

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

Diplomová práce

Využití HPLC v analýze nutraceutik s obsahem chlorogenových kyselin

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

Hradec Králové 2018

Michaela Majorová

Děkuji panu Doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D., za vstřícnost a odbornou konzultaci, dále Mgr. Jakobovi Fibigrovi rovněž za pomoc, ochotu a konzultaci při vypracování této práce. Tato práce vznikla za podpory GAUK, projekt č. 181216.

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.

V Hradci Králové, dne

ABSTRAKT

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Michaela Majorová

Školitel: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Název diplomové práce: Využití HPLC v analýze nutraceutik s obsahem chlorogenových kyselin

V této práci byla vyvinuta a validována analytická UHPLC metoda pro stanovení isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů a následně byla aplikována u doplňků stravy Kilostop (Astina Pharm, a.s.), Zelená káva Extra (Medicura natural), Maxivitalis Zelená káva (Simply You Pharmaceuticals), Vieste Zelená káva Premium (Volt Retail), Zelená káva bylinný extrakt (Topvet), Zelená káva (VITO LIFE) a Kyselina chlorogenová (VITO LIFE). K analýze byla použita kolona Ascentis Express® RP-Amide (100 x 2,1 mm; 2,7 μm) s využitím gradientové eluce o složení mobilní fáze acetonitril a 5%-ní vodný roztok kyseliny mravenčí s průtokovou rychlostí 0,9 ml/min a detekce provedena detektorem diodového pole při vlnové délce 325 nm a konstantní teplotě 30°C.

Klíčová slova: UHPLC, kyselina chlorogenová, extrakt zelené kávy, kolona RP-Amide, doplňky stravy

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Michaela Majorová

Supervisor: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Title of the diploma thesis: HPLC in nutraceuticals analysis of chlorogenic acids

A new UHPLC method was developed and validated for determination of chlorogenic acids and their di-substituted derivatives in nutraceuticals and the developed method was used for determination of chlorogenic acids in nutraceuticals Kilostop (Astina Pharm, a.s.), Zelená káva Extra (Medicura natural), Maxivitalis Zelená káva (Simply You Pharmaceuticals), Vieste Zelená káva Premium (VOLT Retail), Zelená káva bylinný extrakt (Topvet), Zelená káva (VITO LIFE) a Kyselina chlorogenová (VITO LIFE). The analysis was performed on the Ascentis Express® RP-Amide (100 x 2.1 mm; 2.7 µm) column using gradient elution program with mobile phase consisted of mixture of acetonitrile and 5% aqueous solution of formic acid at flow rate of 0.9 ml/min, the PDA detector wavelength was set at 325 nm and the column temperature was 30°C.

Keywords: UHPLC, chlorogenic acid, green coffee extract, RP-Amide column, nutraceuticals

Obsah

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
2	ÚVOD.....	9
3	CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE.....	10
4	TEORETICKÁ ČÁST	11
4.1	Kyselina chlorogenová a její deriváty	11
4.1.1	Definice a výskyt.....	11
4.1.2	Vlastnosti	12
4.1.3	Mechanismy účinku	12
4.1.3.1	Antioxidační vlastnosti	12
4.1.3.2	Snižování krevního tlaku	13
4.2	Instrumentace UHPLC	13
4.2.1	Core-shell chromatografické kolony	15
4.2.2	Ascentis® Expres RP-Amide.....	16
4.3	Možnosti stanovení isochlorogenových kyselin	18
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
5.1	Použité přístroje a pomůcky	20
5.2	Použité chemikálie	21
5.3	Použité (měřené) vzorky a jejich charakteristika	22
5.3.1	Analyzované doplňky stravy.....	22
5.3.2	Charakteristiky vzorků.....	23
5.4	Příprava vzorků	23
5.5	Příprava roztoků standardů	24
5.6	Parametry měření.....	24
5.6.1	Přístrojové vybavení a chromatografické podmínky	24
5.6.2	Validace metody	25
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	26
6.1	Vývoj metody, optimalizované parametry	26
6.2	Validace vyvinuté metody za finálních podmínek	41
6.2.1	Test vhodnosti chromatografického systému	45

6.2.2	Kalibrace.....	45
6.2.3	Přesnost, správnost a selektivita.....	46
6.2.4	Limit detekce a limit kvantifikace	47
6.2.5	Stabilita	47
6.2.6	Robustnost	47
6.2.7	Stanovení isochlorogenových kyselin a disubstituovaných derivátů v doplňcích stravy	48
7	ZÁVĚR.....	57
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	58
9	SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	63
9.1	Obrázky.....	63
9.2	Tabulky	65

1 Seznam použitých zkratk

1,3-di-CQA	–	1,3-disubstituovaná kyselina chlorogenová
3,5-di-CQA	–	3,5-disubstituovaná kyselina chlorogenová
3-CQA	–	kyselina chlorogenová
4-CQA	–	kyselina kryptochlorogenová
5-CQA	–	kyselina neochlorogenová
EPG	–	Embedded Polar Group (vložená polární skupina)
ESI	–	electrospray ionisation
HPLC	–	High-performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
ICH	–	International Council for Harmonisation
LOD	–	limit of detection (limit detekce)
LOQ	–	limit of quantification (limit kvantifikace)
MS	–	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
PDA	–	photodiode-array (detektor diodového pole)
UHPLC	–	Ultra-high performance liquid chromatography (ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie)

2 Úvod

Izomery chlorogenové kyseliny jsou fenolické sloučeniny, deriváty kyseliny skořicové, které mají antioxidační a protizánětlivé účinky. Isochlorogenové kyseliny a jejich disubstituované deriváty jsou hlavní deriváty chlorogenové kyseliny, která se vyskytuje v rostlinných extraktech [1].

Dnes se extrakt ze zelené kávy používá k výrobě doplňků stravy na hubnutí, většinou ve formě kapslí, jelikož jsou hlavním zdrojem chlorogenové kyseliny [2,3]. Kromě toho, deriváty chlorogenové kyseliny také snižují riziko kardiovaskulárních onemocnění a riziko vzniku diabetu mellitu typu II [4,5], mají antibakteriální [6], protizánětlivé účinky [7] a jsou schopny zpomalovat vylučování glukózy do krevního oběhu po požití jídla [8-9].

Kapalinová chromatografie spojená s PDA a MS detekcí je nejčastěji používaná metoda pro stanovení isochlorogenových kyselin [10-18]. PDA detektor je hojně využíván pro stanovení derivátů chlorogenové kyseliny v rozličných maticích, nejčastěji při absorpčním maximu všech sloučenin kolem 325 nm [10-14, 18, 19]. Kolony s konvenční C18 stacionární fází byly vybrány pro separaci isochlorogenových kyselin [10-13, 17-18] a disubstituovaných kyselin [14, 19, 20] v rozličných maticích. V současnosti je také trendem využívání kolon založených na technologii částic core-shell, mezi které patří i kolony Ascentis® Express [21, 22].

V této studii byla vyvinuta nová UHPLC metoda pro separaci a stanovení tří isochlorogenových kyselin a dvou disubstituovaných isochlorogenových kyselin. Touto metodou bylo následně analyzováno množství isochlorogenových kyselin v doplňcích stravy na hubnutí a výsledné hodnoty byly porovnány s obsahem, který deklaroval výrobce na obalu daného doplňku.

3 Cíl a popis zadání práce

Cílem této studie bylo vyvinout a validovat novou chromatografickou metodu pro rychlé a přesné stanovení isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů, které byly nalezeny ve vzorcích sedmi doplňků stravy, obsahujících extrakt zelené kávy.

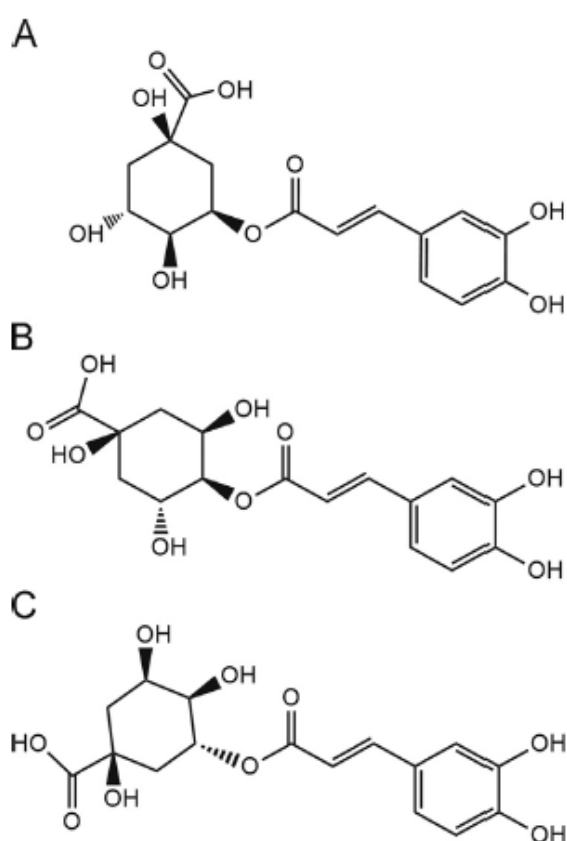
4 Teoretická část

4.1 Kyselina chlorogenová a její deriváty

4.1.1 Definice a výskyt

Kyselina chlorogenová je ester kyseliny kávové a kyseliny chinové [23]. Od této kyseliny jsou odvozeny její další deriváty, jako například kyselina neochlorogenová, kryptochlorogenová, a také disubstituované deriváty, které byly rovněž studovány v rámci této práce.

Hlavním zdrojem isochlorogenových kyselin je extrakt ze zelené kávy, avšak mohou být nalezeny i v ovoci, zelenině a v semenech rostlin [24], přičemž nejvíce zastoupenou kyselinou v kávě je dle studií kyselina chlorogenová [24,25].



