi tyto 2 fáze). Jedná se o stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fázi. Mobilní fáze (MF), kterou je u této metody kapalina, je do chromatografického systému zaváděna pomocí čerpadla za vysokého tlaku. Stacionární fáze (SF) je umístěna v chromatografické koloně. V dnešní době existuje nepřehledné množství druhů kolon, které jsou naplněny polárními a nepolárními adsorbenty, dále jsou používány monolitické kolony a kolony na bázi oxidu zirkoničitého. Mezi polární adsorbenty patří silikagel, oxid hlinitý a chemicky vázané polární stacionární fáze. Nejpoužívanějším polárním adsorbentem je již zmíněný silikagel, který má široké uplatnění. Chemicky vázané nepolární stacionární fáze mají značné výhody, jsou odolnější změnám teplot a složení mobilní fáze. V závislosti na použitém sorbentu (C8, C18, fenyl, alkylfenyl) se liší svou selektivitou. Podle vlastností separovaných látek je volena vhodná stacionární i mobilní fáze [22, 23, 24].

Při normální fázi jsou používány polární SF v kombinaci s méně polární MF. Opakem je reverzní uspořádání, při kterém se používá polární mobilní a nepolární SF. Dále může být použita izokratická eluce, kdy je čerpána MF o konstantním složení, nebo gradientová, při které dochází ke zvyšování eluční síly. Rozdíl v použití těchto elucí je ten, že izokratická eluce je využívána u separace látek s podobnými fyzikálně chemickými vlastnostmi, zatímco gradientová je naopak používána při rozdílných vlastnostech dělených látek a oproti izokratické eluci dojde i ke zkrácení analýzy [22, 23].

Další nedílnou součástí chromatografického systému je detektor. Spektrofotometrické založené na absorpci záření (190-800 nm) jsou nejpoužívanějšími detektory díky relativně nízké ceně a univerzálnímu použití. Detektory s diodovým polem (DAD) patří mezi spektrofotometrické detektory, jejich výhodou je možnost detekce při jakémkoliv zvolené vlnové délce (je snímáno celé spektrum). Další použité detektory mohou být fluorescenční, elektrochemický, chemiluminiscenční a hmotnostní. Na obrázku 15 je znázorněno schéma chromatografického systému [23, 24].

HPLC je využívána v různých odvětvích, např. v analýze potravin, léčiv, biologického materiálu a kontrole životního prostředí. V potravinářství se používá HPLC zejména pro kontrolu jakosti potravinářských výrobků [25].



Obr. 15 Schéma HPLC systému [24]

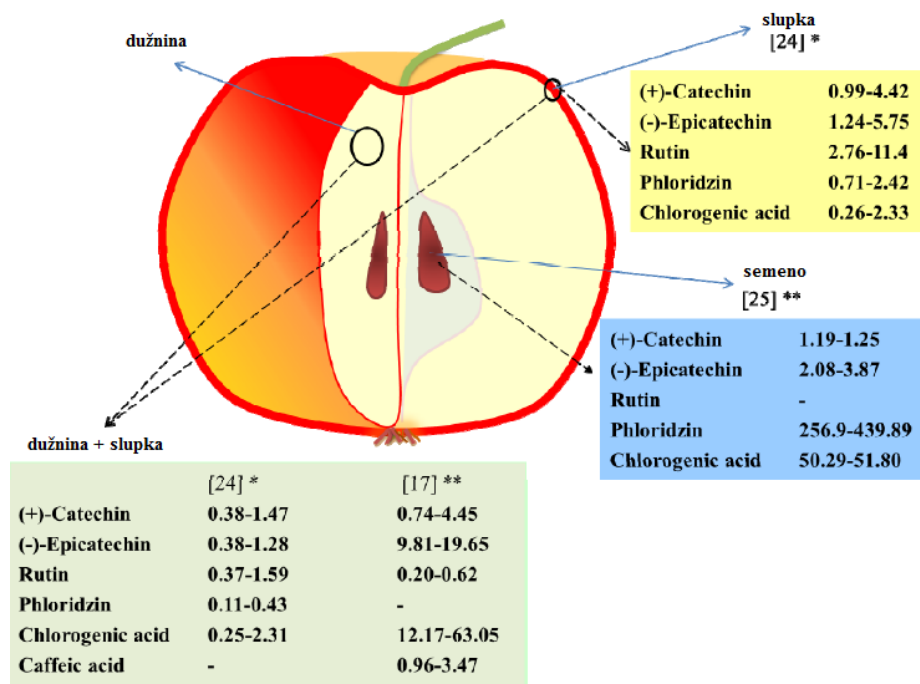
#### 4.2.1 Vývoj HPLC metody pro separaci fenolických látek

Značnou komplikací při separaci fenolických látek jsou složité matrice ovoce, jedná se především o další obsahové látky např. polysacharidy, fytoosteroly, proteiny, vitamíny, stopové prvky a mnoho dalších látek. Také zastoupení fenolických látek je závislé na druhu ovoce a na jeho rozložení ve slupce a dužnině viz obrázek 16. V jablečné slupce je oproti dužnině poměrně vysoké množství polyfenolů. Z důvodu širokého spektra polarit fenolických látek je obtížné vyvinout účinnou gradientovou eluci a dosáhnout dostatečné separace všech polyfenolů. Jelikož většina polyfenolických látek je aromatická a dobře rozpustná ve vodě, využívá se reverzní stacionární fáze (C18) a polární mobilní fáze [21, 26].

Další komplikací představuje strukturální podobnost polyfenolů a také jejich konjugace s různými typy cukrů. Z tohoto důvodu je nutná vysoká chromatografická selektivita a rozlišení, pro zlepšení separace se využívá úprava pH mobilní fáze. Problém může také vzniknout při koeluci různých tříd polyfenolů [26, 27].

Nejpoužívanější metodou je HPLC na reverzní fázi ve spojení s UV detekcí nebo hmotnostně spektrofotometrickým detektorem, avšak MS detekce je finančně náročná, a proto se převážně používá UV detekce, využívá se různých vlnových délek odpovídající různým separovaným látkám [25].





Obr. 16 Schéma zastoupení fenolických látek v jablku [6]  
 Vysvětlivky: slupka \* mg/g, semeno a dužnina \*\* mg/100 g

### 4.3 Rešerše

Tab. 3 Přehled podmínek separace fenolických látek v předešlých studiích

Stanovované látky	Typ vzorku	Použitá kolona	Mobilní fáze	Délka analýzy (min)	Detektor	Zdroj
katechin, kyselina chlorogenová, procyanidin B2, kyselina p- kumaroylchinová, epikatechin, feruloylglukoza, p-kumaroylglukoza, hyperin, isokvercitrin, rutin, avicularin, floridzin, kvercitrin	jablka	Nova-Pac C18 (30 x 3,9 mm)	H <sub>2</sub> O + CH <sub>3</sub> COOH, H <sub>2</sub> O + ACN + CH <sub>3</sub> COOH	80	DAD	[20]
kyselina chlorogenová, kyselina ferulová, kyselina p- kumarová, kyselina kávová, kyselina skořicová, kvercetin, rutin, floridzin, fletin	jablka	Luna-C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm)	H <sub>2</sub> O + CH <sub>3</sub> COOH, methanol	40	DAD	[21]
kyselina gallová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina p- kumarová, kyselina ferulová, kyselina benzoová, katechin, rutin, naringin, hesperidin, myricetin, kvercetin, luteolin, naringenin, genistein, kaemferol	rajčata	Kinetex XB-C18 (150 x 4,6 mm x 2,6 μm)	0,1% HCOOH + H <sub>2</sub> O, 0,1% HCOOH + methanol ACN	20	DAD	[25]
kyselina gallová, katechin, kyselina 4- hydroxybenzoová, kyselina kávová, kyselina syringová, vanilin, kyselina ferulová, floroglucinol, kyselina benzoová, kyselina salicylová, floridzin, kvercetin, fletin, kyselina skořicová	jablka	Thermo Scientific Acclaim 120, C18 (150 x 3,0 mm x 3 μm)	ACN, H <sub>2</sub> O + CH <sub>3</sub> COOH pH 2,6	30	DAD	[26]
procyanidin B1, procyanidin B2, katechin, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, epikatechin, rutin, glykosidy kvercetinu, xyloglukosid fletinu, floridzin	jablka, hrušky	Nucleosil 120 C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm)	0,01 M kyselina fosforečná, ACN	25	DAD	[27]
arbutin, kyselina gallová, 5-hydroxymethylfurfural, procyanidin B1, 4-hydroxybenzoová kyselina, katechin, kyselina chlorogenová, procyanidin B2, kyselina kávová, kyselina syringová, epikatechin, kyselina p- kumarová, kyselina ferulová, kyselina sinapová, floridzin, fletin, kvercetin, kyselina skořicová	jablka, hrušky	Aqua C18 (250 x 4,6 mm x 5 μm) + předkolona C18 ODS (4 x 3,0 mm)	H <sub>2</sub> O + 2% CH <sub>3</sub> COOH, H <sub>2</sub> O + 0,5% CH <sub>3</sub> COOH + ACN	60	MS	[28]

V tabulce 3 je možné srovnat podmínky jednotlivých separací uvedených v předešlých studiích, které se zabývaly separací obsahových látek v rostlinném materiálu (ovoce, zelenina). Je zřejmé, že kolony s C18 sorbentem, jsou pro separaci fenolických látek velmi často využívané a délka kolony i separace pak odpovídá množství stanovovaných látek. Většinou jsou používány delší kolony, právě z důvodu velkého počtu obsahových látek. Detekce probíhala převážně pomocí DAD detektoru při různých vlnových délkách. Jak je možné vidět v tabulce, lze tyto metody využít i u jiných typů ovoce a zeleniny.

## 5 Experimentální část

### 5.1 Přístroj, podmínky separace

Analýza byla prováděna na chromatografickém systému Shimadzu LC-10, jednotlivé parametry jsou znázorněny v tabulce 4.

Tab. 4 Chromatografický systém

Chromatografická sestava	Shimadzu LC-10
Čerpadlo	LC-10AD VP
Autosampler	SIL-HT A
Dávkování	10 $\mu$ l
Termostat kolony	CTO-10A VP
Předkolona	Ascentis Express C18 (5 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m)
Kolona	Kinetex C18 150 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m Supelco Ascentis C18 100 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m Kinetex XB-C18 150 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m Kinetex Biphenyl 150 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m Ascentis Phenyl-hexyl 100 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m Supelco Ascentis RP-amide 100 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m Supelco Ascentis RP-amide 100 x 3,0 mm x 2,7 $\mu$ m Onyx Monolithic C18 100 x 4,6 mm Ascentis ES-CN 100 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m
Mobilní fáze	Acetonitril, ultračistá voda (pH upraveno kyselinou octovou na 2,8)
Gradientový režim	Testovány různé podmínky gradientové eluce
Teplota	30 °C
Detektor	DAD detektor SPD-M10A VP
Detekce	255, 280, 320, 365 nm
Vyhodnocení	Chromatografický software LC solution

## **5.2 Chemikálie (standardy a rozpouštědla)**

Acetonitril (HPLC Gradient Grade), Sigma-Aldrich

Methanol (HPLC Gradient Grade), Sigma-Aldrich

Kyselina octová (bezvodá), Sigma-Aldrich

Ultračistá voda

### Standardy

Epikatechin > 90 %, BioChemika

Floretin > 99 %, Sigma-Aldrich

Floridzin dihydrát > 99 %, Sigma-Aldrich

Floroglucinol > 99 %, Sigma-Aldrich

Hesperidin 90 %, Fluka-BioChemika

Katechin hydrát > 96 %, Fluka

Kvercitrin hydrát > 78 %, Sigma-Aldrich

Kvercetin dihydrát 95+ %, Sigma-Aldrich

Kvercetin-3-O-glukopyranosid > 99 %, Extrasynthese

Kvercetin-3-β-D-glukosid > 90 %, BioChemika

Kyselina syringová > 95 %, Sigma-Aldrich

Kyselina ferulová 99 %, Sigma-Aldrich

Kyselina gallová 99 %, Sigma-Aldrich

Kyselina chlorogenová >95 %, Sigma-Aldrich

Kyselina kávová 97 %, Sigma-Aldrich

Kyselina p-kumarová > 98 %, Sigma-Aldrich

Kyselina sinapová > 98 %, Sigma-Aldrich

Kyselina valinová 97 %, Sigma

Myricetin > 95 %, BioChemika

Naringenin > 95 %, Sigma-Aldrich

Naringin > 95 %, Fluka-BioChemika

Procyanidin B2 > 90 %, Sigma-Aldrich

Rutin hydrát 95 %, Sigma-Aldrich

Vanilin > 98 %, Sigma-Aldrich

### **5.3 Příprava roztoků**

Všechny připravené vzorky, roztoky standardů i samotné standardy byly uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

#### **5.3.1 Příprava zásobních roztoků**

Zásobní roztoky standardů byly připravovány z 1 mg daného standardu a byly rozpuštěny v 10 ml ACN. Výsledná koncentrace zásobních roztoků dosahovala hodnoty 0,1 mg/ml.

#### **5.3.2 Příprava pracovních roztoků**

Pracovní roztoky byly připraveny odebráním 100 µl zásobního roztoku a doplněním ACN do 10 ml odměrné baňky.

#### **5.3.3 Příprava pracovního roztoku standardů pro optimalizace**

Směs standardů byla připravena odebráním 100 µl z pracovních roztoků každého standardu a následně doplněna ACN do 10 ml odměrné baňky.

#### **5.3.4 Příprava roztoku standardů pro opakovatelnost**

Na základě měření reálných vzorků a optimalizace extrakce byla odhadnuta průměrná hodnota koncentrace jednotlivého standardu, podle této koncentrace bylo naváženo dané množství každého standardu. Tyto navážky standardů byly jednotlivě rozpuštěny v 1 ml MeOH, následně odpipetováno 600 µl od každého standardu a doplněno MeOH do 10 ml odměrné baňky.

*Tab. 5 Příprava roztoku pro test opakovatelnosti*

<b>standard</b>	<b>koncentrace (mg/ml)</b>
kyselina gallová	1
kyselina chlorogenová	100
epikatechin	1
rutin	10
kvercitrin	30
floridzin	10

### 5.3.5 Příprava roztoků standardů pro linearitu

Navážky jednotlivých standardů byly rozpuštěny v 1 ml MeOH, následně bylo od každého 600 µl a doplněno do 10 ml odměrné baňky. Následně byl tento roztok ředěn MeOH na uvedené koncentrace, výsledný objem každé koncentrace byl 1 ml.

Z důvodu nedostatečného množství standardu kvercitrinu nebyl tento standard do linearity zahrnut. Dané koncentrace jednotlivých standardů byly vybrány s ohledem na obsah jednotlivých látek v jablečné slupce z důvodu vyššího obsahu oproti dužnině. U některých látek bylo zapotřebí snížit koncentrace, jelikož kalibrační závislost nebyla lineární, jednalo se o kyselinu chlorogenovou a floridzin.

Tab. 6 Příprava roztoků pro linearitu

koncentrace (mg/ml)					
<b>kyselina gallová</b>	5	2,5	1	0,25	0,125
<b>kyselina chlorogenová</b>	10	4	1	0,5	0,25
<b>epikatechin</b>	5	2,5	1	0,25	0,125
<b>rutin</b>	10	5	2	0,5	0,25
<b>floridzin</b>	5	2	0,5	0,25	0,125

### 5.3.6 Zpracování rostlinného materiálu

Jablka je nutné nejprve jemně nastrouhat, poté odvážit dané množství (3 g) a přidat 15 ml 100% MeOH. Následovalo protřepání na vortexu po dobu 20 minut, centrifugace při 9500 rpm po dobu 10 minut a filtrace pomocí stříkačkového filtru MS-PTFE 0,45 µm.

## 6 Výsledky a diskuze

### 6.1 Optimalizace metody

Pro optimalizaci metody byly použity roztoky standardů o koncentraci 0,1 mg/ml, připravené v acetonitrilu (ACN) a také reálné vzorky z dužniny i slupky jablek extrahované do acetonitrilu, methanolu (100%, 75%, 50%) a destilované vody s úpravou pH na 3,1; 8,6 a bez úprav pH (4,5).

#### 6.1.1 Optimalizace gradientové eluce

Při testování gradientové eluce byla nejprve použita kolona Supelco Ascentis C18 (100 mm x 4,6mm x 5 µm). Během optimalizace byl nastaven průtok na 1 ml/min, teplota termostatu na 35 °C a bylo dávkováno 10 µl vzorku. Mobilní fázi byl zvolen acetonitril společně s vodou okyselenou kyselinou octovou na pH 2,8. Během optimalizace na C18 koloně bylo testováno několik různých gradientů, aby bylo dosaženo separace vybraných fenolických látek. Při optimalizaci byla použita směs standardů rozpuštěných v acetonitrilu a byl hodnocen retenční čas, počet separovaných píků a jejich rozlišení. Podmínky separace byly voleny na základě předešlých analýz podle článku publikovaném v časopise Journal of Chromatography A [28]. Při vhodném gradientu by mělo docházet k dostatečné separaci jednotlivých analyzovaných látek a jejich píky by měly splňovat také požadavky na symetrii. V následující části jsou krátce popsány vybrané chromatografické podmínky (profil gradientové eluce), které byly testovány. Nejvhodnějším gradientem byl zvolen gradient 10 zobrazený na obrázku 20. Jednotlivé gradienty a separace fenolických látek jsou zobrazeny v následující tabulce 10.