Obrázek 1: Molekulární struktura tří sloučenin isochlorogenových kyselin: A – kyselina neochlorogenová, B - kyselina kryptochlorogenová, C – kyselina chlorogenová [12]

V dnešní době jsou kyselina chlorogenová a její deriváty snadno dostupné v doplňcích stravy na hubnutí. Avšak v již existujících studiích se síla rostlinných extraktů liší v rozličných preparátech [26,27]. Bylo publikováno několik analytických metod pro stanovení isochlorogenových kyselin v rostlinných materiálech [10-13], pražené kávě [14-15], vařené kávě, lidské plasmě, extraktech moči [1, 16] a doplňcích stravy [17, 18].

4.1.2 Vlastnosti

Kyselina chlorogenová a její deriváty se řadí mezi polyfenoly, což jsou chemické sloučeniny s významnou antioxidační aktivitou [24,25], čímž zmírňují škody způsobené reaktivní formou kyslíku, ovšem přesný mechanismus účinku není zcela objasněn [24]. Dle epidemiologických studií má příjem isochlorogenových kyselin z potravy, přesněji pitím kávy v malém množství, mnoho příznivých účinků na lidské zdraví – protizánětlivý, antibakteriální a protinádorový [25]. Klinické studie, provedeny v posledních desetiletích prokazují, že polyfenoly snižují systolický a diastolický tlak. Kromě těchto vlastností je prokázáno, že užívání isochlorogenových kyselin může zlepšit metabolismus glukózy a citlivost k insulinu a tím snížit riziko vzniku diabetu II. typu [24]. Příjem isochlorogenových kyselin podporuje snižování hmotnosti u obézních pacientů a je spojován i se snížením rizika mrtvice u žen [24]. O možných negativních účincích isochlorogenových kyselin u lidí nebylo provedeno mnoho studií [24].

4.1.3 Mechanizmy účinku

4.1.3.1 Antioxidační vlastnosti

Biologická aktivita různých polyfenolových sloučenin je spojována s jejich elektrochemickými vlastnostmi. Sloučeniny s nižším oxidačním potenciálem obecně prokázaly vyšší antioxidační aktivitu. Elektrochemické vlastnosti isochlorogenových kyselin a disubstituovaných derivátů jsou silně závislé na jejich chemické struktuře, zejména na počtu katecholových částí přítomných v molekulární struktuře [25].

4.1.3.2 Snižování krevního tlaku

Isochlorogenové kyseliny snižují systolický a diastolický tlak zvyšováním biodostupnosti oxidu dusnatého a zlepšením funkce endotelu. Tato vlastnosti by mohly být základem pro adjuvantní terapii hypertenze [24]. Značné množství metabolitů isochlorogenových kyselin je absorbováno v tlustém střevě působením střevní mikroflóry, kde je kyselina kávová konvertována enzymem transferázou na kyselinu ferulovou, která má dle studií největší hypotenzivní účinek, nebo je redukována na kyselinu dihydrokávovou [24]. Mimo to, dle in vitro a in vivo studií interagují isochlorogenové kyseliny pravděpodobně s renin-angiotensin-aldosteronovým systémem, inhibováním aktivity angiotensin-konvertujícího enzymu [24], což je jedním z hlavních mechanismů působení léčiv užívaných při hypertenzi.

4.2 Instrumentace UHPLC

Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu je nejčastěji používána metoda HPLC [25, 26], ovšem také UHPLC [29], proto byla na základě předešlých studií zvolena metoda kapalinové chromatografie. Jedná se o separační metodu, která využívá tok kapalné mobilní fáze přes stacionární fázi pro separaci analytů na principu eluce [26].

Systémy UHPLC a HPLC jsou si velice podobné, ovšem jsou zde patrné rozdíly. Pro zvýšení účinnosti, lepší rozlišení píků a zkrácení doby analýzy se používají částice stacionární fáze o rozměrech menších než 2 μm [29,30]. Ovšem kvůli malým částicím může být generován protitlak a je tak potřebná větší síla k tomu, aby kolonou prošla mobilní fáze se vzorkem [29], proto systém UHPLC pracuje za ultra-vysokých tlaků [30]. Některé systémy řeší protitlak zvýšením teploty kolonového termostatu, čímž se sníží viskozita mobilní fáze a pohybuje se tak rychleji kolonou [31]. Díky core-shell částicím lze ale také za menších průtoků dosáhnout vyšší účinnosti již při použití nižších tlaků, proto je možné je také využívat v HPLC systémech [29]. Dále jsou při UHPLC analýze kladeny vyšší nároky na přesnost dávkování malých objemů, vysokou frekvenci sběru dat a minimální mimokolonové objemy [30]. Systém UHPLC je po finanční stránce náročnější [31], ale vyšší počáteční cena vybavení systému šetří finanční potřeby po dobu několika dalších let úsporou rozpouštědel a mobilních fází [29]. Výhody a omezení UHPLC systému jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1: Výhody a nevýhody UHPLC systému [32].

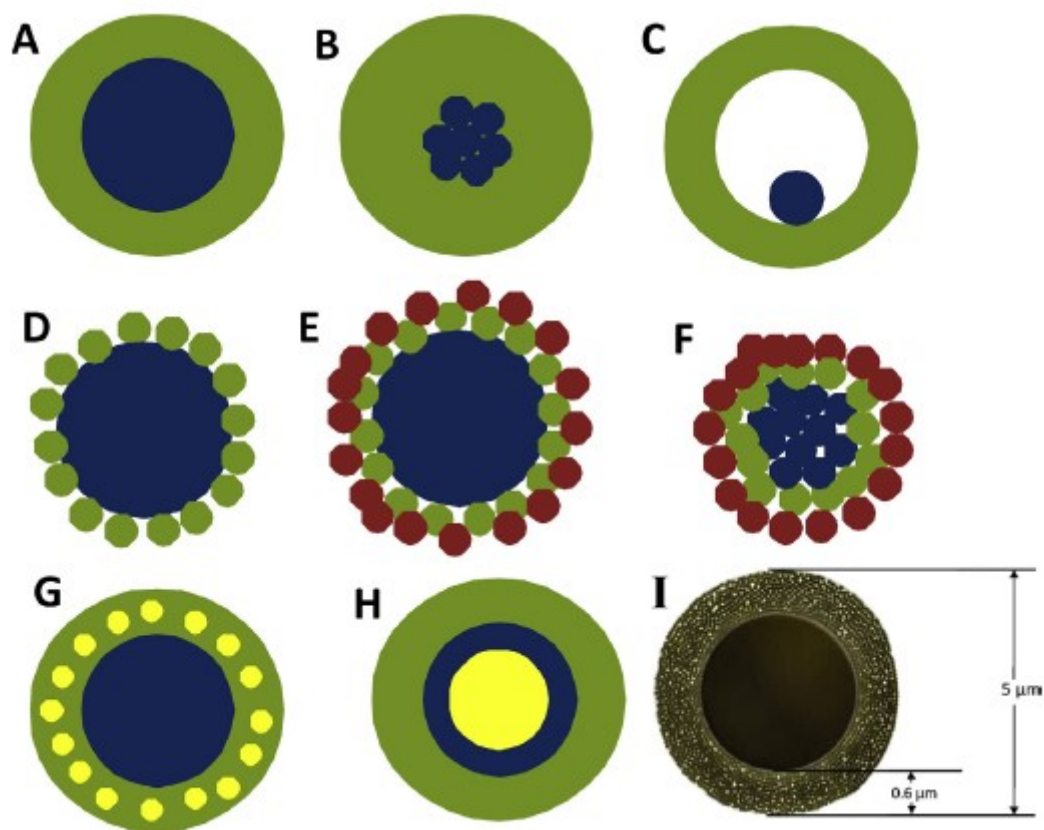
Výhody	Nevýhody
Rychlá separace	Cena vybavení
Vyšší citlivost detektorů	Kompatibilita s HPLC (dle typu použité pumpy –binární pumpa a vysokotlaký gradient nejsou kompatibilní)
Přesnější dávkování vzorků	
Separace s vysokým rozlišením	
Menší množství použitých solventů	



Obrázek 2: UltiMate™ 3000 RSLCnano Systém [33].

4.2.1 Core-shell chromatografické kolony

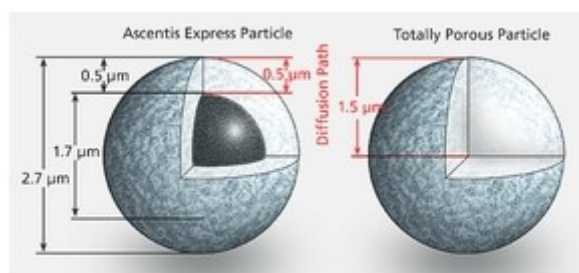
V kapalinové chromatografii se v dnešní době nejčastěji používají kolony s reverzní stacionární fází, která obsahuje částice core-shell (jinými názvy také fused-core nebo povrchově porézní mikročástice). Tyto částice pozůstávají z pevného jádra a porózního pláště, které mohou pocházet z různého nebo stejného materiálu [21]. Vlastnosti částic jako je jejich velikost nebo tloušťka pláště značně ovlivňují parametry separace [21]. Čím je tloušťka pláště menší, tím rychleji se přenáší separované molekuly, což zvyšuje účinnost a rychlost elučního času [21]. Rozličná porozita pláště je využívána k separaci různých analytů s odlišnou velikostí molekul [21], které se zachycují v pórech. Vyskytují se zde další aspekty velikosti částic a to, že použitím větších částic se snižuje pracovní protitlak, zatím co porózní plášť a malé pevné jádro je schopné poskytnout větší plochu povrchu pro separaci [21]. Výroba takové core-shell částice probíhá tak, že je nejdříve nasyntetizováno pevné jádro, na kterém je pak utvořen plášť [21]. Typy částic jsou znázorněny na obrázku 3.