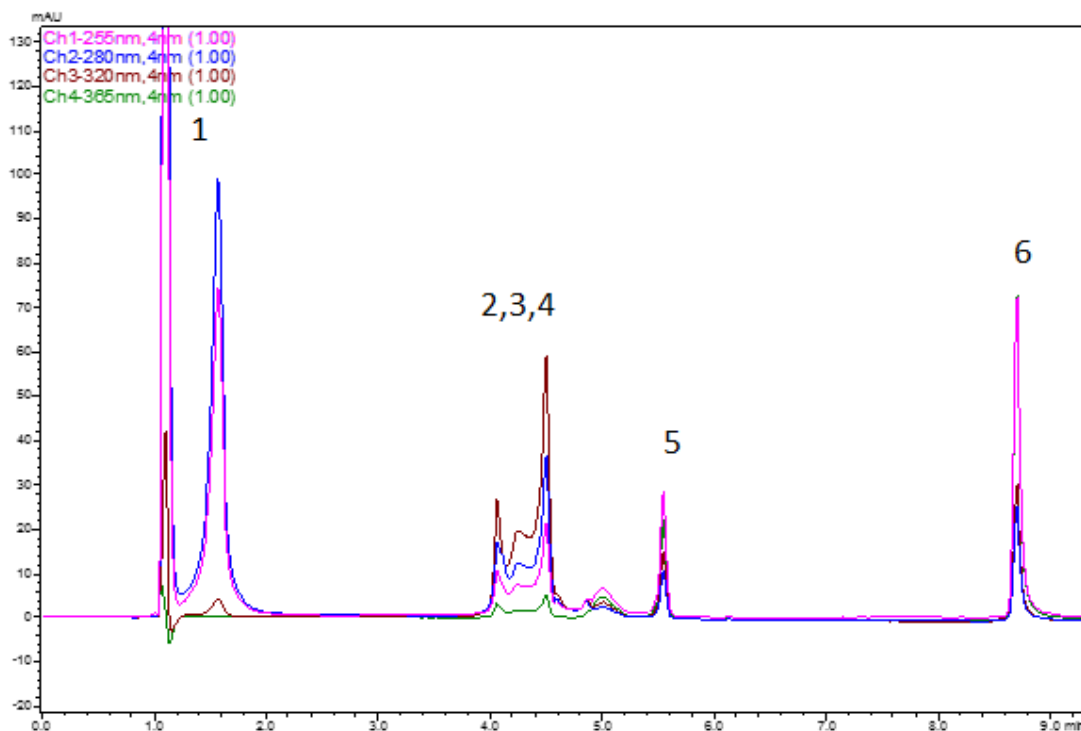


## GRADIENT 1

V gradientu č. 1 můžeme vidět, že určité standardy jsou eluovány z kolony ve stejném čase a dochází ke koeluci třech standardů do několika píků. Jedná se o kyselinu chlorogenovou, kávovou a katechin, tyto látky nelze jednoznačně od sebe rozlišit. Jako první se eluovala kyselina gallová, která vytváří dvojpík, po ní skupina standardů a posléze rutin a kvercetin. Tvary píků nejsou optimální ani z hlediska symetrie.

Tab. 7 Podmínky gradientu č.1

čas (min) \ MF	ACN (%)	H <sub>2</sub> O (pH 2,8) (%)
1.00	5	95
2.50	15	85
4.00	20	80
4.50	20	80
12.00	50	50
15.00	5	95
17.00	Kondicionace kolony	



Obr. 17 Chromatogram separace fenolických látek pro gradient 1 – kolona Supelco Ascentis (100 x 46 mm x 5  $\mu$ m), průtoková rychlost 1 ml/min

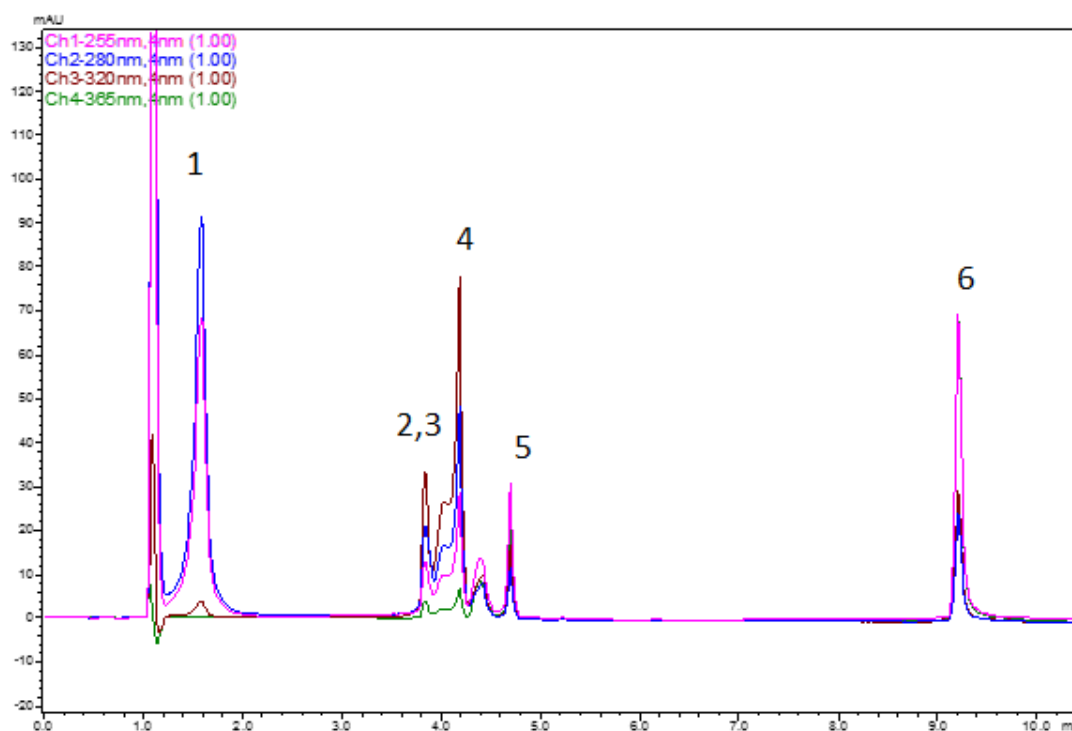
**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3,4 koeluce kyseliny chlorogenové, kávové a katechinu, 5 rutin, 6 kvercetin

### GRADIENT 3

V gradientu č. 3 jsme se dále snažili rozdělit společný pík několika standardů, ale jak je vidět na chromatogramu, tyto látky se stále eluují společně a vytvářejí několik nerozlišitelných píků. Jako první byla eluována kyselina gallová, dále koeluovala kyselina chlorogenová s kyselinou kávovou a katechinem, ihned po této směsi následuje rutin a až po deváté minutě kvercetin.

Tab. 8 Podmínky gradientu č.3

MF čas (min)	ACN (%)	H <sub>2</sub> O (pH 2,8) (%)
1.00	5	95
2.50	20	80
5.50	20	80
12.00	50	50
15.00	5	95
17.00	Kondicionace kolony	



Obr. 18 Chromatogram separace fenolických látek pro gradient 3 – kolona Supelco Ascentis (100 x 46 mm x 5  $\mu$ m), průtoková rychlost 1 ml/min

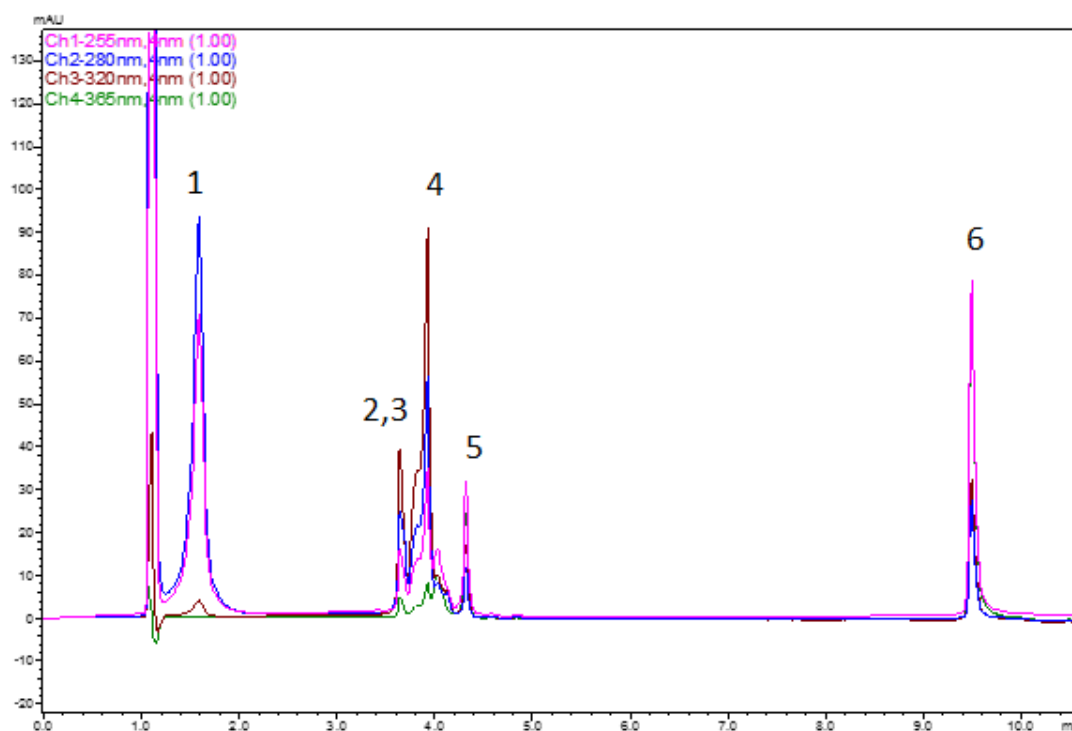
**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 kvercetin

## GRADIENT 4

Při použití gradientu č. 4 došlo ke zhoršení chromatografické separace, jednotlivé píky se k sobě více přiblížily, a dokonce došlo k částečnému spojení píku rutinu s píkem obsahující směs standardů (chlorogenová kyselina, kávová kyselina a katechin). První pík patří kyselině gallové a poslední pík kvercetin. Jsou od této směsi standardů dostatečně oddělené.

Tab. 9 Podmínky gradientu č.4

MF čas (min)	ACN (%)	H <sub>2</sub> O (pH 2,8) (%)
1.00	5	95
2.00	20	80
6.50	20	80
10.00	50	50
15.00	5	95
17.00	Kondicionace kolony	



Obr. 19 Chromatogram separace fenolických látek pro gradient 4 – kolona Supelco Ascentis (100 x 46 mm x 5  $\mu$ m), průtoková rychlost 1 ml/min

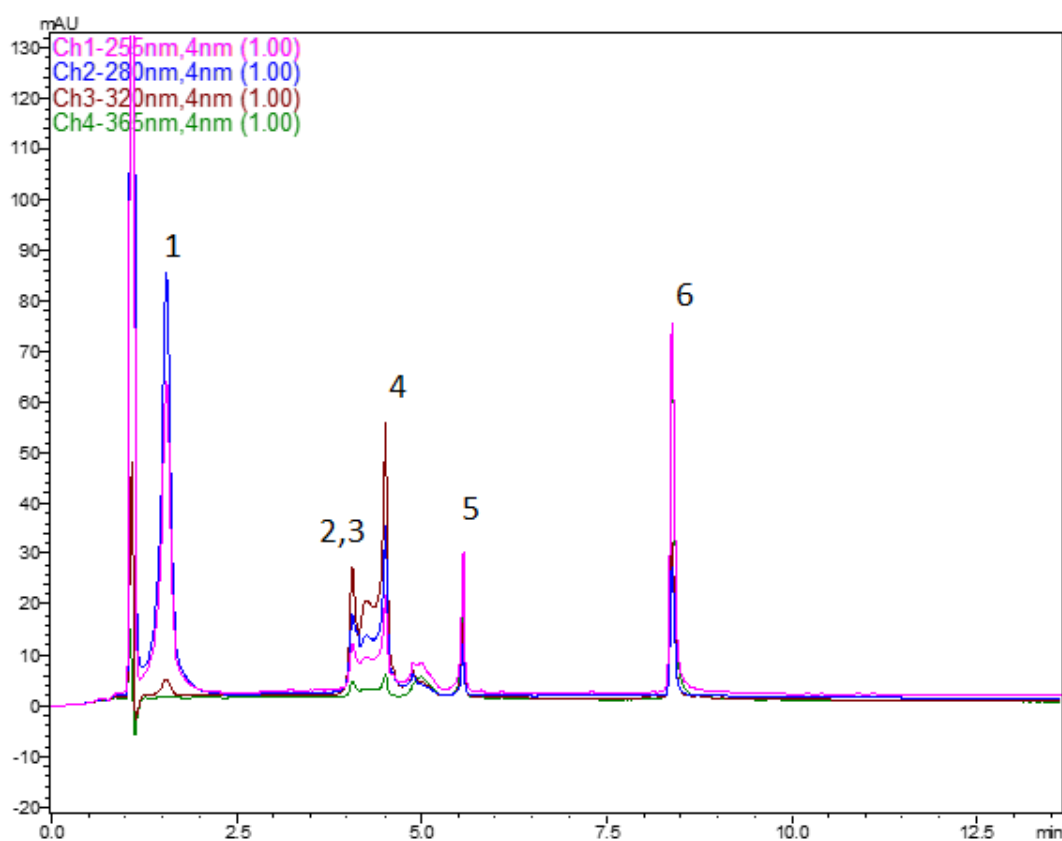
**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 kvercetin

## GRADIENT 10

Při separaci látek je zřetelné, že v retenčním čase okolo čtvrté minuty je eluováno hned několik látek společně. Jedná se o kyselinu chlorogenovou, kávovou a katechin. Dochází k eluci látek rychleji a analýza je ukončena již před devátou minutou.

Tab. 10 Podmínky gradientu č.10

MF čas (min)	ACN (%)	H <sub>2</sub> O (pH 2,8) (%)
1.00	5	95
2.50	15	85
12.00	50	50
15.00	5	95
17.00	Kondicionace kolony	



Obr. 20 Chromatogram separace fenolických látek pro gradient 10 - kolona Supelco Ascentis (100 x 46 mm x 5  $\mu$ m), průtoková rychlost 1 ml/min

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 kvercetin

Tab. 11 Přehled gradientů a průběh separace

gradient	separace
1	kyselina gallová vytváří dvojpík, okolo 4.minuty probíhá koeluze kyseliny chlorogenové, kávové a katechinu, tyto látky nelze jednoznačně od sebe rozlišit, dostatečně oddělený pík rutinu a kvercetin
2	u tohoto gradientu byla odstraněna etapa 85 % složky vody a prodloužena 80 % o 1,5 minuty, kyselina gallová stále vytváří dvojpík, pík rutinu se přiblížil ke společnému píku kyseliny chlorogenové, kávové a katechinu
3	gradient 3 byl oproti předešlému prodloužen v etapě 80 % složky vody (2,5-5,5 min), pík kyseliny gallové je beze změny, kyselina kávová se náznakem odděluje od společného píku kyseliny chlorogenové a katechinu, ale rutin je stále dost blízko těmto píkům
4	v gradientu č. 4 došlo k dalšímu prodloužení 80 % vodné fáze (2,0-6,5 min), kyselina kávová se téměř oddělila od kyseliny chlorogenové a katechinu, ale pík rutinu se až moc přiblížil ke kyselině kávové
5	gradient 5 probíhal podobně jako gradient 1, s tím rozdílem že 80 % vodná fáze začala již v 2,5 minutě, separace při tomto gradientu dopadla podobně jako v gradientu č. 3 jen s tím rozdílem, že poslední látka – kvercetin - byl eluován do 9. minuty, zatímco v předešlém gradientu až okolo 10. minuty
6	při tomto gradientu došlo k pozvolnějšímu přidávání acetonitrilové složky (zejména v první polovině gradientu), při separaci nedošlo k oddělení kyseliny chlorogenové, kávové a katechinu, pouze pík kvercetin byl eluován již před 7. minutou
7	v gradientu č. 7 došlo v 5. minutě k přidání 70 % vodné složky, ale opět nedošlo k oddělení koeluovaných látek (kyselina chlorogenová, kávová a katechin), rutin je opět přiblížen ke společnému píku
8	v gradientu č. 8 došlo k oddálení píku rutinu od společného píku kyseliny chlorogenové, kávové a katechinu, poslední pík – kvercetin byl eluován po 8. minutě, píky standardů jsou symetričtější
9	v gradientu č. 9 došlo k prodloužení analýzy o 2 minuty a následně i jednotlivých bodů gradientu, ale ani tato úprava nevedla k oddělení koeluujících látek
10	v gradientu č. 10 docházelo k pozvolnému snižování množství vodné složky do 2,5 minuty na 85 % a následně do 12. minuty na 50 %, kyselina kávová byla oddělena, pouze kyselina chlorogenová a katechin elují stále společně, ostatní látky (kyselina gallová, rutin a kvercetin) jsou dostatečně oddělené

Gradient 10 byl vybrán pro další testování z důvodu dostatečného oddělení kyseliny gallové, rutinu a kvercetin, i přesto že kyselina chlorogenová a katechin eluují společně. Velmi podobný gradient používaly i předchozí studie a na C18 koloně dlouhé 15 cm, která je uvedena na straně 38, je možné vidět, relativně dobrou separaci těchto látek.