Obrázek 3: Typy core-shell částic. A – jádro jako jednotná částice, B- jádro jako shluk několika menších částic, C – plášť typu „dutá skořápka s malou kouolí uvnitř“, A-C – plášť jako souvislá vrstva, D, E – plášť jako menší částice připevněny na velkou částici jádra nebo s agregovanými částicemi jádra na schématu F, G- inkorporace menších částic do pláště, H – více vrstev pláště, I – znázornění core-shell částice ze silikagelu s pevným jádrem a porózním pláštěm [21].

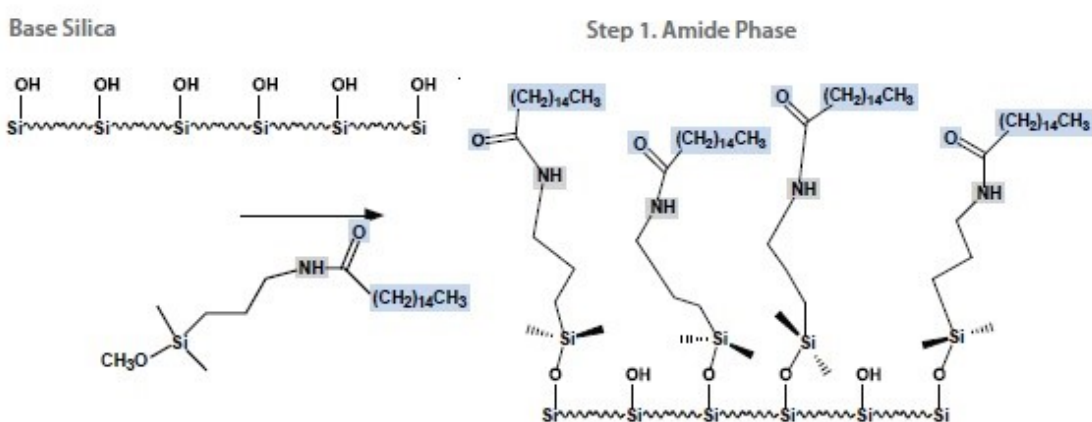
4.2.2 Ascentis® Expres RP-Amide

Pro validaci chromatografické metody vyvinuté v této diplomové práci byla využita tato kolona, jako spojení polární stacionární fáze (EPG) s částicemi core-shell [22]. Popis technologie core-shell je uveden výše a porovnání core-shell částice u kolony RP-Amide s celkově porézní částicí je znázorněn na obrázku č. 4.



Obrázek 4: Porovnání povrchově porózní částice kolony Ascentis® Expres RP-Amide a celkově porózní částice [22].

Výhodou této kolony s reverzní fází je 100%-ní kompatibilita s vodními roztoky, lepší tvar píků u bazických sloučenin díky redukovanému počtu interakcí silanolu s bazickými analyty a možnost poskytnutí alternativní reverzní selektivity ve srovnání se stacionární fází C18 [22], která je nejčastěji používanou fází v kapalinové chromatografii. Tato kolona poskytuje zvýšenou selektivitu pro polární sloučeniny. Jelikož jsou isochlorogenné kyseliny polární fenolické sloučeniny, prokazují zvýšenou retenci v porovnání s nepolárními analyty [22]. Výroba kolony RP-Amide spočívá v navázání amidové části na silanol v pouhém jednom kroku [22], který je znázorněn na obrázku 5.



Obrázek 5: Výroba stacionární fáze s amidovou částí [22].

4.3 Možnosti stanovení isochlorogenových kyselin

Pro stanovení isochlorogenových kyselin, například v rostlinách [10,12,19], doplňcích stravy [18] nebo krevní plazmě [17], existuje mnoho metod. Ve většině případů je k analýze využívána instrumentace vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím kolon se stacionární fází typu C18. K detekci je velmi často používán PDA detektor. Tabulka 2 dále sumarizuje podmínky separací, které byly nalezeny v literatuře za účelem stanovení obsahových látek.

Tabulka 2: Přehled dřívějších studií a podmínek separace chlorogenových kyselin.

Vzorek	Stanovovaná látka	Mobilní fáze	Detektor	Typ kolony	Zdroj
Zimolez japonský (květ)	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA	ACN + H ₂ O + 0,1% H ₃ PO ₄	PDA	Hedera C18 (250mm x 4.6mm, 5μm)	[0]
Povijnice batátová (listy 20 kultivarů)	Kyselina kávová, ferulová a sinapová, směs isochlorogenových kyselin	0,5% HCOOH + CH ₃ OH	PDA, ESI-MS	YMC-Pack ODS-A C18 (4.6mm x 150mm, 5μm)	[19]
Vieste Zelená káva, Café Slank	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA	H ₂ O + ACN/H ₂ O (97/3) + 0.2% CH ₃ COOH	PDA	Kinetex C18 core-shell (250 x 4.6mm, 5μm)	[18]
Odpadové látky tabáku (Nicotiana tobaccum)	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, kyselina kávová	H ₂ O/ACN/CH ₃ COOH (97.5/2/0.5) + ACN/CH ₃ COOH (99.5/0.5)	PDA-MS, UV	Alltima C18 (250 x 4.6mm, 5 μm)	[12]
Potkaní plazma po p.o. aplikaci Jinqi Jiangtang Tablet (Coptis chinensis, Astragalus membranaceus, Lonicera japonica)	3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, kyselina ferulová, berberin, epiberberin, koptisin, magnoflorin, berberubin, palmatin, jatrorrhizin	0.1% vodný roztok HCOOH + ACN	ESI-MS/MS	Agilent Eclipse plus C18 (4.6mm x 100mm, 1.8μm)	[17]

5 Experimentální část

5.1 Použité přístroje a pomůcky

K analýzám byl používán chromatografický systém Thermo Scientific Dionex™ UltiMate 3000 RSLC. Komponenty, které systém obsahuje, jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Chromatografický systém Dionex

Pumpa:	Ultimate3000 HPG-3400RS
Sampler:	Ultimate3000 WPS-3000
Termostat kolony:	Ultimate3000 TCC-3200
Detektor:	Ultimate3000 DAD-3000RS

Testované kolony jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Testované kolony

1. Kinetex® F5
150 x 2,1 mm; 1,7 µm
Phenomenex
2. Kinetex® C18
100 x 2,1 mm; 2,6 µm
Phenomenex
3. Kinetex® PHENYL-HEXYL
100 x 2,1 mm; 1,7 µm
Phenomenex
4. Luna Omega® Polar C18
150 x 2,1 mm; 1,6 µm
Phenomenex
5. Luna Omega® PS C18
150 x 2,1 mm; 1,6 µm
Phenomenex
6. Ascentis®Expres ES-CN

100 x 2,1 mm; 3 μ m

Supelco[®] Analytical (Sigma – Aldrich)

7. Ascentis[®] Expres RP-Amide

100 x 2,1 mm; 2,7 μ m

Supelco[®] Analytical (Sigma – Aldrich)

Pomůcky:

Analytické váhy (Sartorius 2004 MP, SRN)

Ultrazvuková lázeň (Bandelin SONOREX RK52, SRN)

Pipety (BRAND)

PTFE filtry o velikosti pórů 0,22 μ m

Plastové injekční stříkačky

Běžné laboratorní sklo a pomůcky

5.2 Použité chemikálie

Standardy:

Kyselina chlorogenová $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich)

Kyselina kryptochlorogenová $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)

Kyselina neochlorogenová $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich)

1,3-di-caffeoylquinic acid $\geq 98\%$ (Extrasynthese)

3,5-di-caffeoylquinic acid $\geq 98\%$ (Extrasynthese)

Chemikálie:

Acetonitril gradient grade (Sigma - Aldrich)

Methanol gradient grade (Sigma - Aldrich)

Kyselina mravenčí (Sigma – Aldrich)

Ultračistá voda (čištění systémem Milli-Q; Millipore, Berford)

5.3 Použité (měřené) vzorky a jejich charakteristika

5.3.1 Analyzované doplňky stravy

V rámci této práce bylo analyzováno sedm doplňků stravy, které jsou i s informacemi o obsahu extraktu uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Údaje o použitých doplňcích stravy.

Název přípravku	Výrobce	Obsah extraktu v jedné kapsli (mg)
Kilostop	Astina Pharm a.s.	6.5
Zelená káva Extra	Medicura natural	200
Maxivitalis Zelená káva max	Simply You Pharmaceuticals	500
Vieste Zelená káva Premium	Volt Retail	25
Topvet Zelená káva bylinný extrakt	Topvet	200
VITO LIFE Zelená káva	VITO LIFE	360
VITO LIFE Kyselina chlorogenová	VITO LIFE	400



Obrázek 6: Preparáty použité pro účely analýzy [34-40].

5.3.2 Charakteristiky vzorků

Pro stanovení isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů při validovaných chromatografických podmínkách bylo použito sedm různých vzorků doplňků stravy obsahujících extrakt zelené kávy (kapsle obsahující deklarované množství extraktu v rozmezí od 6.5 do 500 mg). Dle informací obsažených na štítcích obalů doplňků stravy obsahovaly čistý extrakt bez dalších komponent pouze dva preparáty. Zbytek přípravků byl multikomponentní a obsahoval také další biologicky aktivní složky nebo pomocné látky (nejčastěji plniva a lubrikanty).

5.4 Příprava vzorků

Homogenizovaný obsah dvaceti kapslí preparátu, který obsahoval extrakt zelené kávy, o hmotnosti 200 – 600 mg (dle přípravku), byl navážen do odměrných baněk o objemu 50 ml. Směs byla extrahována do 50 ml směsi methanolu a 5%-ního vodného roztoku kyseliny mravenčí (25:75 v/v) po dobu 10 minut pomocí ultrazvukové lázně. Následně byl roztok filtrován přes PTFE filtr s póry o velikosti 0,22 μm do skleněných vialek.

5.5 Příprava roztoků standardů

Standardní zásobní roztok o koncentraci 1000 µg/ml byl připraven pro referenční standard chlorogenové kyseliny a standardní zásobní roztok o koncentraci 450 µg/ml byl individuálně připraven pro každý referenční standard dalších dvou kyselin – kryptochlorogenové a neochlorogenové a pro standardy 1,3-disubstituované a 3,5-disubstituované chlorogenové kyseliny v roztoku methanolu a 5%-ního vodného roztoku kyseliny mravenčí (25+75 v/v). Všechny zásobní roztoky byly skladovány v mrazáku při teplotě -10°C až do doby použití. Směsný roztok standardů byl připraven smísením alikvotních podílů jednotlivých zásobních roztoků standardů a byl použit pro test vhodnosti systému.

5.6 Parametry měření

5.6.1 Přístrojové vybavení a chromatografické podmínky

K analýze byl použit UHPLC chromatografický systém od Thermo Scientific, systém Dionex UltiMate™ 3000 RSLC, vybaven binární pumpou, autosamplerem, kolonovým termostatem a detektorem diodového pole. Sběr dat, kontrola systému a vyhodnocování dat bylo provedeno pomocí chromatografického softwaru Dionex - Chromeleon™ 7.2. Jako optimální chromatografické podmínky, dle kterých byla provedena validace, zahrnovali acetonitril jako mobilní fázi B, jako mobilní fáze A byl použit 5%-ní vodný roztok kyseliny mravenčí, přefiltrovaný přes filtr o velikosti pórů 0,22 µm. Průtok těchto dvou mobilních fází činil 0,9 ml/min o složení, které odpovídá údajům v následujícím elučním programu, který je zobrazen v tabulce 6.

Tabulka 6: Složení mobilní fáze v průběhu analýzy (gradientová eluce).

Časový průběh analýzy (min)	Zastoupení mobilní fáze B (%)
0.0 – 2.5	7 – 10
2.5 – 6.0	10 – 33
6.0 – 6.5	33 – 60
6.5 – 7.0	60 – 7
7.0 – 8.0	7

Separace byla provedena na fused-core koloně Ascentis Expres RP-Amide (100 x 2,1 mm) o velikosti částic 2,7 μm při teplotě 30°C. Dále byl také k ochraně kolony před mikročásticemi použit filtr KrudKatcher Ultra. Píky separovaných isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů byly detekovány při vlnové délce 325 nm. PDA detektor sbíral data o vzorkovací frekvenci 100 bodů za sekundu. Teplota chladicího systému autosampleru byla nastavena na 20°C, z důvodu zachování stability vzorků. Objem nástřiku vzorku na kolonu činil 2 μl . Roztok methanolu a vody (50:50 v/v) byl zvolen jako oplach jehly.

5.6.2 Validace metody

Ke zhodnocení vhodnosti metody pro stanovení pěti isochlorogenových kyselin ve vzorcích doplňků stravy byla nově vyvinutá metoda validovaná ve shodě s ICH validačními směrnici [41]. Pro určení přesnosti metody byly analyzovány stejným způsobem vzorky analytu a vzorky s přidavkem roztoku standardů. Správnost a přesnost metody byly zjišťovány přidáním standardů o známých koncentracích do vzorků ve dvou různých koncentračních hladinách. Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byly definovány jako nejnižší koncentrace analyzovaných složek, které jsou schopny poskytnout reprodukovatelnou plochu píku s trojnásobkem, resp. desetinásobkem úrovně šumu získaných měření blanku a ze signálů analytů.

6 Výsledky a diskuze

6.1 Vývoj metody, optimalizované parametry

Mezi nepoužívanější chromatografické podmínky pro stanovení isochlorogenových kyselin patří konvenční HPLC systémy se stacionární fází C18, kolony o délce 250 mm, gradientová eluce a dlouhé doby analýz [10,12,17,18]. V této studii byl pro vývoj metody a její optimalizaci zvolen systém UHPLC, pomocí kterého lze dosáhnout lepší separace píků v krátkém čase analýzy. K dosažení nejlepších chromatografických podmínek byla optimalizovaná stacionární fáze, složení mobilní fáze, teplota kolonového termostatu a průtok mobilní fáze. Nejdříve bylo testováno několik kolon s chemicky odlišnými stacionárními fázemi:

C18 core-shell (Kinetex) a s plně porózními částicemi (Luna Omega Polar a PS),

Pentafluorofenyl (core-shell Kinetex),

Phenyl-hexyl (core-shell Kinetex),

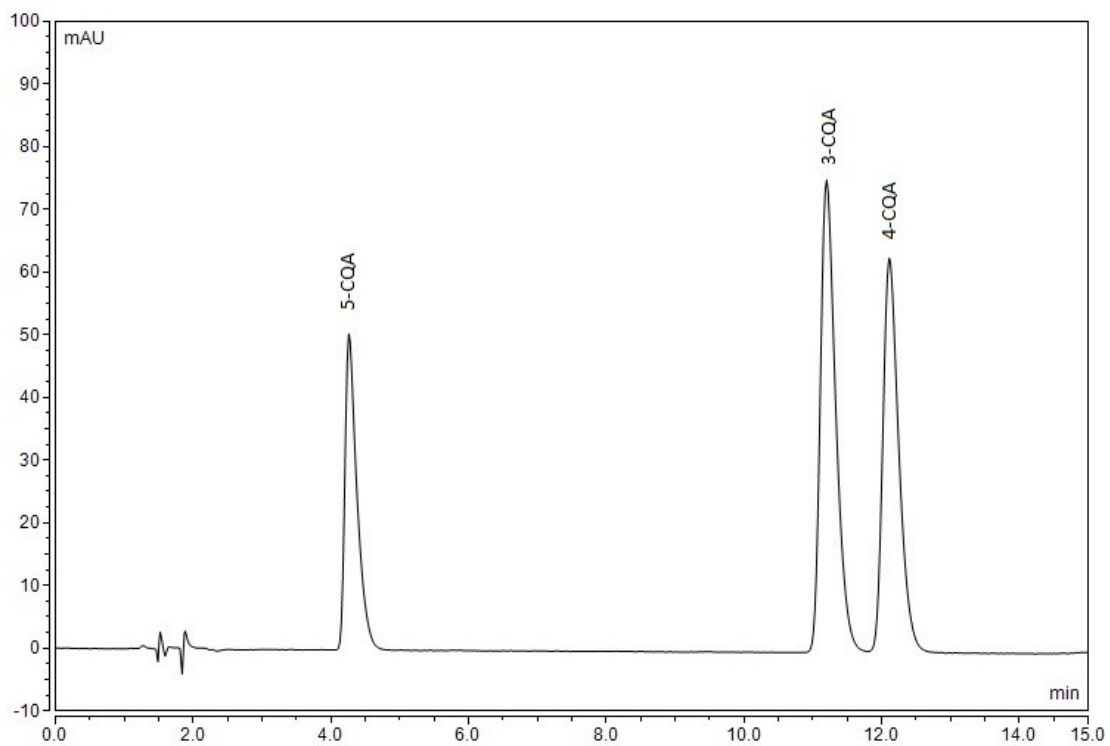
Nitril (ES-CN; core-shell Ascentis Express)

RP-Amide (core-shell Ascentis Express)

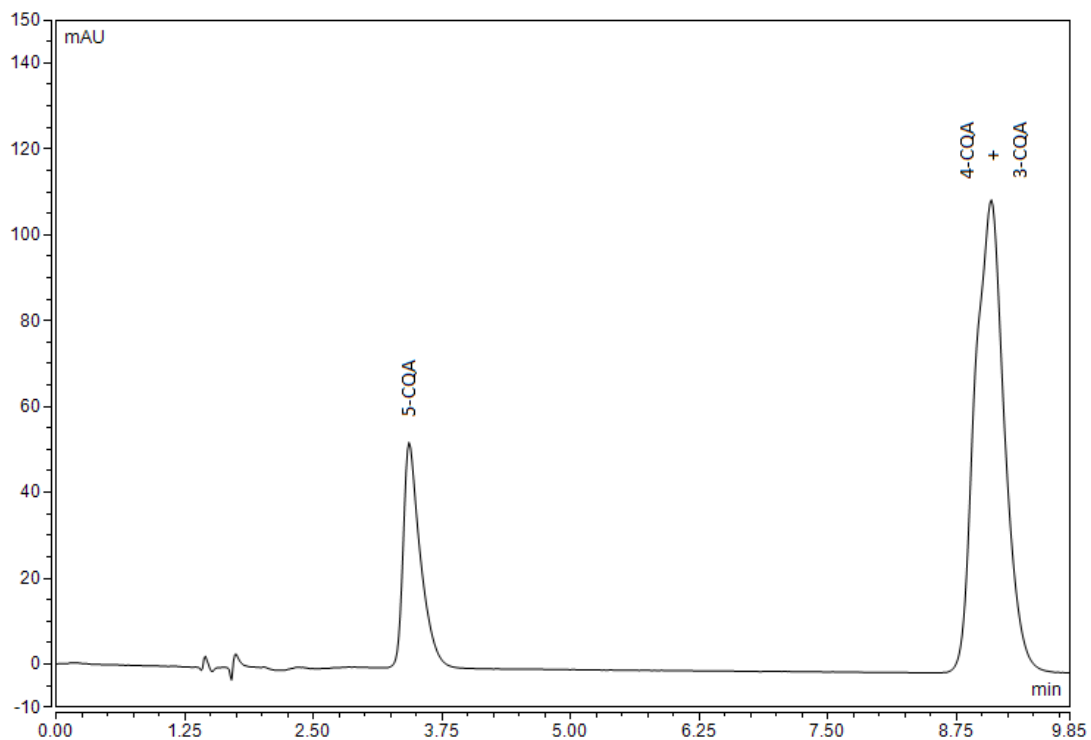
Mobilní fáze sestávající z vodného roztoku kyseliny mravenčí byla vybrána k potlačení ionizace karboxylové skupiny a fenolických hydroxylových skupin, které jsou součástí molekul isochlorogenových kyselin. Acetonitril byl zvolen jako organická část mobilní fáze, protože byla vhodnější pro rychlejší eluci. Rozlišení chlorogenové kyseliny a kryptochlorogenové kyseliny bylo zvoleno jako kritické pro akceptovatelnou selektivitu stacionárních fází. Průběh vývoje analytické metody lze vypořádat z následující tabulky č. 7 a chromatogramů.