### 6.1.2 Optimalizace stacionární fáze

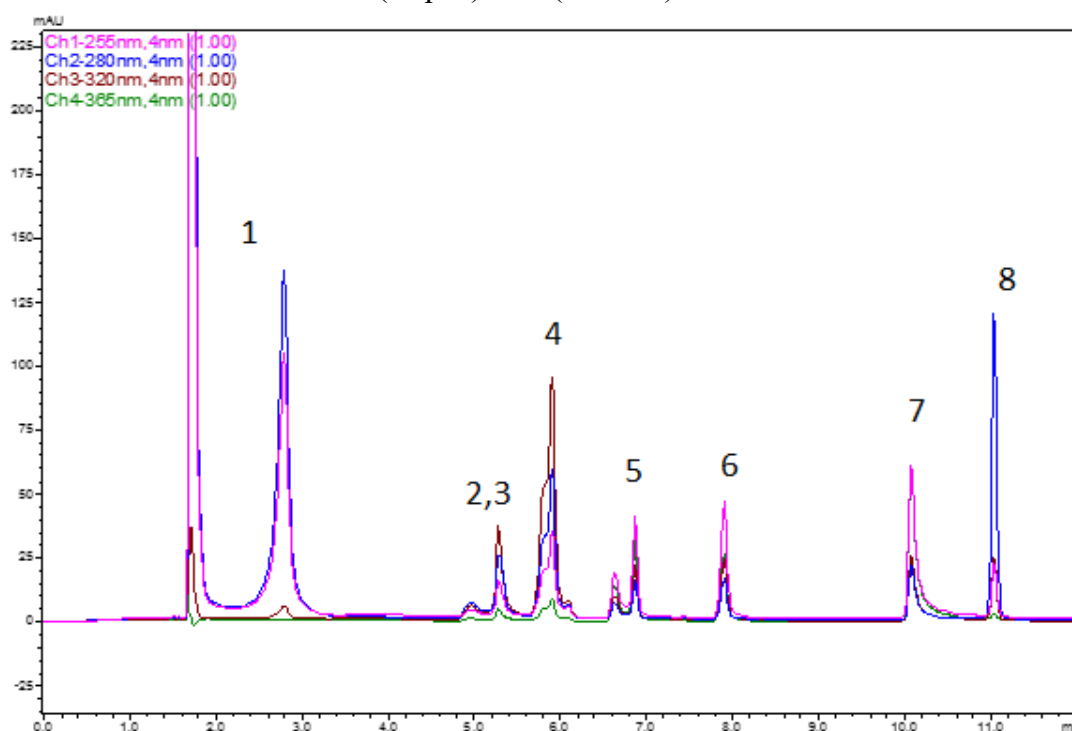
Při optimalizaci stacionární fáze bylo testováno několik kolon s rozdílným sorbentem, jak je zobrazeno v tabulce 12. Nejprve byla použita reverzní C18 stacionární fáze dlouhá 100 mm a posléze 150 mm, dále jsme použili bifenylovou a fenyl-hexylovou kolonu, další použitou kolonou byla amidová s dvěma rozdílnými velikostmi částic a poslední monolitická.

Tab. 12 Přehled použitých chromatografických kolon

kolona	rozměr
Kinetex C18	150 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m
Supelco Ascentis C18	100 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m
Kinetex XB-C18	150 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m
Kinetex Biphenyl	150 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m
Ascentis Phenyl-hexyl	100 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m
Supelco Ascentis RP-amide	100 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m
Supelco Ascentis RP-amide	100 x 3,0 mm x 2,7 $\mu$ m
Ascentis ES-CN	100 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m
Onyx Monolithic C18	100 x 4,6 mm

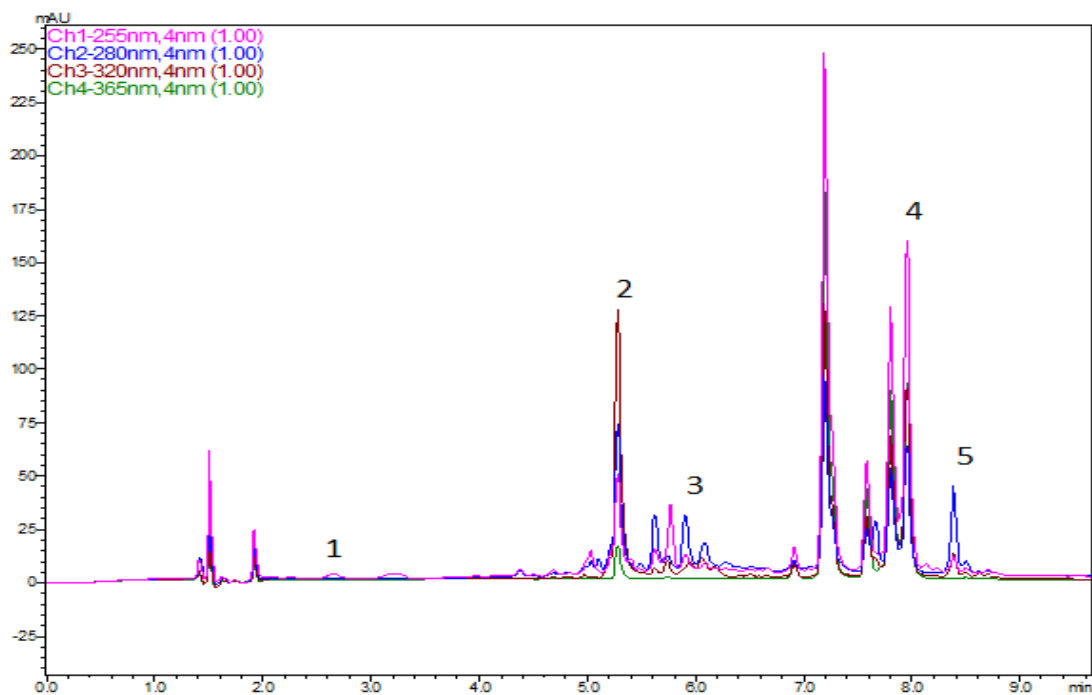
**C18 KOLONY** (Supelco Ascentis 100 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m, Kinetex 150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m, Kinetex XB-C18 150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m)

Nejprve bylo potřeba vyzkoušet, která z dostupných kolon se bude nejlépe hodit pro separaci směsi vybraných standardů. Jako první jsme použili C18 dlouhou 10 cm, při této separaci dochází ke koeluci třech látek (kys. chlorogenová, kávová a katechin), píky nejsou symetrické, a proto pro zlepšení separace byla použita C18 dlouhá 15 cm, obě separace je možné vidět na obrázku 21 a 24. Tvary píků na 15 cm koloně jsou štíhlejší, kyselina kávová se úplně rozdělila od katechinu a kyseliny chlorogenové, zatímco rutin vytváří dvojpík. Na této koloně byly analyzovány i reálné vzorky, separace těchto látek je znázorněna na obrázcích 22 (slupka) a 23 (dužnina).

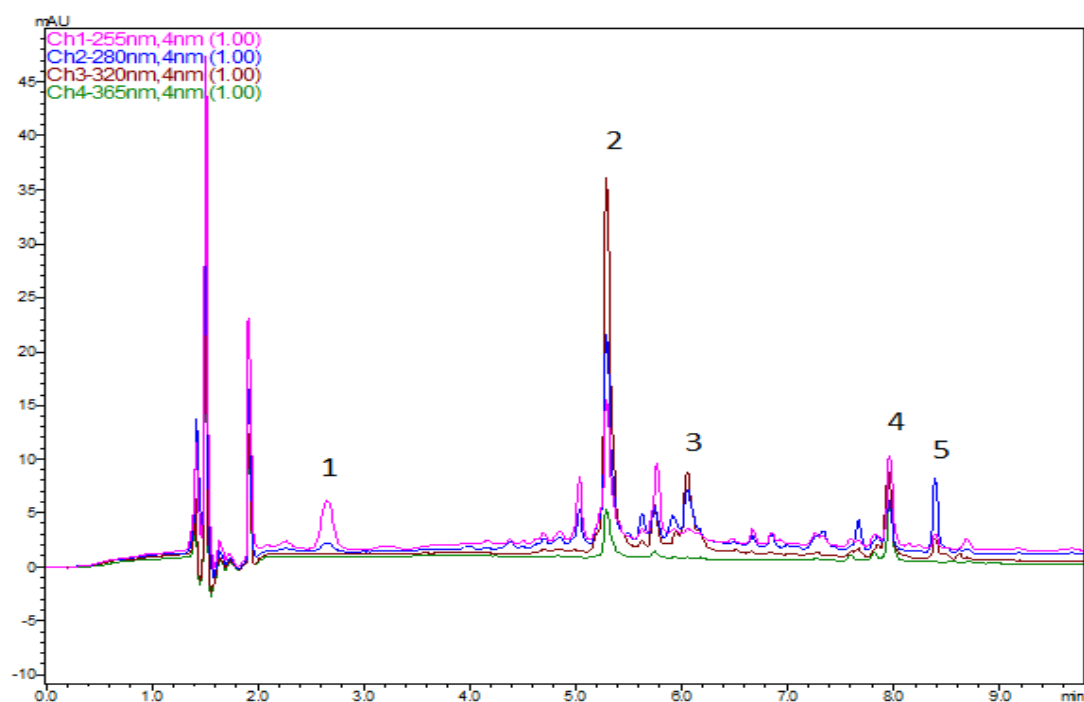


Obr. 21 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) gradient 10, průtoková rychlost 1 ml/min

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 kvercitrin, 7 kvercetin, 8 floretin



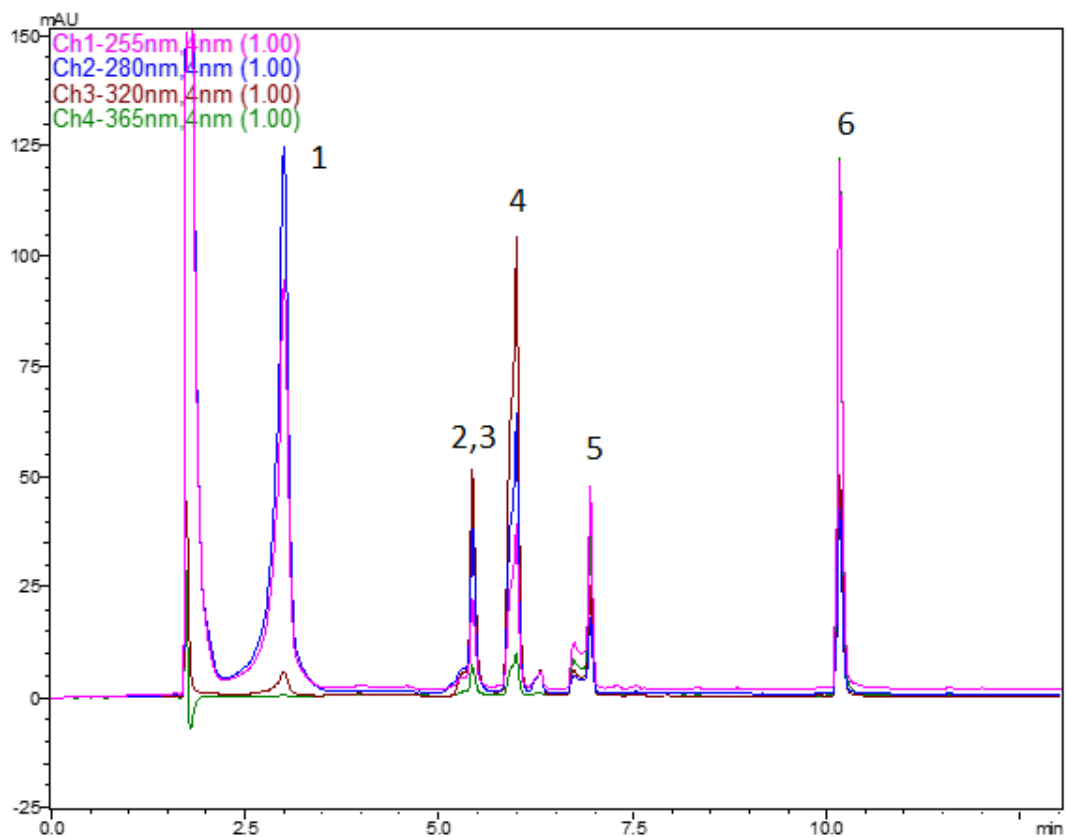
Obr. 22 Chromatogram separace reálného vzorku slupky jablka Golden Delicious na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), gradient 10, průtoková rychlost 1ml/min  
**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2 kyselina chlorogenová, 3 epikatechin, 4 kvercitrin, 5 floridzin



Obr. 23 Chromatogram separace reálného vzorku dužniny jablka Golden Delicious na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), gradient 10, průtoková rychlost 1ml/min  
**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2 kyselina chlorogenová, 3 epikatechin, 4 kvercitrin, 5 floridzin



Další použitou kolonou byla XB-C18, u této kolony byly vyzkoušeny dvě různé průtokové rychlosti (0,8 ml/min a 1 ml/min). Separace na této koloně probíhala téměř stejně jako na C18 koloně viz. obrázek 27. Pouze kyselina gallová na předešlé koloně vytvářela štíhlejší a symetričtější pik než tato.

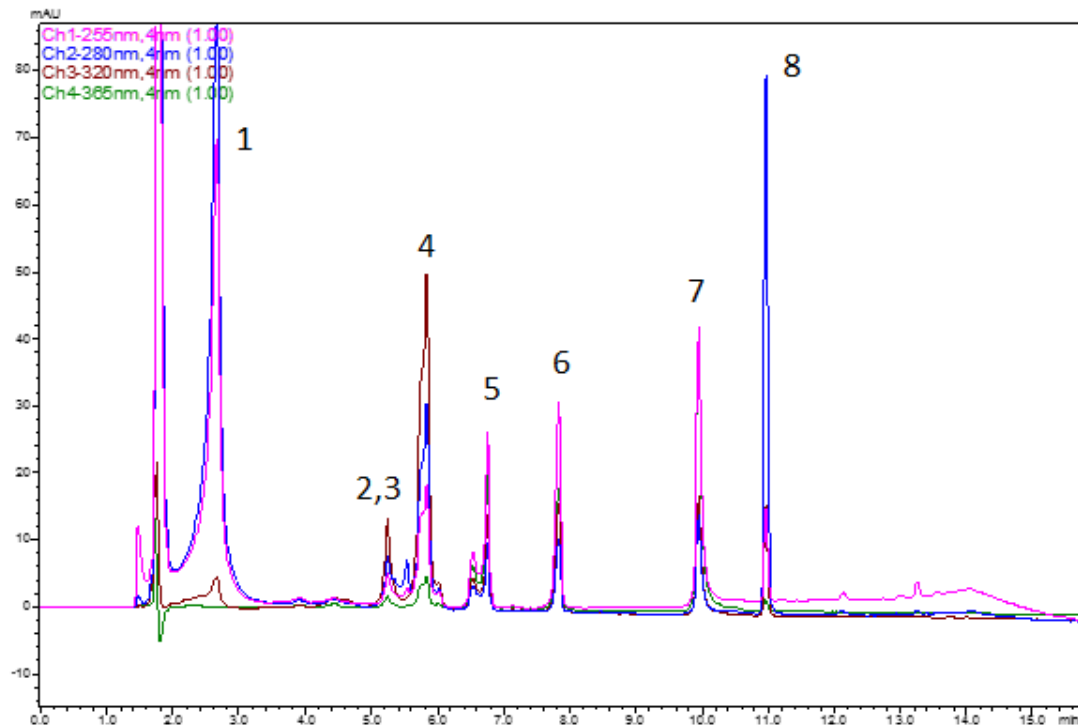


Obr. 24 Chromatogram separace fenolických látek, na koloně Kinetex XB-C18 (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) gradient 10, průtoková rychlost 1ml/min

**Pořadí piků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 floretin

## BIFENYLOVÁ KOLONA (Kinetex 150 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m)

Separace na bifenylové koloně vypadala ohledně tvarů píků lepší (symetričtější, štíhlejší), ale rozlišení nebylo dostatečné. Katechin a kyselina chlorogenová vytváří společný pík, který se nachází v blízkosti píku kyseliny kávové viz obrázek 25.

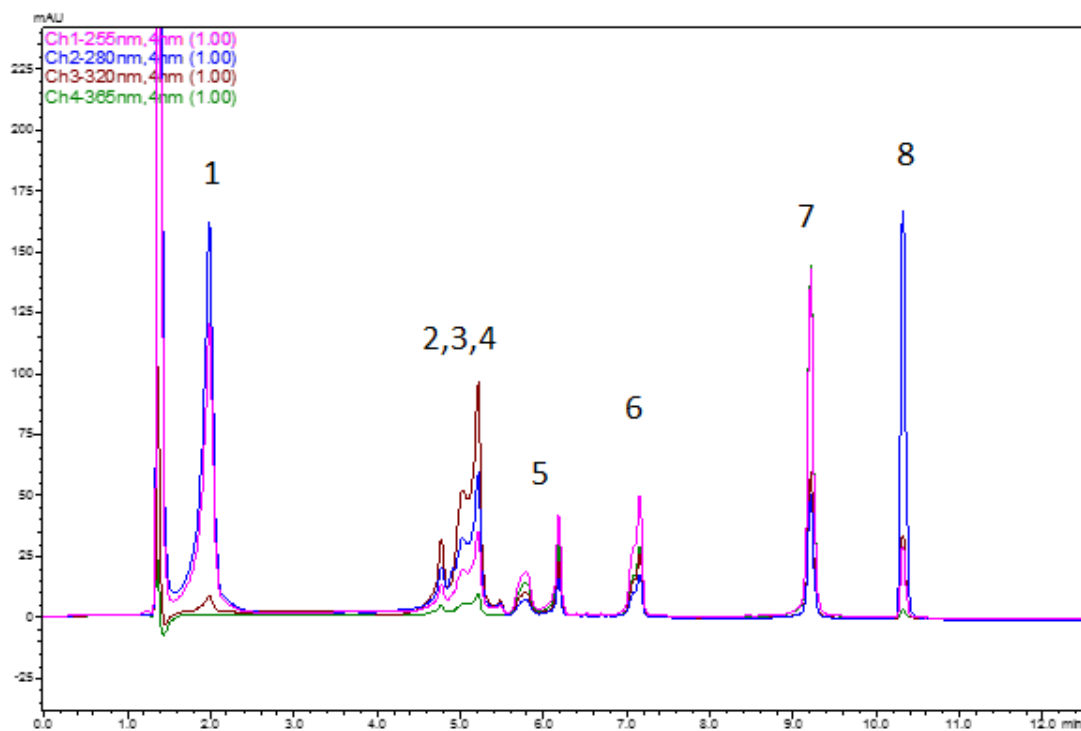


Obr. 25 Chromatogram separace fenolických látek, na koloně Kinetex biphenyl (150 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) gradient 10, průtoková rychlost 1ml/min

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 kvercitrin, 7 kvercetin, 8 floretin

## FENYL-HEXYL KOLONA (Ascentis 100 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m)

Při separaci na této koloně opět kyselina gallová vytvářela dvojpík s tím rozdílem, že došlo k posunutí nad základní linii. Kyselina kávová, chlorogenová a katechin koeluovali společně a na chromatogramu se jevíli jako trojpík. Pouze píky kvercetinu a floretinu vykazovali symetrii.

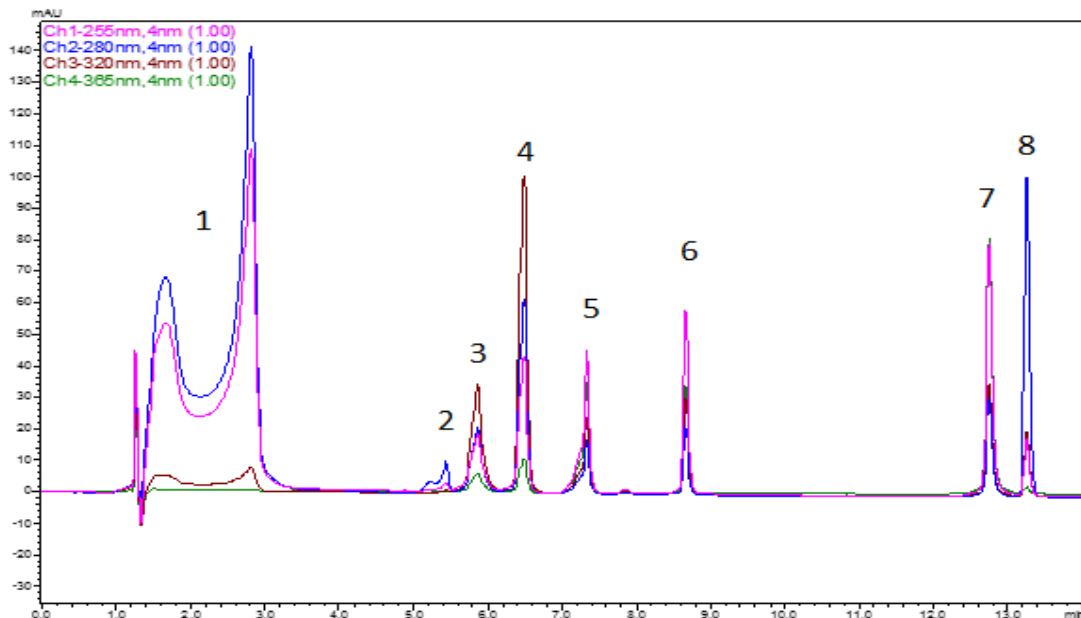


Obr. 26 Chromatogram separace fenolických látek, na koloně Ascentis Phenyl-hexyl (100 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) gradient 10, průtoková rychlost 0,8 ml/min

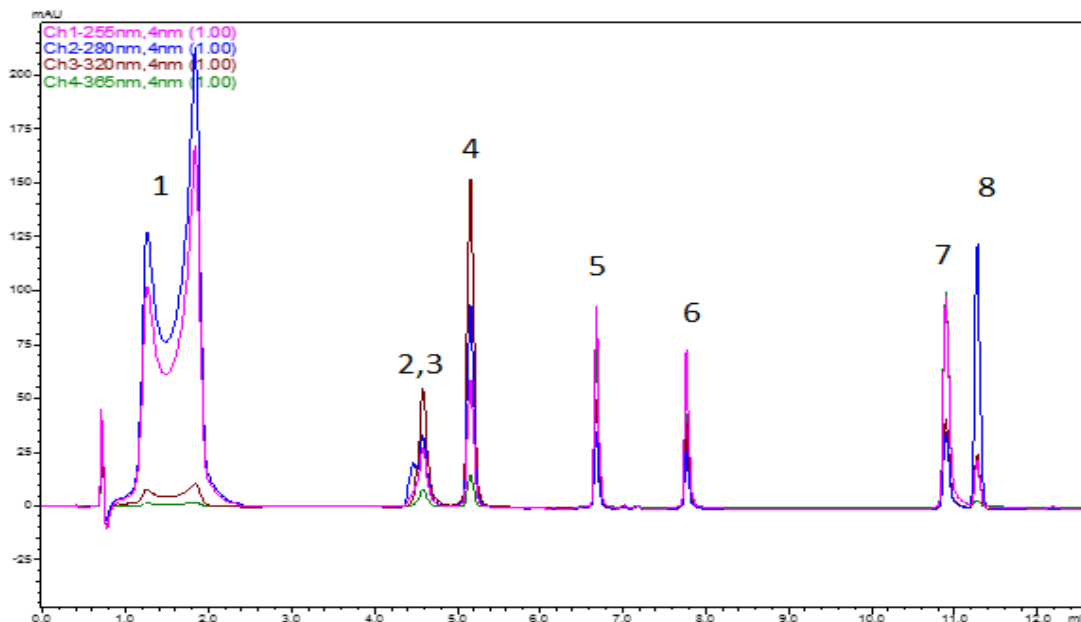
**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3,4 koeluze kyseliny chlorogenové, kávové a katechinu, 5 rutin, 6 kvercitrin, 7 kvercetin, 8 floretin

## AMIDOVÁ KOLONA

Poté jsme použili dvě amidové kolony s různou velikostí částic (2,7  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ ). Již na kyselině gallové je vidět, že tato separace není vhodná, dochází ke chvostování píku, i když ostatní standardy vykazovali štíhlejší píky.



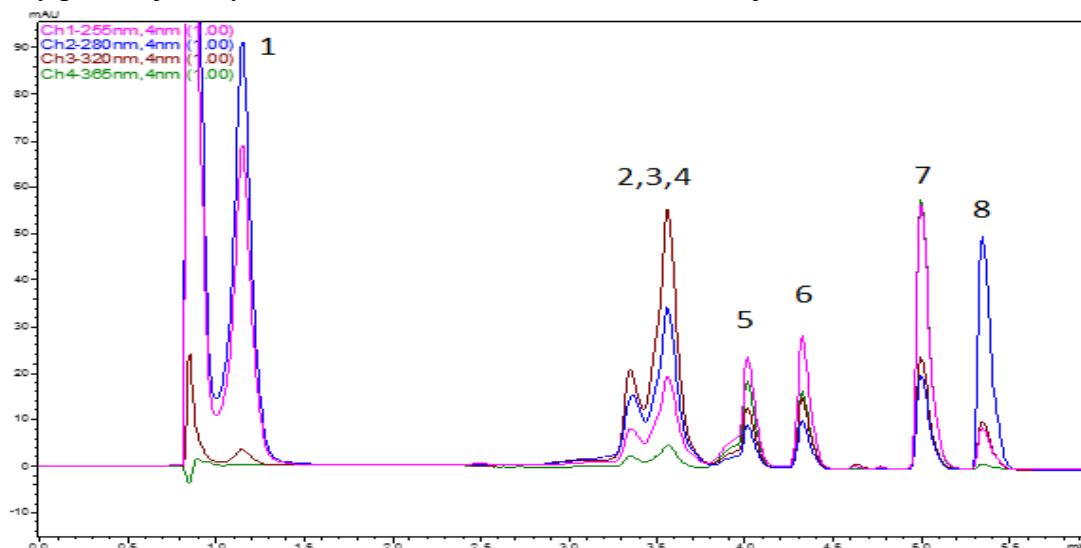
Obr. 27 Chromatogram separace fenolických látek, na koloně Supelco Ascentis RP-Amide (100 x 4,6 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) gradient 10, průtoková rychlost 0,8 ml/min  
**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 kvercitrin, 7 kvercetin, 8 floretin



Obr. 28 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Supelco Ascentis RP-Amide (100 x 3,0 mm x 2,7  $\mu\text{m}$ ) gradient 10, průtoková rychlost 0,8 ml/min  
**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 kvercitrin, 7 kvercetin, 8 floretin

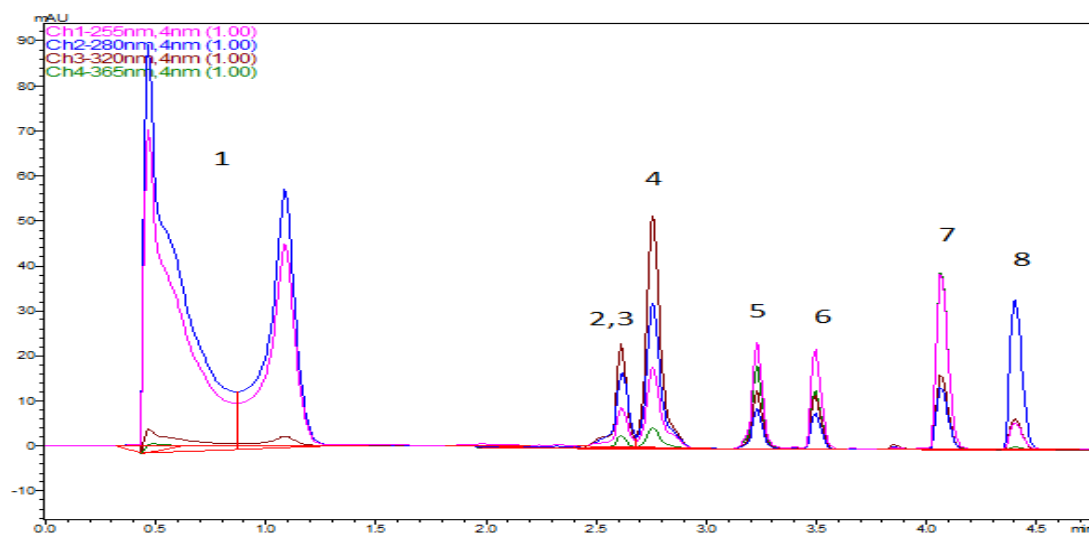
## MONOLITICKÁ KOLONA (Onyx 100 x 4,6 mm)

Monolitickou kolonu Onyx C18 jsme použili s průtokem 2 ml/min a 4 ml/min, v důsledku této vysoké průtokové rychlosti došlo k významnému zkrácení analýzy, jak je zřetelné na obr. 29 a 30. Kyselina gallová eluuje v dvojpíku, kyselina chlorogenová, kávová a katechin koelují společně, ostatní standardy jsou od sebe dostatečně odděleny. Tvary píků nejsou symetrické ani dostatečně štíhlé a chvostují.



Obr. 29 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm) gradient 10, průtoková rychlost 2 ml/min

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3,4 koeluce kyseliny chlorogenové, kávové a katechinu, 5 rutin, 6 kvercitrin, 7 kvercetin, 8 floretin

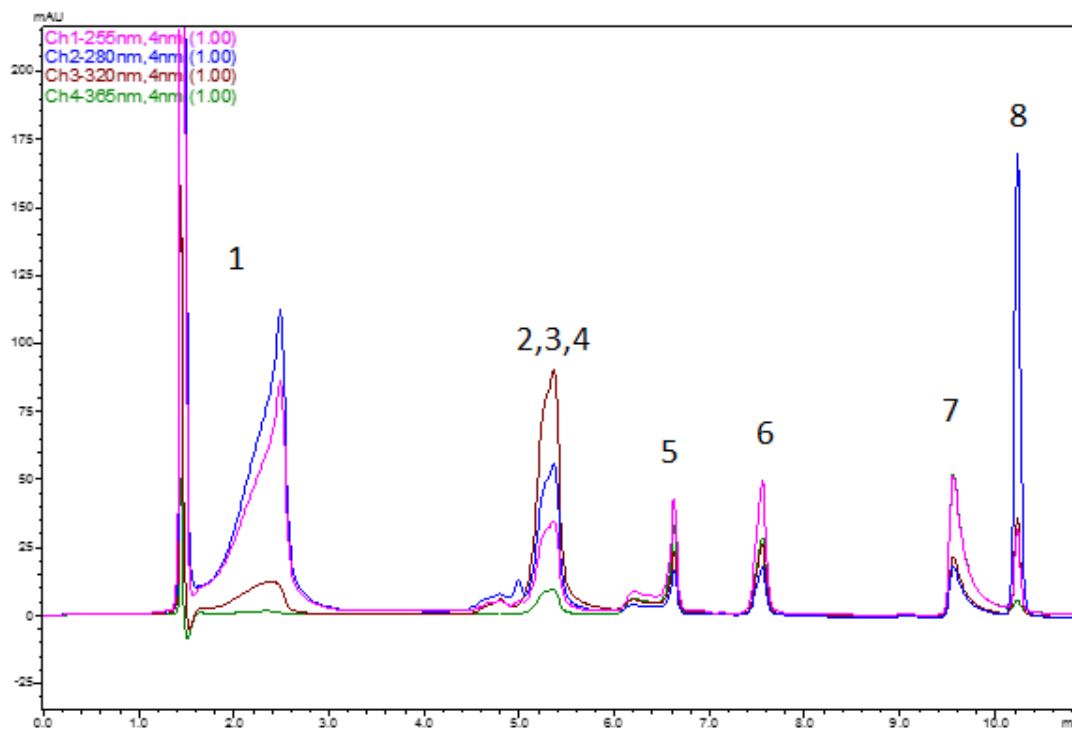


Obr. 30 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm) gradient 10, průtoková rychlost 4 ml/min

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 kvercitrin, 7 kvercetin, 8 floretin

## KYANO-KOLONA (Ascentis 100 x 4,6 mm x 5 $\mu$ m)

Jak bylo vidět i na předešlých kolonách, kyselina gallová vytváří dvojpík a kyselina chlorogenová, kávová a katechin eluují společně. Ostatní látky jsou téměř všechny dostatečně oddělené kromě kvercetinu, který je v těsné blízkosti floretinu.

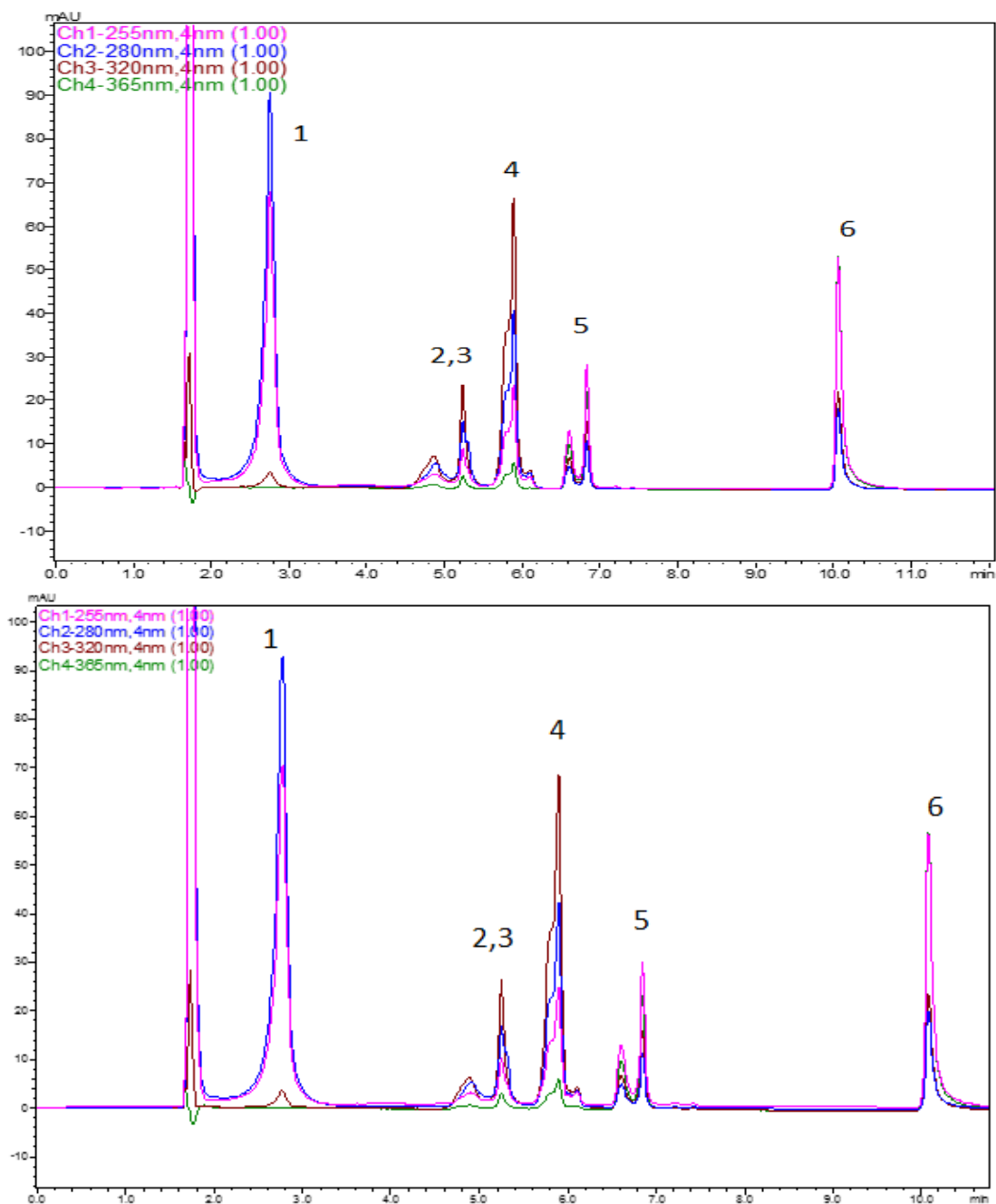


Obr. 31 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Ascentis ES-CN (100 x 4,6 mm x 5  $\mu$ m) gradient 10, průtoková rychlost 0,8 ml/min

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3,4 koeluce kyseliny chlorogenové, kávové a katechinu, 5 rutin, 6 kvercitrin, 7 kvercetin, 8 floretin