Tabulka 7: Podmínky vývoje chromatografické metody pro analýzu isochlorogenových kyselin.

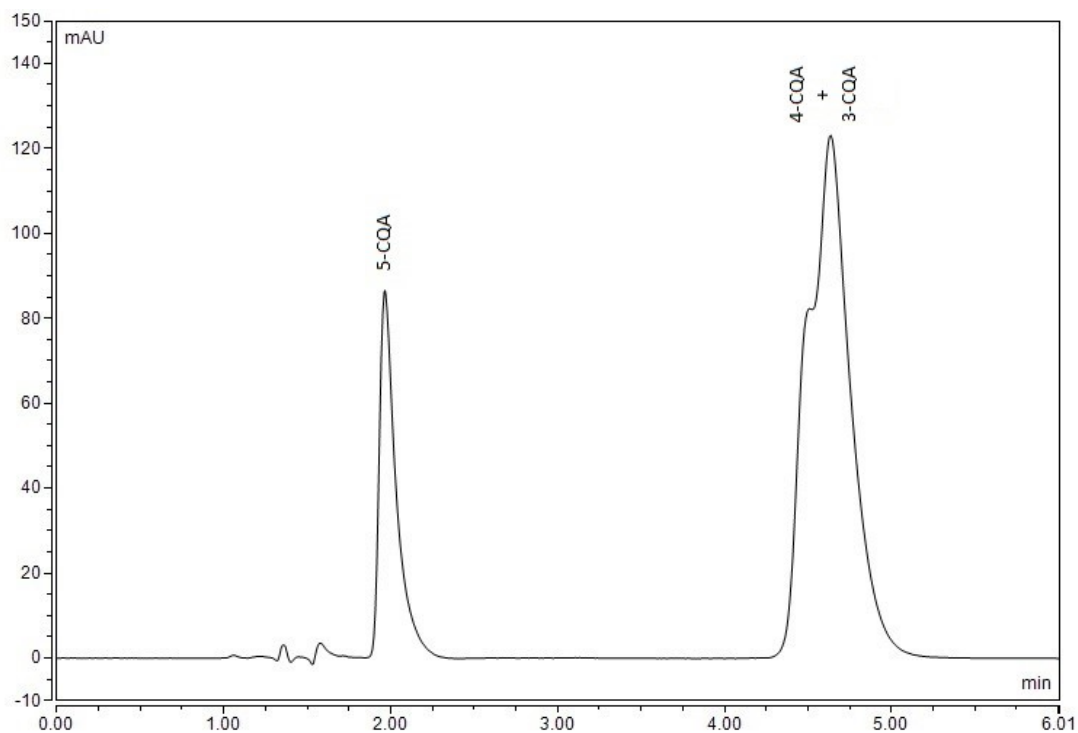
Podmínky vývoje	Doba analýzy (min.)	Podíl MF A (5% HCOOH)	Podíl MF B (acetonitril)	Průtok (ml/min)	Teplota autosampleru	Teplota kolony	UV-VIS (nm)	Kolony
č.1	15,000	95%	5%	0,300	20°C	30°C	325	L.O. Polar C18, L. O. PS C18, Kinetex F5, ES Cyano, RP-Amide
č.2	12,000	gradient	gradient	0,300	20°C	30°C	325	L.O. Polar C18
č.3	8,000	gradient	gradient	0,900	20°C	30°C	325	Kinetex C18 RP-Amide



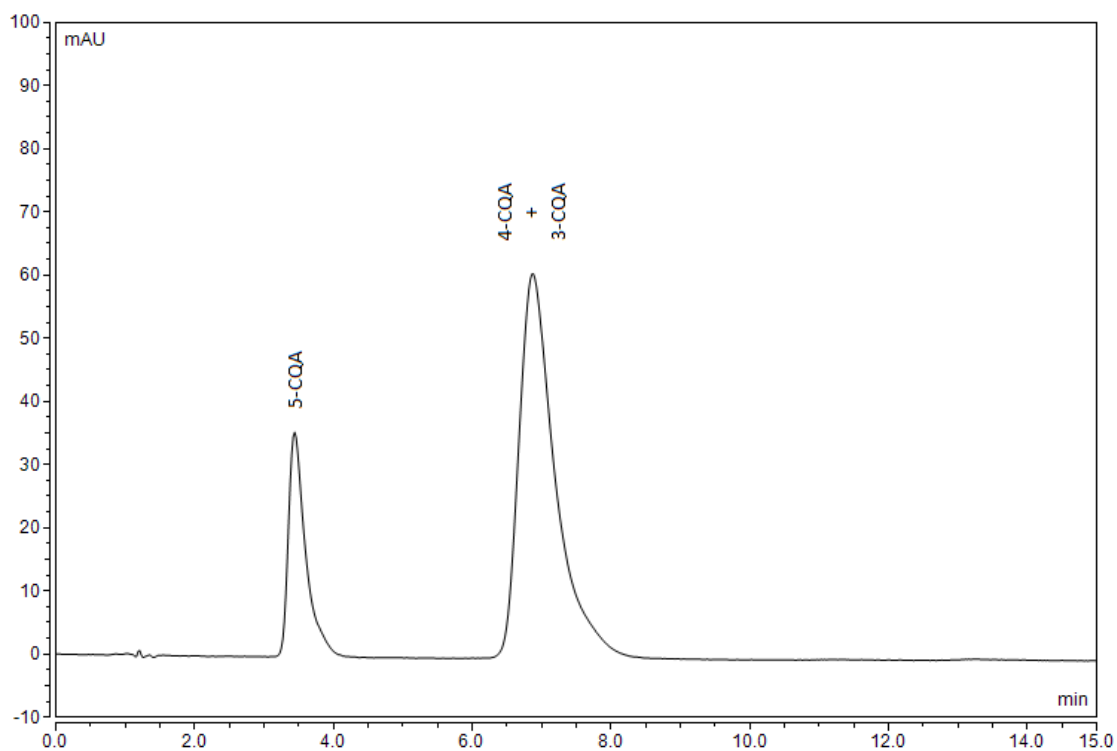
Obrázek 7: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 15 minut při 30°C na koloně Luna Omega® Polar C18 (150 x 2.1mm; 1.6µm) formou izokratické eluce s mobilní fází o složení 95% mobilní fáze A a 5% mobilní fáze B.



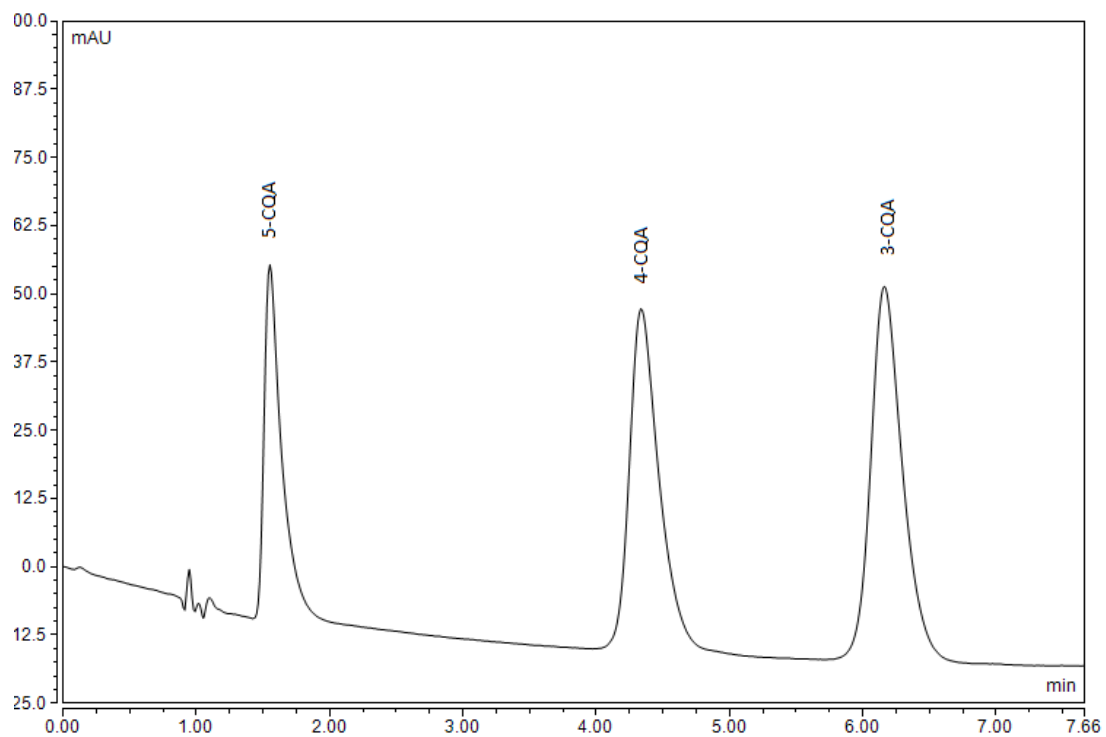
Obrázek 8: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 15 minut při 30°C na koloně Luna Omega® PS C18 (150 x 2.1mm; 1.6µm) formou izokratické eluce s mobilní fází o složení 95% mobilní fáze A a 5% mobilní fáze B, přičemž se píky kyselin kryptochlorogenové a chlorogenové nepodařilo oddělit.