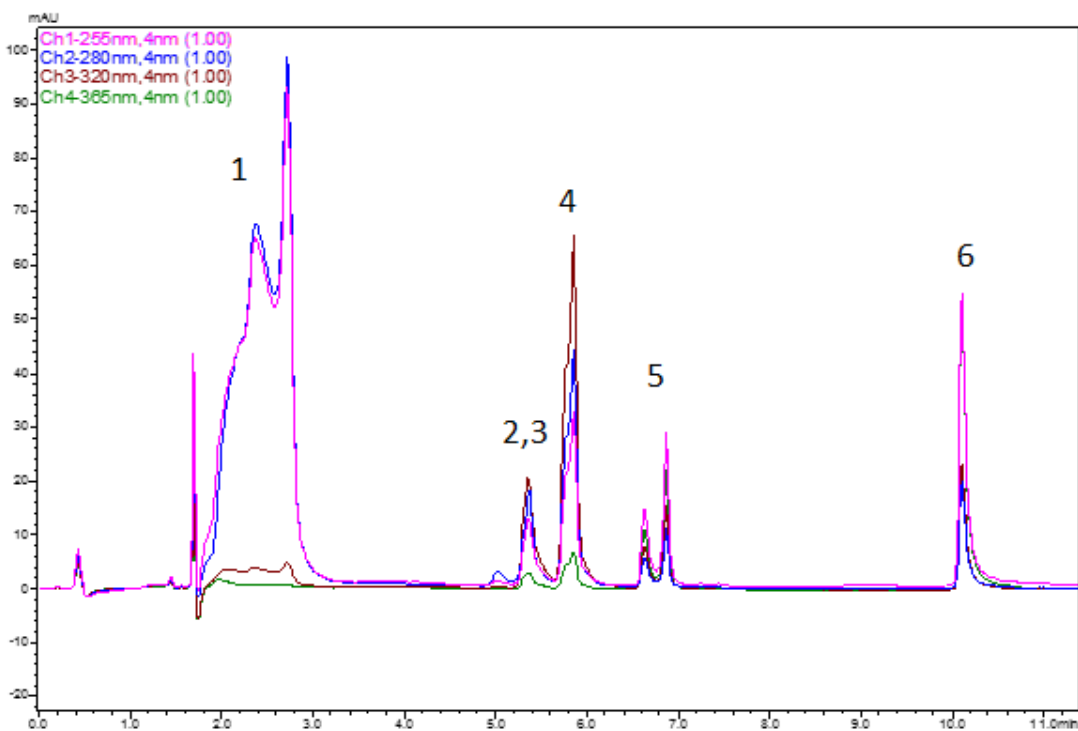
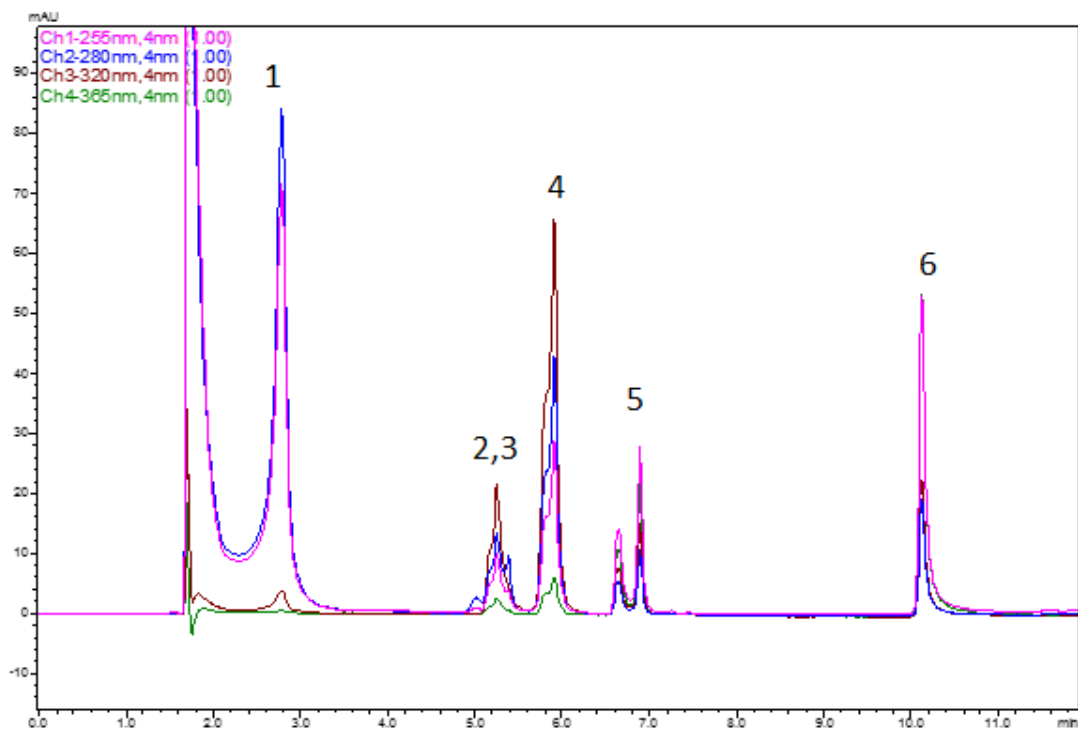
### 6.1.3 Optimalizace pH, průtokové rychlosti, výběr rozpouštědla pro extrakci analytů

Během optimalizace pH byly testovány 4 různé hodnoty pH (2,8; 3,3; 3,7; 3,9), pro ideální okyselení vodné složky mobilní fáze. Čím byla mobilní fáze kyselější, tím více ovlivňovala tvar dvojpíku kyseliny gallové, na ostatní látky neměla změna pH významný vliv, dokud se nepřiblížilo pH k hodnotě 4. Při pH 3,9 je zřetelné, že tvary píků nejsou ideální a tato separace není vhodná, viz obrázek 32 a 33.



Obr. 32 Optimalizace pH 2,8 a 3,3

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 kvercetin

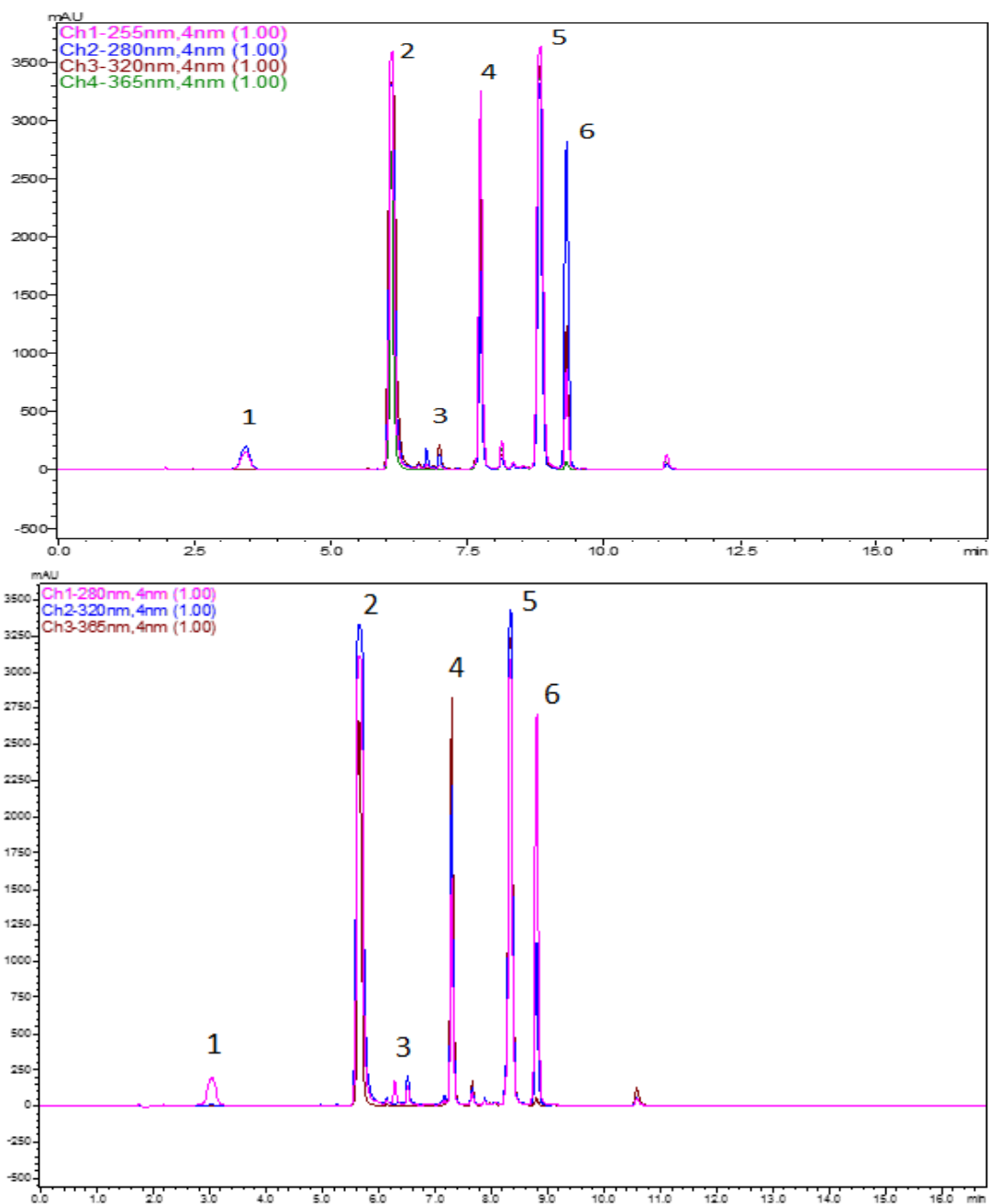


Obr. 33 Optimalizace pH 3,7 a 3,9

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2,3 koeluce kyseliny chlorogenové a katechinu, 4 kyselina kávová, 5 rutin, 6 kvercetin

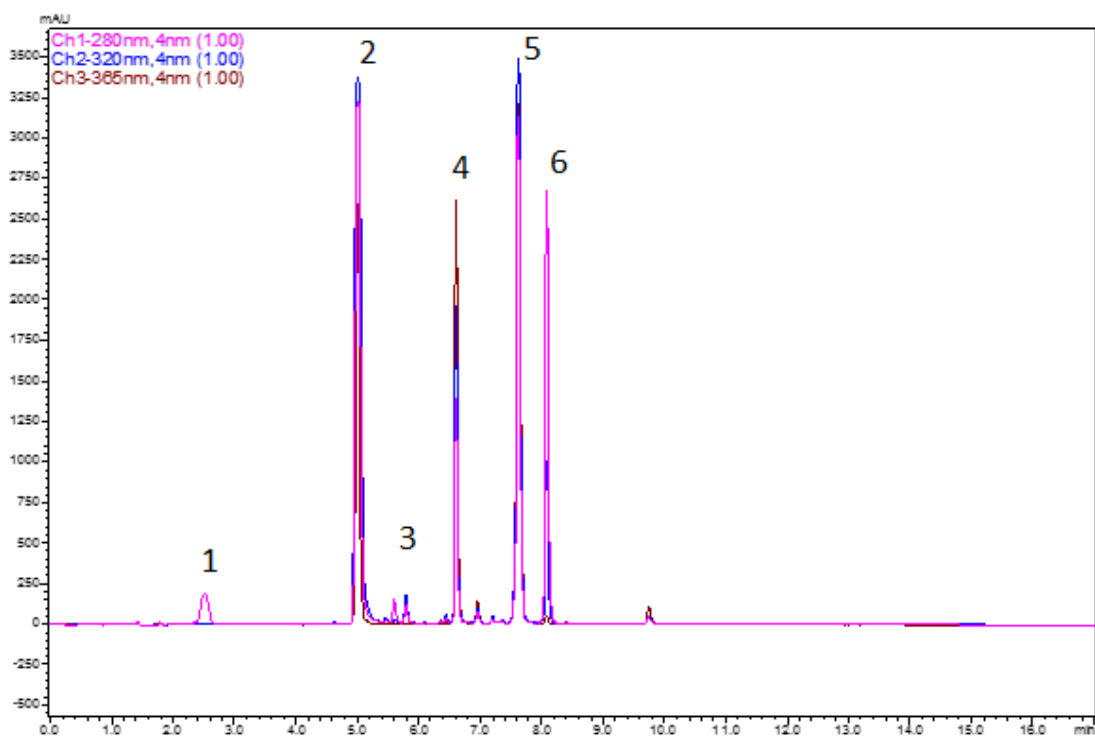
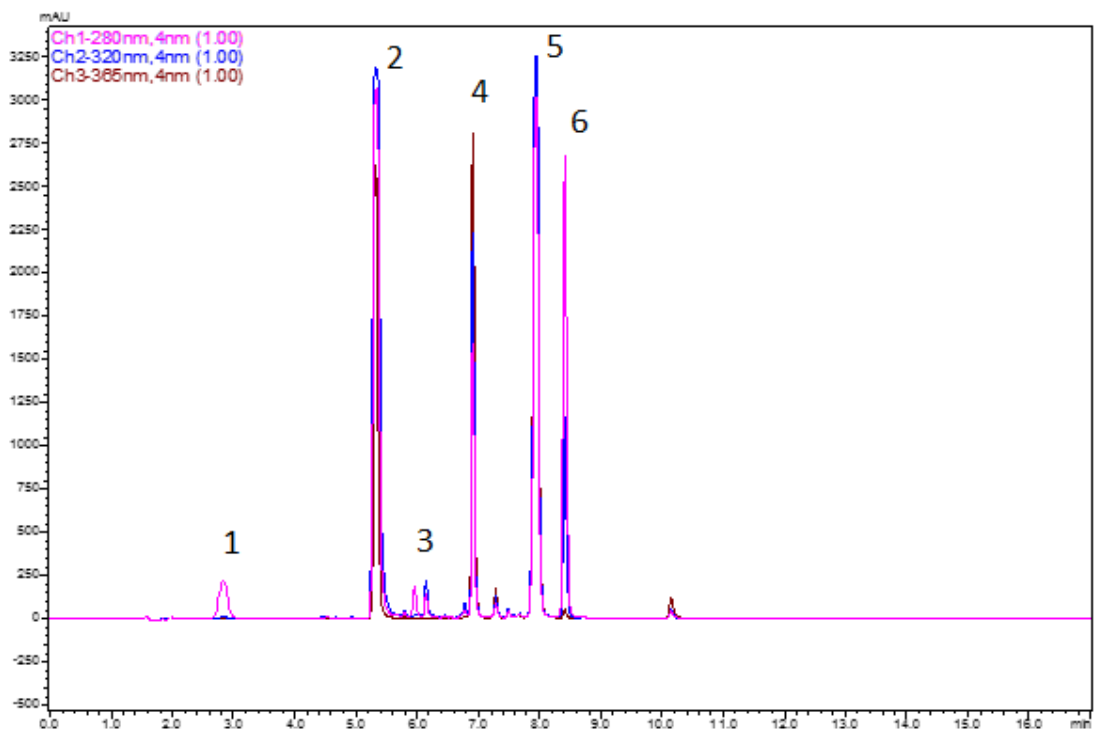


Při optimalizaci byly zkoušeny průtokové rychlosti v rozmezí od 0,8 až 1,1 ml/min, změna průtoku byla upravována vždy o 0,1 ml/min. Při průtokové rychlosti 0,8 ml/min je viditelné, že píky nedosahují takové symetrie jako u ostatních průtoků. Při použití průtokových rychlostí 1 ml/min a 1,1 ml/min dochází ke srovnatelné separaci látek. Srovnání separací je zobrazeno na obrázcích 34 a 35. Pro další použití byla vybrána průtoková rychlost 1,0 ml/min.



Obr. 34 Optimalizace průtokové rychlosti 0,8 a 0,9 ml/min

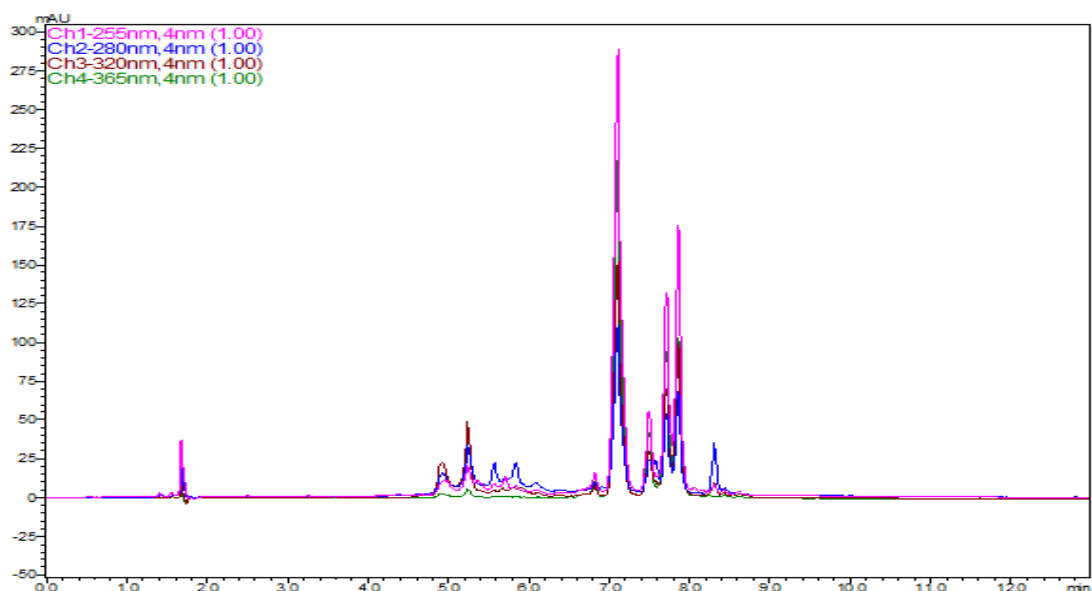
**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2 kyselina chlorogenová, 3 epikatechin, 4 rutin, 5 kvercitrin, 6 floridzin



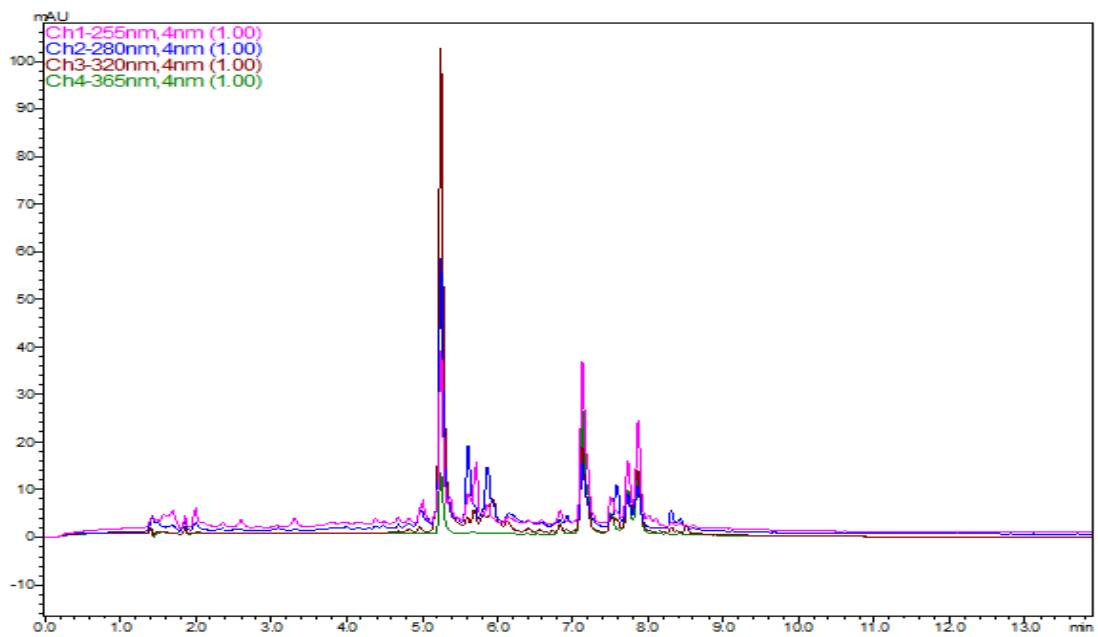
Obr. 35 Optimalizace průtokové rychlosti 1,0 a 1,1 ml/min

Pořadí píků: 1 kyselina gallová, 2 kyselina chlorogenová, 3 epikatechin, 4 rutin, 5 kvercitrin, 6 floridzin

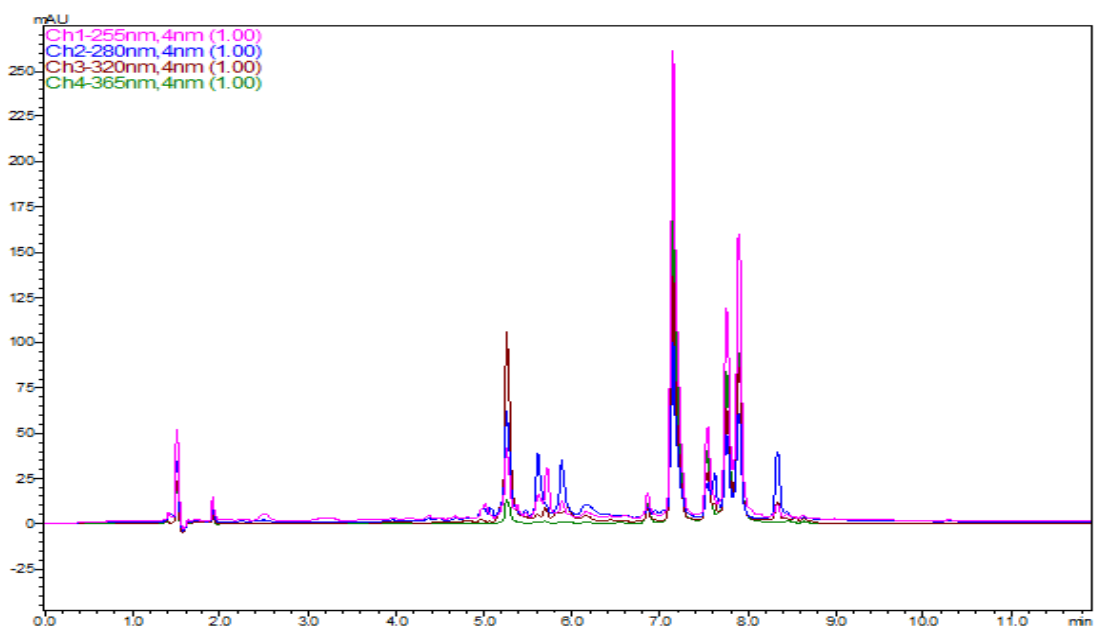
Výběr vhodného extrakčního rozpouštědla byl testován na dužnině a slupce jablečné odrůdy Golden Delicious. Mezi testovanými rozpouštědly byla voda, 100% methanol, 100% acetonitril, 90% acetonitril a 80% acetonitril. Pro znázornění účinnosti extrakce byly použity chromatogramy separace jablečné slupky zobrazeny na obrázku 36-38. Při použití ACN (100%, 90%, 80%) je viditelné, že není úplně vhodný pro látky, které eluují mezi prvními (hydrofilní). Zatímco odezvy látek elujících po sedmé minutě jsou srovnatelné se 100% methanolem. Nejméně vhodné extrakční rozpouštědlo byla voda, která sice zlepšila extrakci hydrofilních látek, ale zároveň výrazně snižuje extrakci lipofilních analytů. Při extrakci 100% methanolem byl nalezen kompromis mezi efektivitou extrakce pro různé látky i z pohledu symetrie píků, z tohoto důvodu byl vybrán jako nejvhodnější rozpouštědlo.



Obr. 36 Optimalizace extrakčního rozpouštědla - 100% ACN



Obr. 37 Optimalizace extrakčního rozpouštědla - voda



Obr. 38 Optimalizace extrakčního rozpouštědla – 100 % methanol

## 6.2 Validace

### 6.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Test vhodnosti chromatografického systému obsahuje hodnocení retenčního času ( $t_r$ ), rozlišení chromatografických píků ( $R_s$ ), faktor symetrie chromatografických píků ( $A_s$ ), kapacitní faktor ( $k$ ) a opakovatelnost.

Rozlišení se hodnotí ze 3 nástřiků. Hodnota rozlišení by měla dosahovat hodnoty vyšší než 1,5. Faktor symetrie stejně jako rozlišení se hodnotí ze 3 nástřiků. Doporučená hodnota je v rozmezí od 0,8 – 1,5 [29].

V tabulce 12 je uveden výběr látek, které byly použity v závislosti na výskytu v reálných vzorcích.

Tab. 13 Parametry testu vhodnosti chromatografického systému

	$t_r$ (min)	$R_s$	$A_s$	$k$
kys. gallová	2,975	5,910	0,989	5,910
kys. chlorogenová	5,408	10,325	1,284	1,644
epikatechin	6,085	4,133	1,343	1,977
rutin	7,048	7,226	1,288	2,448
floridzin	8,565	2,847	1,281	3,191

Pro hodnocení opakovatelnosti byla připravena směs standardů popsána v kapitole 5.3.4. Bylo provedeno 6 po sobě jdoucích nástřiků na kolonu a následně byla hodnocena relativní směrodatná odchylka hodnot plochy píku a retenčního času, jsou zobrazeny v tabulkách 13 a 14.

Tab. 14 Hodnocení opakovatelnosti - plocha píku

	koncentrace (mg/ml)	plocha píku	SD	RSD (%)
kys. gallová	1,00	2847861	28521	1,00
kys. chlorogenová	100,0	28705297	183528	0,64
epikatechin	1,00	667589	3021	0,45
rutin	10,00	11130887	78529	0,71
floridzin	10,0	12343697	122251	0,99

*Tab. 15 Hodnocení opakovatelnosti - retenční čas*

	koncentrace (mg/ml)	retenční čas (min)	SD	RSD (%)
kys. gallová	1,00	2,982	0,016	0,53
kys. chlorogenová	100,0	5,416	0,027	0,50
epikatechin	1,00	6,081	0,003	0,05
rutin	10,00	7,045	0,011	0,15
floridzin	10,0	8,569	0,015	0,17

Při testování opakovatelnosti se směrodatná odchylka plochy píku pohybovala v rozmezí 0,45–1,00 % a směrodatná odchylka retenčního času 0,05-0,53 % a oba hodnocené parametry tedy nepřekročily hodnotu RSD, která je považována za limitní 1,00 % [29].

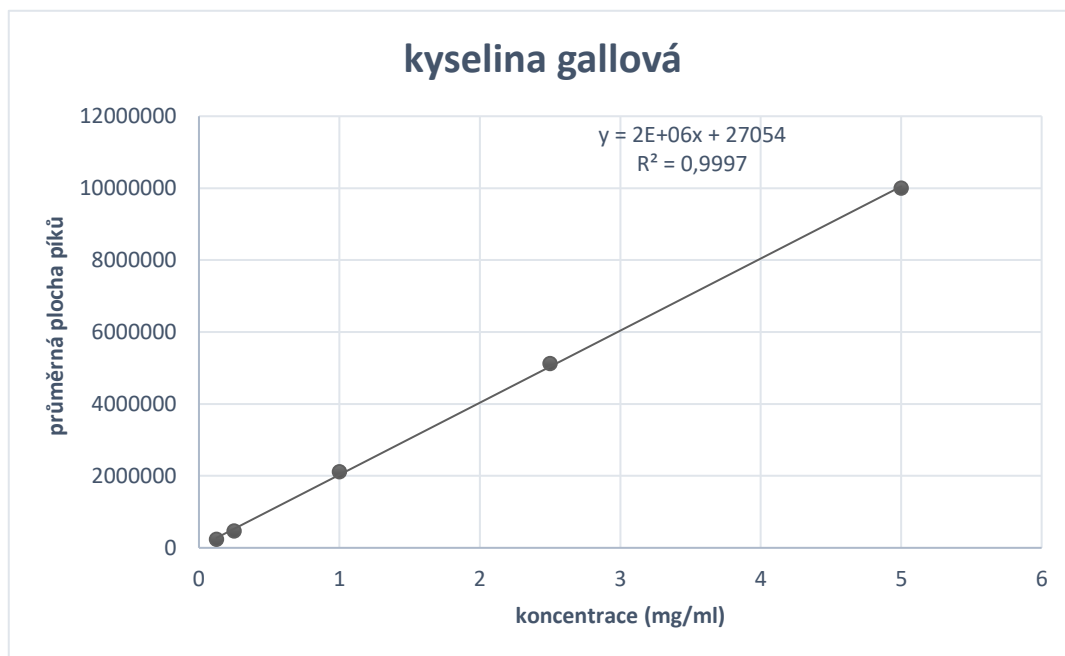
## 6.2.2 Linearita

Pro hodnocení linearity bylo použito 5 kalibračních roztoků o různé koncentraci. Příprava těchto roztoků je popsána v kapitole 5.3.5. Nástřik každého kalibračního roztoku proběhl třikrát a následně byla hodnota plochy píku pro každou koncentraci zprůměrována. Pomocí metody lineární regrese byla vyhodnocena závislost průměrných ploch píků na jejich koncentraci.

### 6.2.2.1 Kalibrační závislost kyseliny gallové

Tab. 16 Test linearity pro kyselinu gallovou

kyselina gallová	
koncentrace mg/ml	průměrná plocha píku
0,125	228815,3
0,250	465135,6
1,00	2112658,3
2,50	5120997,6
5,00	9993024,6



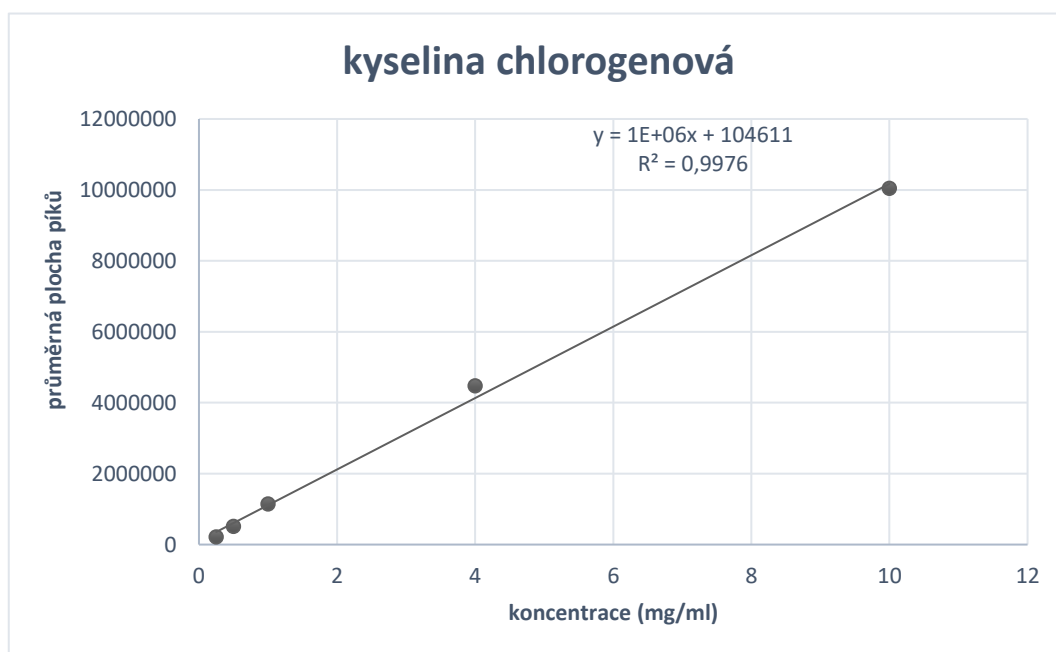
Obr. 39 Kalibrační závislost kyseliny gallové

Linearita kyseliny gallové byla potvrzena v rozmezí 0,125 – 5 mg/ml s korelačním koeficientem 0,9997.

### 6.2.2.2 Kalibrační závislost kyseliny chlorogenové

Tab. 17 Test linearity pro kyselinu chlorogenovou

kyselina chlorogenová	
koncentrace mg/ml	průměrná plocha piku
0,250	210453,3
0,500	513707,0
1,00	1142638,0
4,00	4470170,0
10,00	10040518,0



Obr. 40 Kalibrační závislost kyseliny chlorogenové

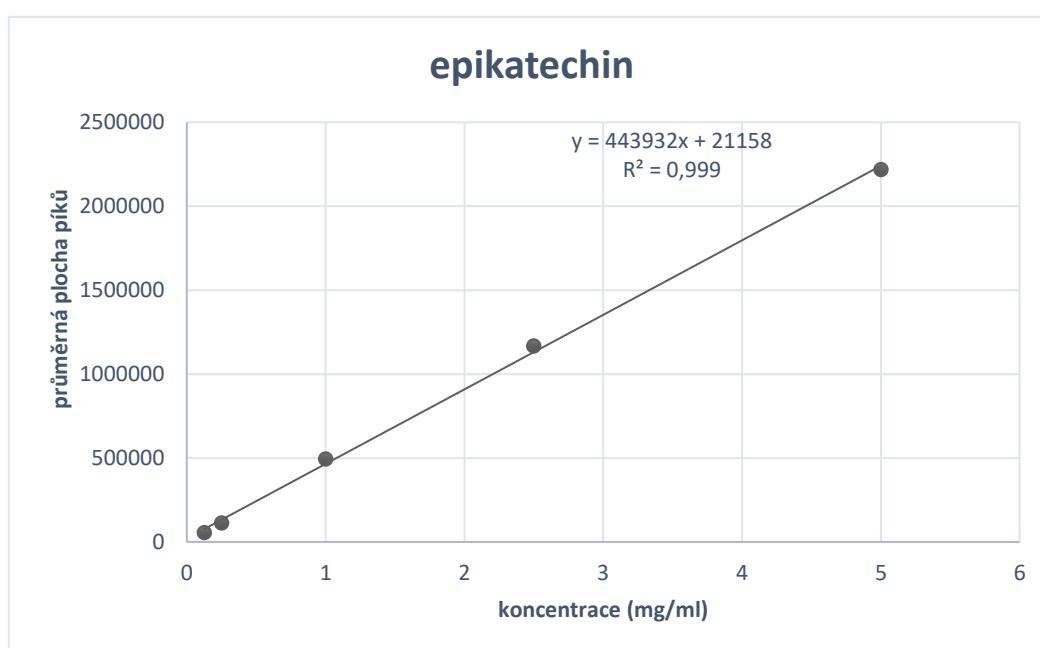
Linearita kyseliny chlorogenové byla potvrzena v rozmezí 0,25 – 10 mg/ml a korelační koeficient dosáhl hodnoty 0,9976.



### 6.2.2.3 Kalibrační závislost epikatechinu

Tab. 18 Test linearity pro epikatechin

epikatechin	
koncentrace mg/ml	průměrná plocha píku
0,125	55012,6
0,250	111896,0
1,00	493178,3
2,50	1166702,0
5,00	2218896,6



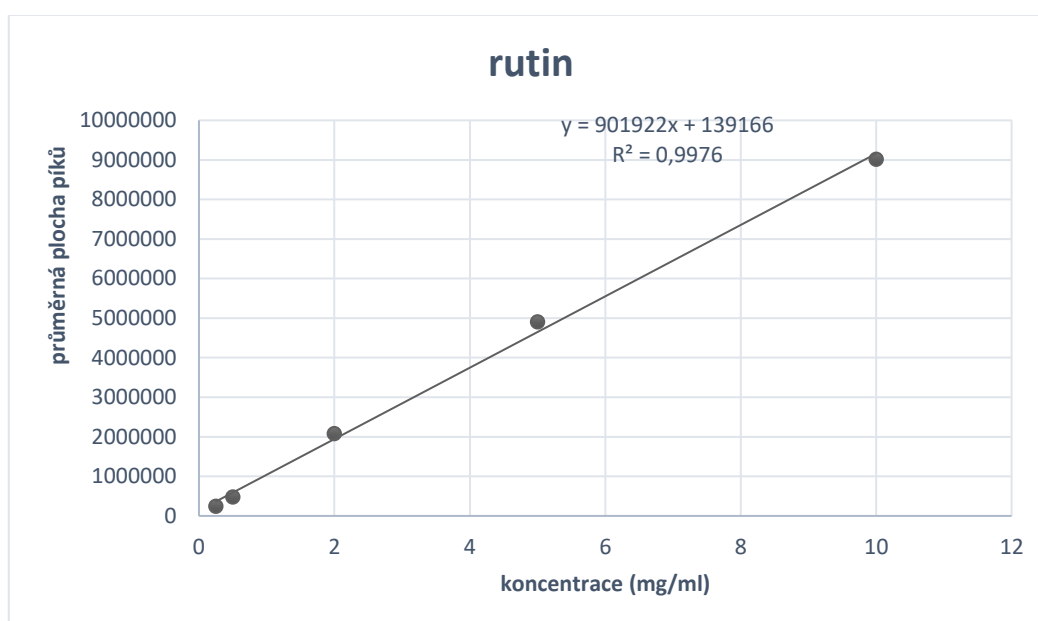
Obr. 41 Kalibrační závislost epikatechinu

Linearita epikatechinu byla potvrzena v rozmezí 0,125 – 5 mg/ml a korelační koeficient dosáhl hodnoty 0,999.