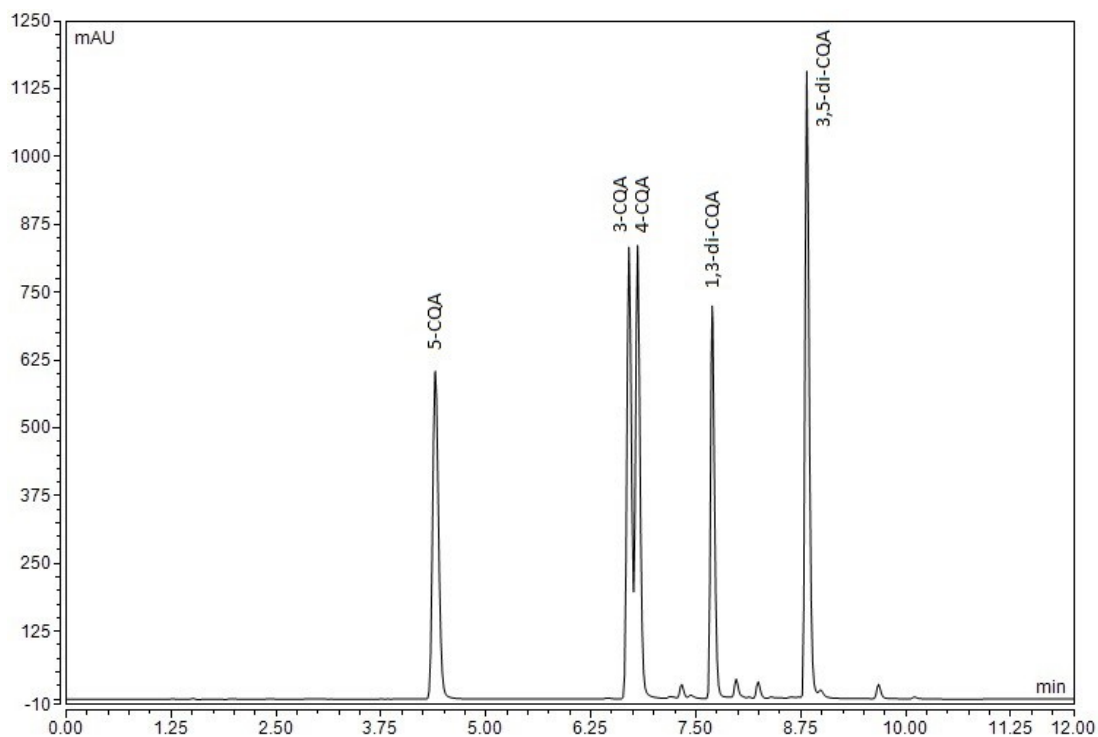
Obrázek 9: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 15 minut při 30°C na koloně Kinetex® F5 (150 x 2.1mm; 1.7µm) formou izokratické eluce s mobilní fází o složení 95% mobilní fáze A a 5% mobilní fáze B, přičemž se píky kyselin kryptochlorogenové a chlorogenové nepodařilo oddělit.



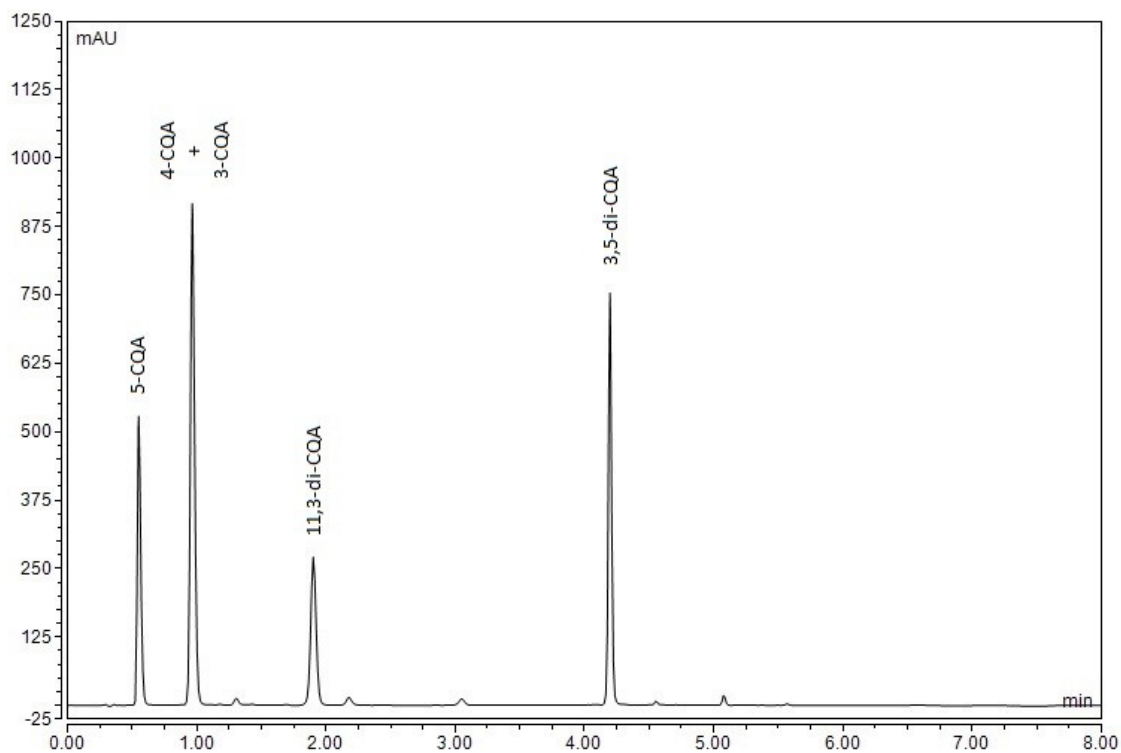
Obrázek 10: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 15 minut při 30°C na koloně Ascentis® Express ES-Cyano (100 x 2.1mm; 3µm) formou izokratické eluce s mobilní fází o složení 95% mobilní fáze A a 5% mobilní fáze B, přičemž se píky kyselin kryptochlorogenové a chlorogenové nepodařilo oddělit.



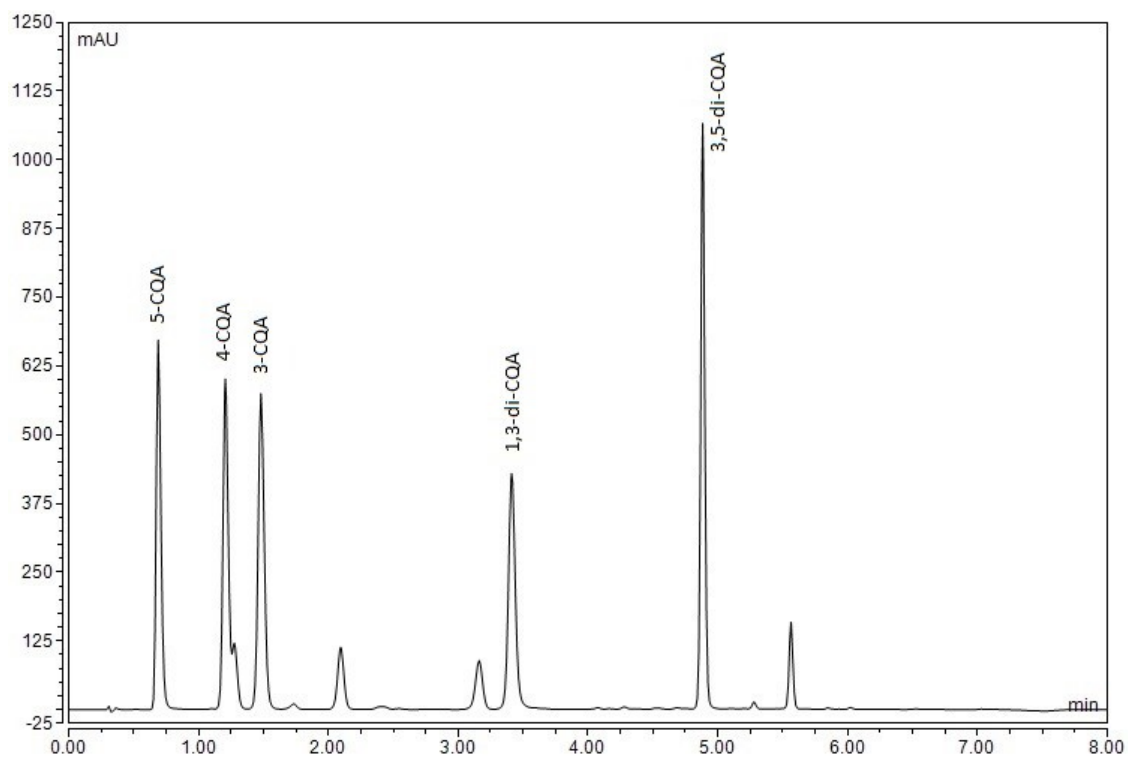
Obrázek 11: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 15 minut při 30°C na koloně Ascentis® Express RP-Amide (100 x 2.1mm; 2.7µm) formou izokratické eluce s mobilní fází o složení 95% mobilní fáze A a 5% mobilní fáze B.