#### 6.2.2.4 Kalibrační závislost rutinu

Tab. 19 Test linearity pro rutin

rutin	
koncentrace mg/ml	průměrná plocha piku
0,250	236927,0
0,500	473184,6
2,00	2081101,3
5,00	4899074,0
10,00	9014662,3



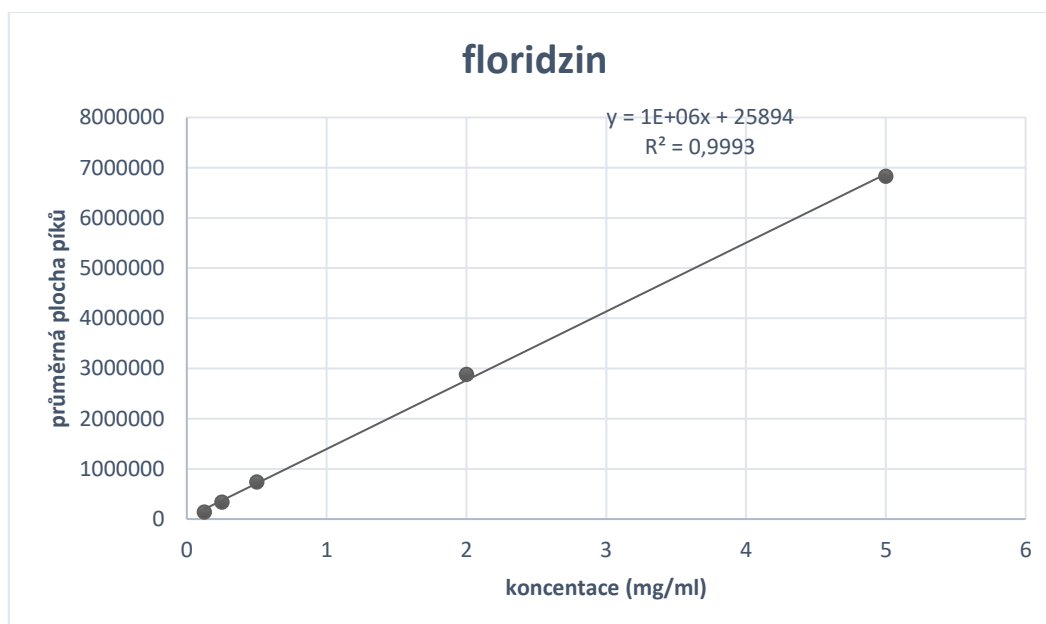
Obr. 42 Kalibrační závislost rutinu

Linearita rutinu byla potvrzena v rozmezí 0,25 – 10 mg/ml stejně jako kyselina chlorogenová. Korelační koeficient byl 0,9976.

### 6.2.2.5 Kalibrační závislost floridzinu

Tab. 20 Test linearity pro floridzin

floridzin	
koncentrace mg/ml	průměrná plocha piku
0,125	136213,0
0,250	331964,7
0,500	737378,7
2,00	2881457,0
5,00	6827906,0



Obr. 43 Kalibrační závislost floridzinu

Linearita floridzinu byla potvrzena v rozmezí 0,125 – 5 mg/ml, stejně tomu tak bylo i u kyseliny gallové a epikatechinu. Korelační koeficient dosáhl hodnoty 0,9993.

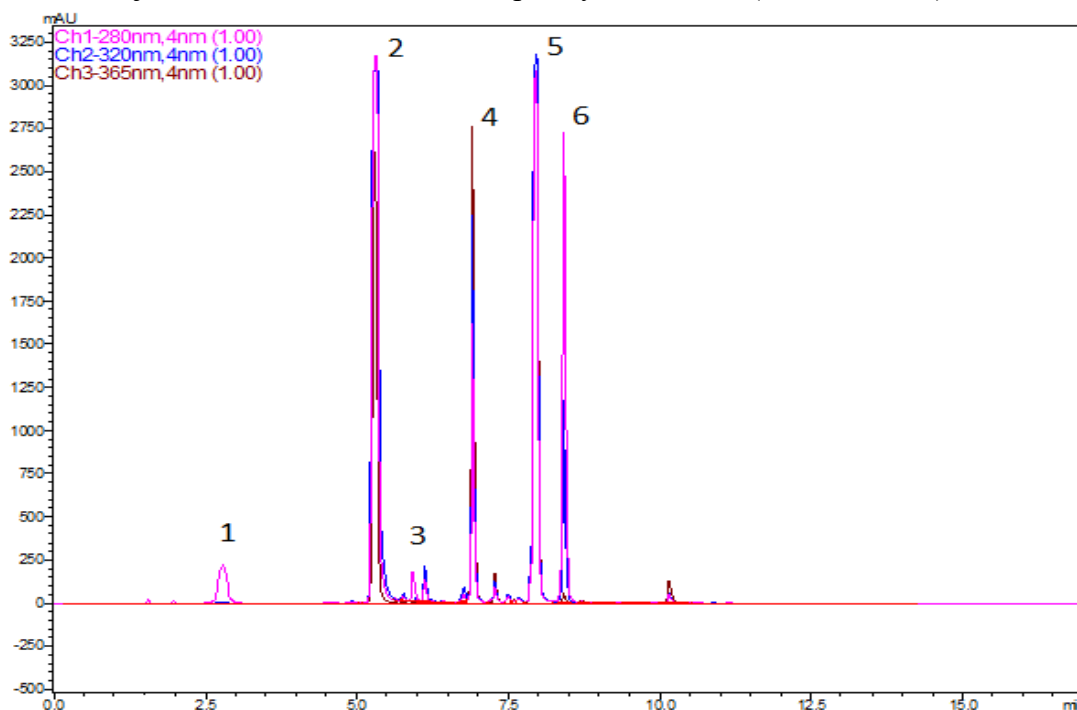
### 6.2.3 Robustnost

V rámci robustnosti byla testována změna mobilní fáze, resp. okyselení vodné fáze kyselinou octovou a mravenčí, změna teploty v termostátovém prostoru a úprava gradientu o  $\pm 5\%$ . Testování změny průtokové rychlosti bylo popsáno dříve, viz kapitola 6.1.3.

Cílem robustnosti je zjistit, do jaké míry lze měnit separační podmínky, aby byla zachována dostatečná separace.

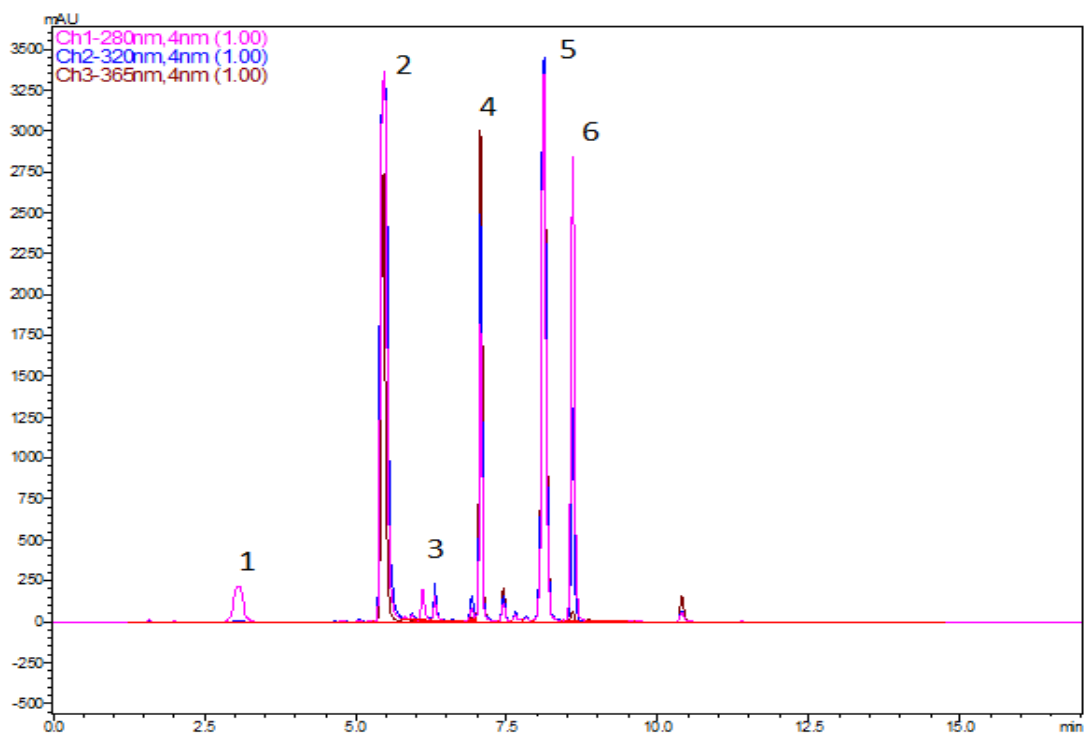
#### 6.2.3.1 Mobilní fáze (kyselina mravenčí, octová)

Separace při použití MF s kyselinou octovou probíhala téměř srovnatelně jako s MF s kyselinou mravenčí. Jak je vidět na obrázcích 39 a 40 dochází pouze k nepatrně lepší symetrii při použití kyseliny octové. Proto byla také kyselina octová vybrána pro další použití a nejen z tohoto důvodu, ale také pro vyšší stabilitu (nižší těkavost).



Obr. 44 Separace za použití MF kyseliny mravenčí

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2 kyselina chlorogenová, 3 epikatechin, 4 rutin, 5 kvercitrin, 6 floridzin

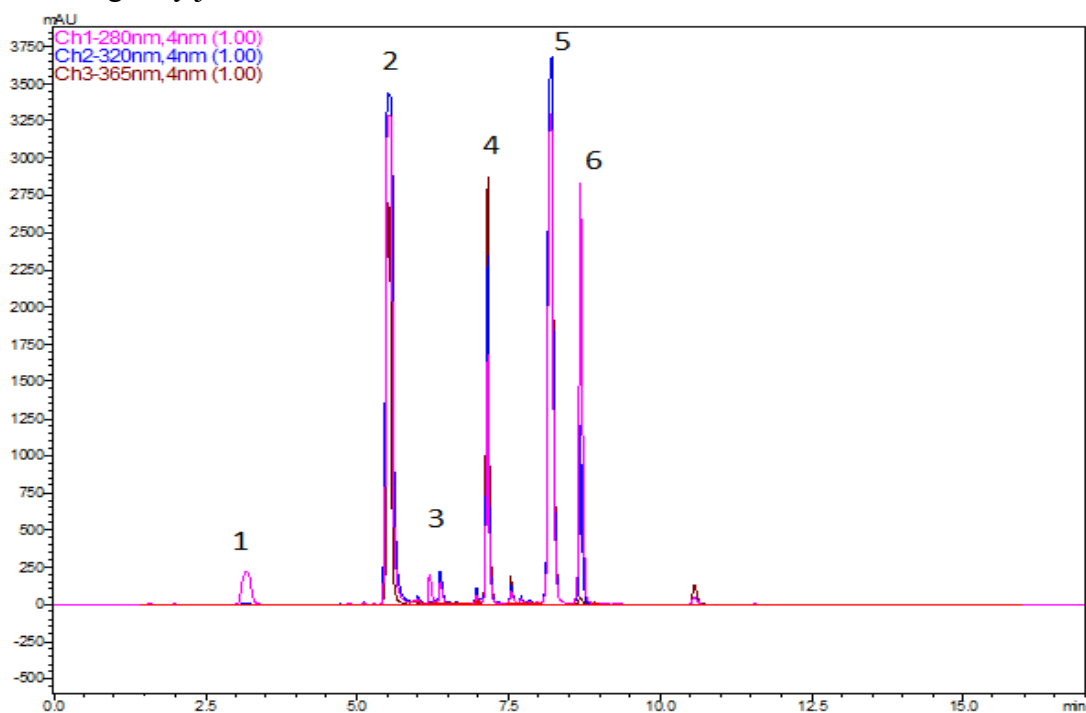


*Obr. 45 Separace za použití MF kyseliny octové*

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2 kyselina chlorogenová, 3 epikatechin, 4 rutin, 5 kvercitrin, 6 floridzin

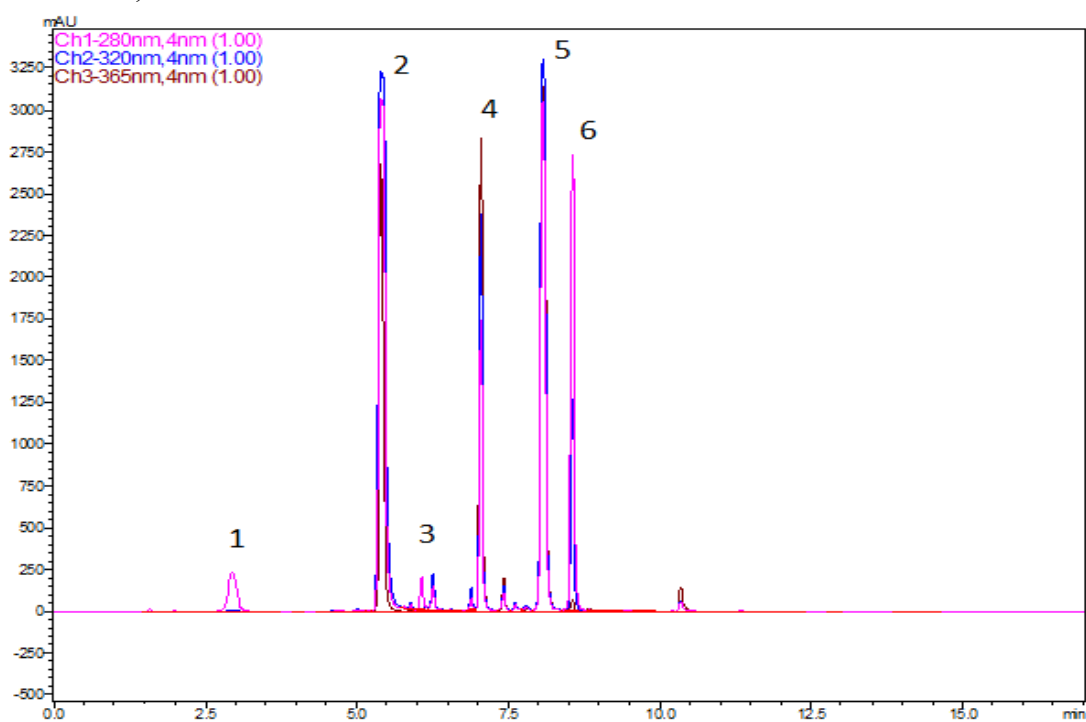
### 6.2.3.2 Teplota (25 °C, 30 °C)

Při změně teploty o 5 °C nedošlo k významným změnám v průběhu separace. Oba chromatogramy je možné vidět na obrázcích 41 a 42.



Obr. 46 Separace při teplotě 25 °C

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2 kyselina chlorogenová, 3 epikatechin, 4 rutin, 5 kvercitrin, 6 floridzin

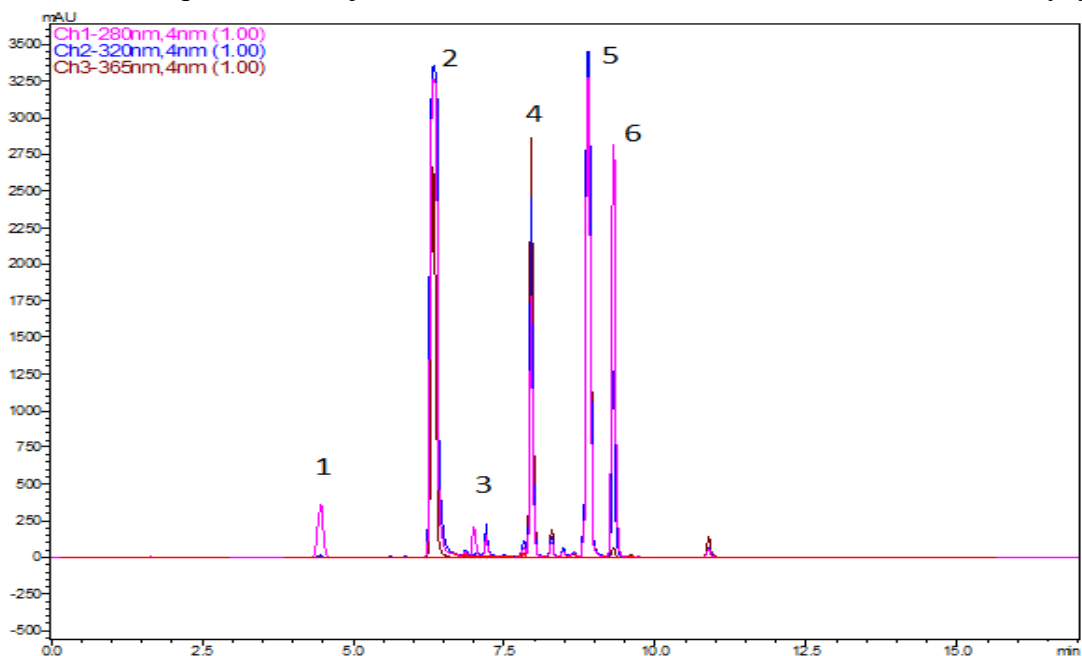


Obr. 47 Separace při teplotě 30 °C

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2 kyselina chlorogenová, 3 epikatechin, 4 rutin, 5 kvercitrin, 6 floridzin

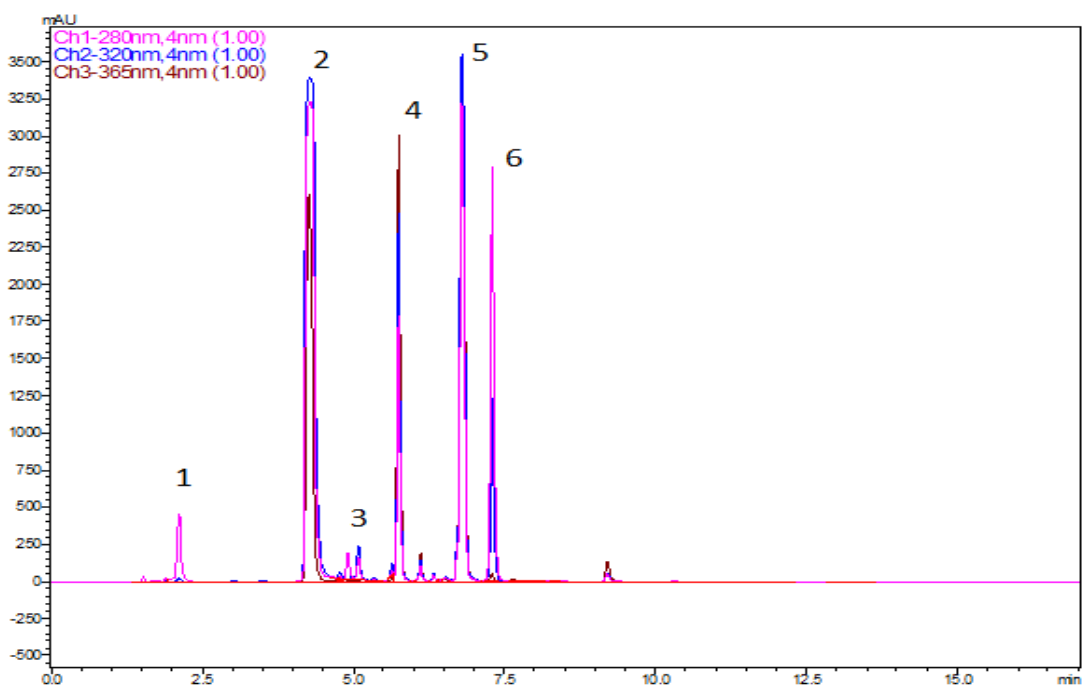
### 6.2.3.3 Změna gradientu (zvýšení a snížení o 5%)

Na obrázcích 43 a 44 je znázorněna separace při změně gradientu o  $\pm 5\%$ , je zřejmé že při této změně nedochází k podstatným změnám separace. Samozřejmostí je, že změnou tohoto parametru dojde ke změně retenčního času, a tudíž ke zkrácení analýzy.



Obr. 48 Separace za zvýšení gradientu o 5 %

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2 kyselina chlorogenová, 3 epikatechin, 4 rutin, 5 kvercitrin, 6 floridzin



Obr. 49 Separace při snížení gradientu o 5 %

**Pořadí píků:** 1 kyselina gallová, 2 kyselina chlorogenová, 3 epikatechin, 4 rutin, 5 kvercitrin, 6 floridzin

## 7 Souhrn

V této diplomové práci je shrnut vývoj a optimalizace metody pro stanovení fenolických látek pomocí HPLC systému. Fenolické sloučeniny jsou zdraví prospěšné a mají nepřehorné množství pozitivních účinků na lidské zdraví a také proto jsou středem zájmu při nejrůznějších studiích.

Pro testování HPLC metody byly vybrány jednotlivé standardy podle předešlých prací a zkušeností spolupracujícího pracoviště (VÚOS). Jednalo se o kyselinu gallovou, chlorogenovou, kávovou, katechin, epikatechin, rutin, kvercitrin, kvercetin, floretin a floridzin.

V rámci optimalizace byly vyzkoušeny různé gradienty a následně i testovány různé stacionární fáze (C18, fenyl-hexyl, bifenyl, amino, kyano a monolitická kolona). Byl vybrán gradient 10 a C18 kolona o délce 15 cm z důvodu nejlepšího rozlišení vybraných analytů. Dále byly testovány další podmínky separace (pH a složení mobilní fáze, průtoková rychlost, změna teploty kolonového prostoru). Nejvhodnější mobilní fází byla zvolena kombinace acetonitrilu a vody okyselené kyselinou octovou na pH 2,8; průtoková rychlost byla vybrána 1 ml/min a separace probíhala při teplotě 30 °C. Detekce probíhala při vlnových délkách 255, 280, 320 a 365 nm.

Testovány byly i reálné vzorky jablečné slupky a dužniny, a to na stacionární fázi C18 a amino koloně, proběhlo i testování extrakčního rozpouštědla, při kterém bylo zjištěno, že nejvhodnějším rozpouštědlem je 100% methanol.

Mezi validační parametry byl zahrnut test vhodnosti chromatografického systému (rozlišení chromatografických píků, faktor symetrie, kapacitní faktor a opakovatelnost) linearita a robustnost. Během validace byly použity standardy kyseliny gallové, chlorogenové, epikatechinu, rutinu a floridzinu. Výběr byl proveden na základě výskytu daných látek v reálných vzorcích. Hodnoty faktoru symetrie byly v rozmezí od 0,8- 1,5 u všech zmíněných standardů, u linearity bylo zapotřebí snížit původně testované rozmezí koncentrací u kyseliny chlorogenové a rutinu z důvodu nelineárních kalibračních závislostí, po úpravě koncentrací dosahoval korelační koeficient u všech látek hodnoty 0,99. Další parametry validace jsou zobrazeny v tabulce 21.



Tab. 21 Souhrn hodnot validačních parametrů

	<b>Kyselina gallová</b>	<b>Kyselina chlorogenová</b>	<b>Epikatechin</b>	<b>Rutin</b>	<b>Floridzin</b>
<b>Rozlišení chromatografických píků</b>	5,901	10,325	4,133	7,226	2,847
<b>Faktor symetrie</b>	0,989	1,284	1,343	1,288	1,281
<b>Kapacitní faktor</b>	5,91	1,644	1,977	2,448	3,191
<b>Opakovatelnost - plocha píku -RSD (%)</b>	1,00	0,64	0,45	0,71	0,99
<b>Opakovatelnost - retenční čas - RSD (%)</b>	0,53	0,50	0,05	0,15	0,17
<b>Linearita (mg/ml)</b>	0,125 – 5	0,25 – 10	0,125 – 5	0,25 – 10	0,125 – 5
<b>Korelační koeficient</b>	0,9997	0,9976	0,999	0,9976	0,9993

## 8 Závěr

Byla vyvinuta vhodná chromatografická metoda pro stanovení vybraných fenolických látek v ovoci.

Během optimalizace došlo k testování různých gradientů mobilní fáze a stacionárních fází s využitím vybraných standardů i reálných extraktů z jablečné slupky a dužniny. Podle dosažení chromatografické separace byl vybrán nejvhodnější gradient a sorbent typu C18 s částicemi s pevným jádrem. Byly vybrány větší částice (5  $\mu\text{m}$ ), které se jeví vhodnější pro plánované měření většího počtu reálných vzorků. V rámci validace byl testován test vhodnosti chromatografického systému (rozlišení chromatografických píků, faktor symetrie, kapacitní faktor a opakovatelnost), linearita a robustnost. U žádného z testovaných parametrů nebyly překročeny požadované limity.

## 9 Seznam obrázků, tabulek

### 9.1 Obrázky

Obr. 1 Grafické znázornění rozdělení fenolických látek .....	12
Obr. 2 Struktura flavonoidů [4] .....	14
Obr. 3 Obecná struktura flavonoidních látek [11] .....	14
Obr. 4 Struktury čtyř hlavních katechinů [4] .....	16
Obr. 5 Struktura kyseliny gallové [19] .....	18
Obr. 6 Struktura kyseliny chlorogenové [19] .....	18
Obr. 7 Struktura kyseliny kávové [19].....	19
Obr. 8 Struktura rutinu [19] .....	19
Obr. 9 Struktura katechinu [19] .....	20
Obr. 10 Struktura epikatechinu [19] .....	20
Obr. 11 Struktura kvercetinu [19].....	21
Obr. 12 Struktura kvercitrinu [19] .....	21
Obr. 13 Struktura floridzinu [19].....	22
Obr. 14 Struktura floretinu [19].....	22
Obr. 15 Schéma HPLC systému [24].....	24
Obr. 16 Schéma zastoupení fenolických látek v jablku [6] .....	25
Obr. 17 Chromatogram separace fenolických látek pro gradient 1 – kolona Supelco Ascentis (100 x 46 mm x 5 µm), průtoková rychlost 1 ml/min.....	33
Obr. 18 Chromatogram separace fenolických látek pro gradient 3 – kolona Supelco Ascentis (100 x 46 mm x 5 µm), průtoková rychlost 1 ml/min.....	34
Obr. 19 Chromatogram separace fenolických látek pro gradient 4 – kolona Supelco Ascentis (100 x 46 mm x 5 µm), průtoková rychlost 1 ml/min.....	35
Obr. 20 Chromatogram separace fenolických látek pro gradient 10 - kolona Supelco Ascentis (100 x 46 mm x 5 µm), průtoková rychlost 1 ml/min.....	36
Obr. 21 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Kinetex C18.....	39
Obr. 22 Chromatogram separace reálného vzorku slupky jablka Golden Delicious na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm), gradient 10, průtoková rychlost 1ml/min.....	40
Obr. 23 Chromatogram separace reálného vzorku dužniny jablka Golden Delicious na koloně Kinetex C18 (150 x 4,6 mm x 5 µm), gradient 10, průtoková rychlost 1ml/min.....	40

Obr. 24 Chromatogram separace fenolických látek, na koloně Kinetex XB-C18.....	41
Obr. 25 Chromatogram separace fenolických látek, na koloně Kinetex biphenyl .....	42
Obr. 26 Chromatogram separace fenolických látek, na koloně Ascentis Phenyl-hexyl	43
Obr. 27 Chromatogram separace fenolických látek, na koloně Supelco Ascentis .....	44
Obr. 28 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Supelco Ascentis .....	44
Obr. 29 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm) gradient 10, průtoková rychlost 2 ml/min.....	45
Obr. 30 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Onyx Monolithic C18 (100 x 4,6 mm) gradient 10, průtoková rychlost 4 ml/min.....	45
Obr. 31 Chromatogram separace fenolických látek na koloně Ascentis ES-CN.....	46
Obr. 32 Optimalizace pH 2,8 a 3,3 .....	47
Obr. 33 Optimalizace pH 3,7 a 3,9 .....	48
Obr. 34 Optimalizace průtokové rychlosti 0,8 a 0,9 ml/min .....	49
Obr. 35 Optimalizace průtokové rychlosti 1,0 a 1,1 ml/min .....	50
Obr. 36 Optimalizace extrakčního rozpouštědla - 100% ACN .....	51
Obr. 37 Optimalizace extrakčního rozpouštědla - voda .....	52
Obr. 38 Optimalizace extrakčního rozpouštědla – 100 % methanol .....	52
Obr. 39 Kalibrační závislost kyseliny gallové .....	55
Obr. 40 Kalibrační závislost kyseliny chlorogenové .....	56
Obr. 41 Kalibrační závislost epikatechinu .....	57
Obr. 42 Kalibrační závislost rutinu.....	58
Obr. 43 Kalibrační závislost floridzinu.....	59
Obr. 44 Separace za použití MF kyseliny mravenčí .....	60
Obr. 45 Separace za použití MF kyseliny octové .....	61
Obr. 46 Separace při teplotě 25 °C .....	62
Obr. 47 Separace při teplotě 30 °C .....	62
Obr. 48 Separace za zvýšení gradientu o 5 %.....	63
Obr. 49 Separace při snížení gradientu o 5 %.....	63

## 9.2 Tabulky

Tab. 1	Struktura derivátů fenolických kyselin [2] .....	13
Tab. 2	Substituce a přehled anthokyanů [2] .....	16
Tab. 3	Přehled podmínek separace fenolických látek v předešlých studiích.....	26
Tab. 4	Chromatografický systém.....	28
Tab. 5	Příprava roztoku pro test opakovatelnosti .....	30
Tab. 6	Příprava roztoků pro linearitu.....	31
Tab. 7	Podmínky gradientu č.1 .....	33
Tab. 8	Podmínky gradientu č.3 .....	34
Tab. 9	Podmínky gradientu č.4 .....	35
Tab. 10	Podmínky gradientu č.10.....	36
Tab. 11	Přehled gradientů a průběh separace .....	37
Tab. 12	Přehled použitých chromatografických kolon.....	38
Tab. 13	Parametry testu vhodnosti chromatografického systému .....	53
Tab. 14	Hodnocení opakovatelnosti - plocha píku .....	53
Tab. 15	Hodnocení opakovatelnosti - retenční čas .....	54
Tab. 16	Test linearity pro kyselinu gallovou .....	55
Tab. 17	Test linearity pro kyselinu chlorogenovou .....	56
Tab. 18	Test linearity pro epikatechin .....	57
Tab. 19	Test linearity pro rutin .....	58
Tab. 20	Test linearity pro floridzin.....	59
Tab. 21	Souhrn hodnot validačních parametrů .....	65

## 10 Použitá literatura

- [1] RÝDLOVÁ, I. *Identifikace vybraných polyfenolických látek v extraktech léčivých rostlin*. Praha, 2015. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.
- [2] KANIOVÁ, L. *Analýza šťáv vybraných odrůd černého rybízu*. Brno, 2015. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [3] TOMKOVÁ, M. *Obsah antioxidačních látek ve vybraných druzích ovocných a bylinných čajů*. Brno, 2008. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [4] RUDOLFOVÁ, P. *Vliv katechinů na toxicitu vybraných léčiv*. Hradec Králové, 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.
- [5] REIS GIADA, M. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. InTech, 2013. DOI: 10.5772/51687. ISBN 978-953-51-1123-8.
- [6] FRANCINI, A., SEBASTIANI, L. Phenolic Compounds in Apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after Processing. *Antioxidants*. 2013, **2**, 181-193. DOI: 10.3390/antiox2030181. ISSN 2076-3921.
- [7] MARCANÍKOVÁ, K., BEŇOVÁ, B. Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek. *Chemické listy*. 2010, **104**, 27-30.
- [8] BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006, **99**(1), 191-203. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.07.042. ISSN 03088146.
- [9] MĚŘÍNSKÁ, R. *Analýza flavonoidů v pivu metodou LC-MS*. Brno, 2010. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [10] KMEŤOVÁ, I. *Identifikace fenolických látek v rostlinných extraktech s využitím UHPLC-MS/MS*. Hradec Králové, 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.
- [11] FIEDOROVÁ, I. *Fenolické látkové složky v potravinách*. Lednice, 2008. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zahradnická fakulta v Lednici. Vedoucí práce Ing. Josef Balík, Ph.D.

- [12] KOVÁŘOVÁ, M. *Vliv výsypkových substrátů s obsahem těžkých kovů na fyziologický stav listu s důrazem na obsah fenolických látek*. Praha, 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Mgr. Zuzana Lhotáková, Ph.D.
- [13] PETRLÍKOVÁ, T. *Rostlinné hormony*. Praha, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Vasilis Teodoridis, Ph.D.
- [14] MRÁZOVÁ, E. *Stanovení fenolických látek a antioxidační aktivity u cereálií*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Daniela Sumczynski, Ph.D.
- [15] PROCHÁZKOVÁ, E. *Účinek flavonoidů na vybrané biotransformační enzymy*. Hradec Králové, 2015. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Doc. Ing. Barboda Szotáková, Ph.D.
- [16] FÄHNRICHOVÁ, B. *Stanovení floretinu na uhlíkové pastové elektrodě*. Praha, 2011. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.
- [17] CHLUPÁČOVÁ, M. *Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva*. Hradec Králové, 2006. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Doc. RNDr. Jiří Hartl, CSc.
- [18] POKORA, P. *Měření antioxidační aktivity a polyfenolických sloučenin ve vybraných hybridech meruněk*. Brno, 2011. Gymnázium Brno-Řečkovice. Vedoucí práce Ing. Jiří Sochor.
- [19] *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2016-12-16].  
Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html>
- [20] PÉREZ-ILZARBE, J, T HERNÁNDEZ a I ESTRELLA. Phenolic compounds in apples: varietal differences. *Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 1990, (192), 551-554.
- [21] BAI, L., GUO, S., LIU, Q. et al. Characterization of nine polyphenols in fruits of *Malus pumila* Mill by high-performance liquid chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2016, **24**(2), 293-298. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.10.002. ISSN 10219498.
- [22] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [23] *Hplc.cz* [online]. [cit. 2016-12-16]. Dostupné z: <http://hplc.cz/>
- [24] *HPLC* [online]. [cit. 2016-12-16].  
Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

[25] MARTÍ, R., VALCÁRCEL, M., HERRERO-MARTÍNEZ, J. M., CEBOLLA-CORNEJO, J., ROSELLÓ, S. Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column. *Food Chemistry*. 2015, **169**, 169-179. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.07.151. ISSN 03088146.

Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614011996>

[26] JINSHUI, Ch., QUN, X., LINA, L., ROHRER, J. Determination of Phenolic Compounds in Apple Orchard Soil. *Thermo Scientific Webpage, application Note 1077.*, 1-5

[27] ESCARPA, A., GONZÁLEZ, M.C. Fast separation of (poly)phenolic compounds from apples and pears by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*. 1999, **830**, 301-309.

[28] SCHIEBER, A., KELLER, P., CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001, **910**, 265-273.

[29] *Český lékopis 2009*. Praha: Grada Publishing, 2009. ISBN 978-80-247-2994-7.