Obrázek 12: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 12 minut na koloně Luna Omega Polar C18 (150 x 2.1mm; 1.6µm) o teplotě 30°C gradientovou elucí o průtoku mobilní fáze 0.3 ml/min. Dle záznamu jsou píky kyseliny chlorogenové a kryptochlorogenové nedostatečně odděleny.

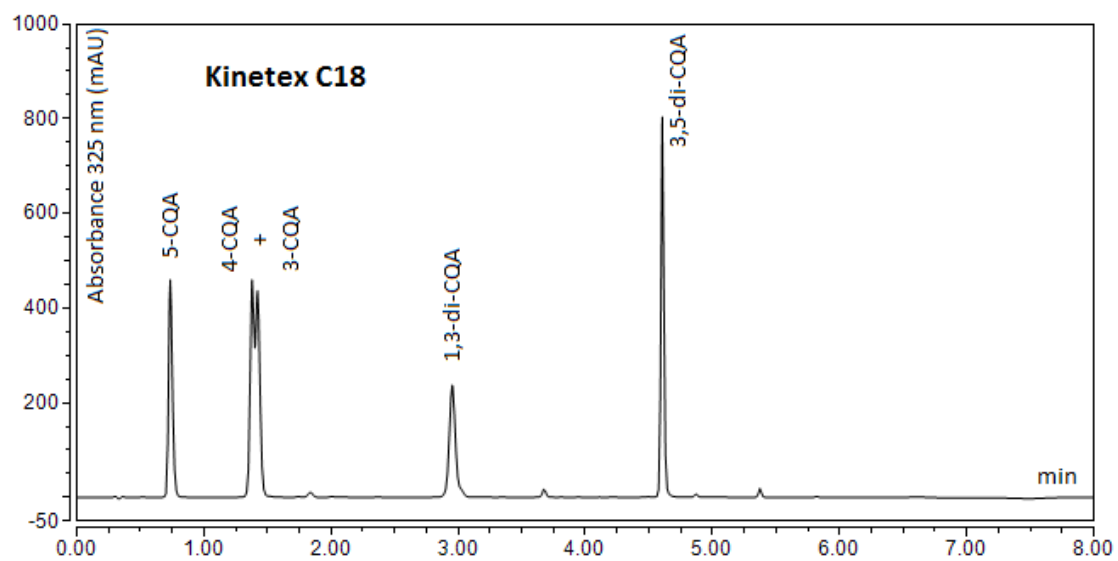
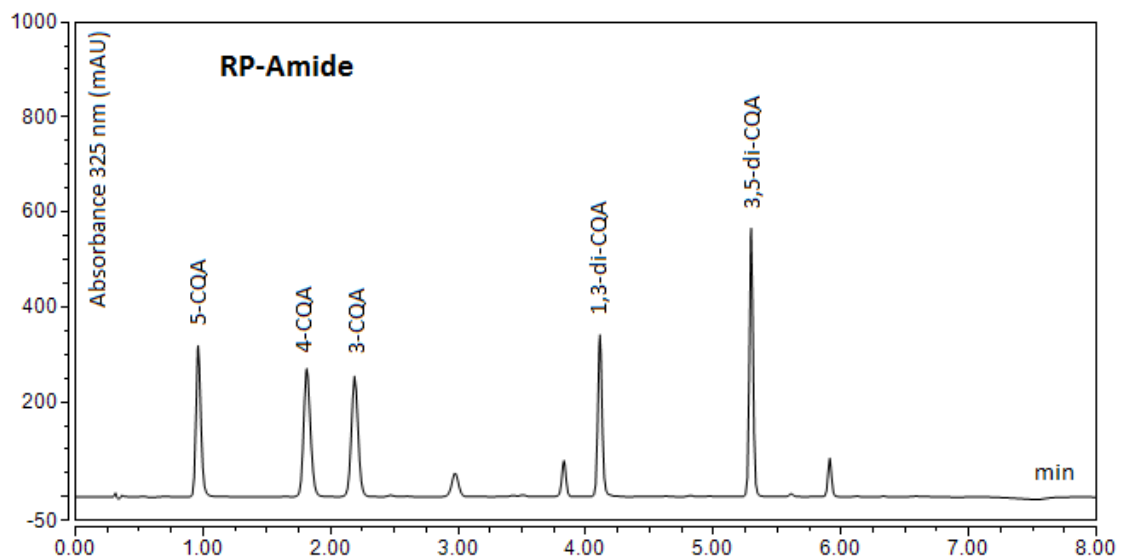


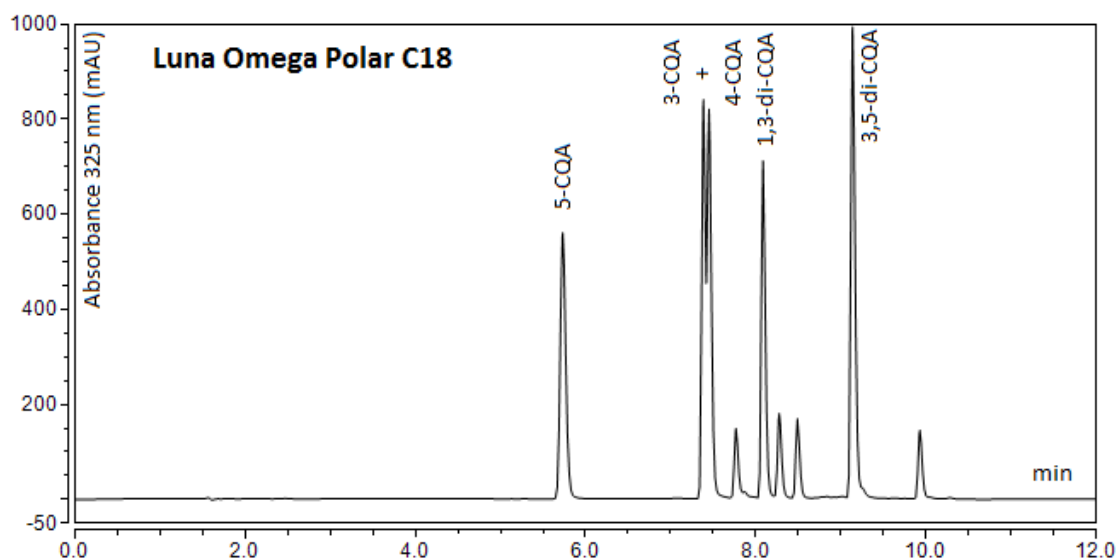
Obrázek 13: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 8 minut způsobem gradientové eluce při 30°C na koloně Kinetex® C18 (100 x 2.1mm; 2.6µm) s průtokem mobilní fáze 0.9 ml/min. Píky kyseliny kryptochlorogenové a chlorogenové se dle záznamu nepodařilo oddělit.



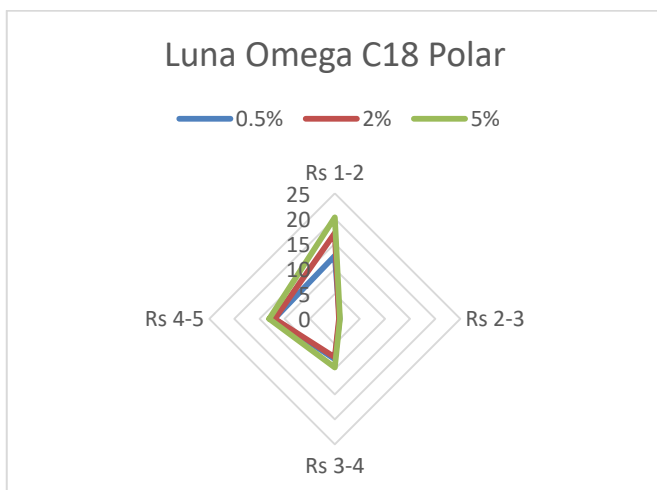
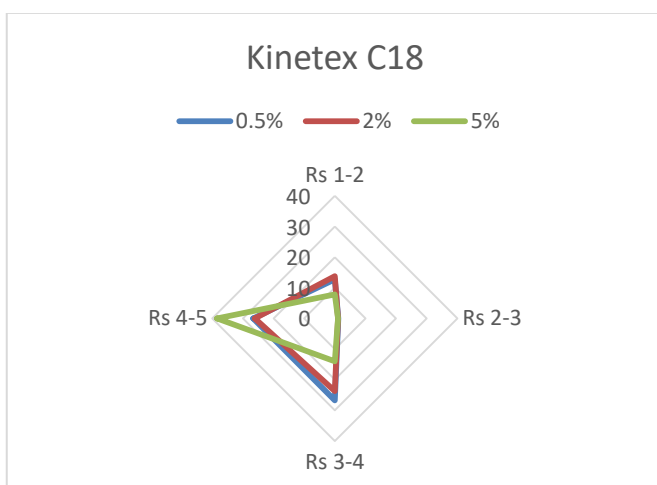
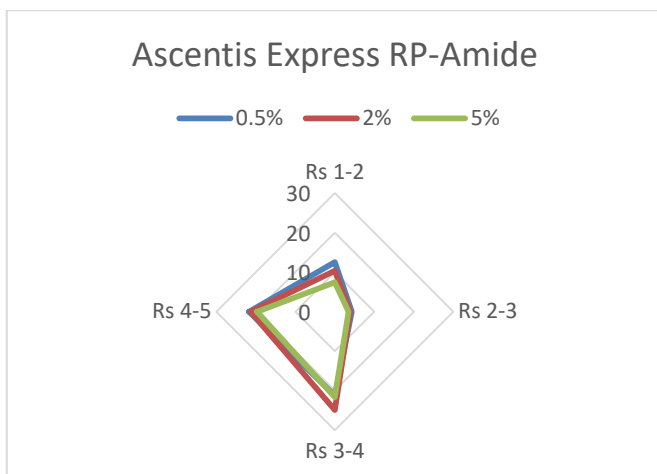
Obrázek 14: Chromatogram znázorňující vývoj analytické metody. Separace probíhala 8 minut způsobem gradientové eluce při 30°C na koloně Ascentis® Express RP-Amide (100 x 2.1mm; 2.7µm) o průtoku mobilní fáze 0.9 ml/min.

V dalším kroku vývoje metody byly provedeny retenční studie analyzovaných sloučenin s potenciální požadovanou selektivitou na třech kolonách (Ascentis Express RP-Amide 100 x 2,1 mm, 2,7 μm ; Kinetex C18 100 x 2,1 mm, 2,6 μm ; Luna Omega C18 Polar 150 x 2,1 mm, 1,6 μm). Působení různé koncentrace vodného roztoku kyseliny mravenčí v mobilní fázi A (0,5; 2,0 a 5,0% koncentrace kyseliny) na rozlišení pěti píků isochlorogenových kyselin bylo zkoumáno s použitím optimalizovaného gradientového programu pro každou kolonu při teplotě kolonového termostatu 30°C. Tři chromatogramy pro tři kolony s použitím 2%-ní kyseliny mravenčí jako složky A mobilní fáze na obrázku 15 ukazují, jak se selektivita stacionární fáze kolony RP-Amide (core-shell) odlišuje od ostatních dvou typů fáze C18 (core-shell a plně porózní částice). Obrázek 16 zase ukazuje porovnání rozlišení píků u všech tří kolon, kdy bylo použito rozdílné složení mobilní fáze A. Toto porovnání zobrazuje radarová tabulka. Se vzrůstající koncentrací kyseliny mravenčí v mobilní fázi A byla eluce všech píků na RP-Amide zrychlená a jak lze vidět, se zachovaným uspokojivým rozlišením všech píků. Retence analytů na zbylých dvou kolonách byla odlišná. Efekt složení mobilní fáze A na rozlišení píků – druhého a třetího v pořadí – byl téměř bezvýznamný na všech třech testovaných kolonách.





Obrázek 15: Porovnání separace kyselin na třech různých stacionárních fázích (Ascentis Express RP-Amide (100 x 2.1mm; 2.7 μ m), Kinetex C18 (100 x 2.1mm; 2.6 μ m), Luna Omega Polar C18 (150 x 2.1mm; 1.6 μ m)) za optimálních chromatografických podmínek a při použité mobilní fáze A, kterou představoval 2%-ní vodný roztok kyseliny mravenčí.



Obrázek 16: Porovnání rozlišení píků všech analyzovaných kyselin na třech různých stacionárních fázích (Ascentis Express RP-Amide (100 x 2.1mm; 2.7 μ m), Kinetex C18 (100 x 2.1mm; 2.6 μ m) a Luna Omega Polar C18 (150 x 2.1mm; 1.6 μ m)) za optimálních chromatografických podmínek pro každou kolonu a při použití různé síly mobilní fáze A(=0,5; 2 a 5%-ní vodný roztok kyseliny mravenčí).

K optimalizaci extrakce isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů z extraktů zelené kávy ve vzorcích doplňků stravy bylo studováno několik hledisek, které ovlivňují samotnou extrakci. 40 – 80%-ní vodný roztok methanolu je nejčastěji používané rozpouštědlo u analýz isochlorogenových kyselin v různých matricích [1,12,14,17]. Metoda založená na extrakci z pevné látky do kapaliny za pomoci ultrazvukové lázně byla zvolena jako nejvhodnější metoda pro další optimalizaci. Pokusy se složením extrakčního rozpouštědla, které se zaměřovaly na obsah organické části a obsah mravenčí kyseliny, stejně jako časový průběh ultrazvukové lázně, byly realizovány s cílem dosáhnout co nejlepší výtěžky extrahovaných isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů. Při optimalizaci metody bylo zjištěno, že všechny stanovené isochlorogenové kyseliny a jejich deriváty byly extrahovány z doplňků stravy s nejlepší výtěžností při použití směsi methanolu a 5%-ního vodného roztoku kyseliny mravenčí v rozsahu od 50+50% v/v do 25+75% v/v s nejkratším časem (10 min) stráveném v ultrazvukové lázni.

Nejlepší chromatografické separace bylo dosaženo spolu s nejlepší symetrií píků s použitím směsi methanolu a 5%-ního vodného roztoku kyseliny mravenčí 25+75% v/v. Nejlepších výsledků bylo dosaženo zejména u těch separací, které proběhly v prvních dvou minutách gradientové separace. To umožnilo použití tohoto extrakčního solventu bez nutnosti jakéhokoliv dalšího ředění roztoků vzorků. Bylo zjištěno, že nejlepší doba extrakce při působení ultrazvukové lázně je 10 minut. Delší doba extrakce než je uvedených 10 minut nemělo žádný efekt na extrakci, avšak delší extrakční čas než 20 minut vedlo k zahřátí extrakčního roztoku a snížilo tak výtěžky analytů. Dělo se tak pravděpodobně kvůli teplotní nestabilitě analytů ve vodných roztocích. Výsledky analýz ukázaly, že použití 0,2 až 0,6 gramů každého vzorku doplňku stravy, který obsahoval extrakt zelené kávy, byl dostatečný pro extrahování a přesné stanovování všech isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů. Všechny konečné roztoky byly přefiltrovány přes filtry s póry o velikosti 0,22 μm a následně byly umístěny do autosampleru a dávkovány na kolonu.

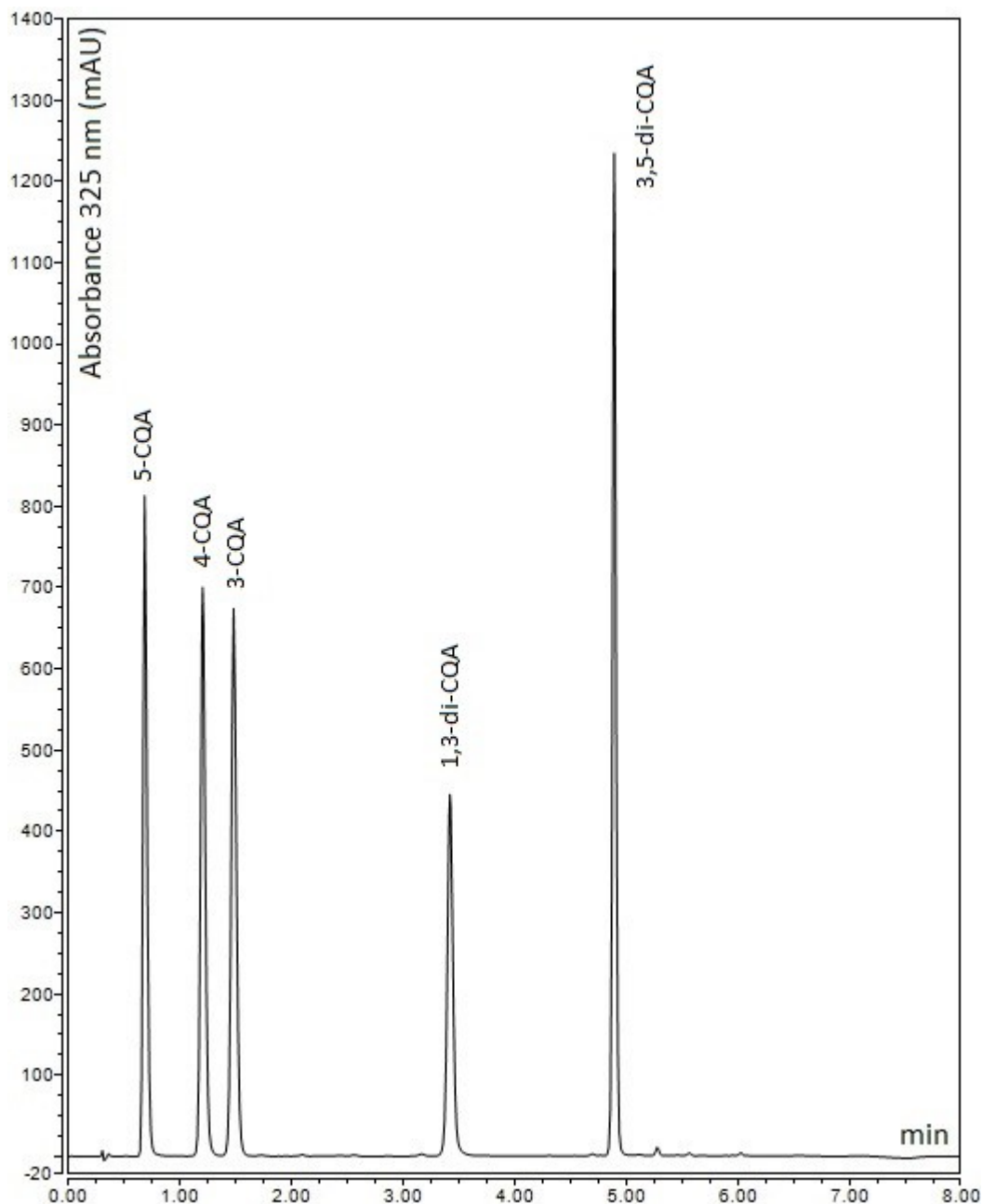
6.2 Validace vyvinuté metody za finálních podmínek

Validace metody zahrnovala vyhodnocení následujících parametrů analýzy: kalibrace, správnost, přesnost, limity detekce a limity kvantifikace, selektivita, robustnost a stabilita vzorků. Zhodnocení těchto parametrů bylo důležité kvůli tomu, aby bylo možné vyhodnotit spolehlivost výsledků, které byly získány navrženou metodou.

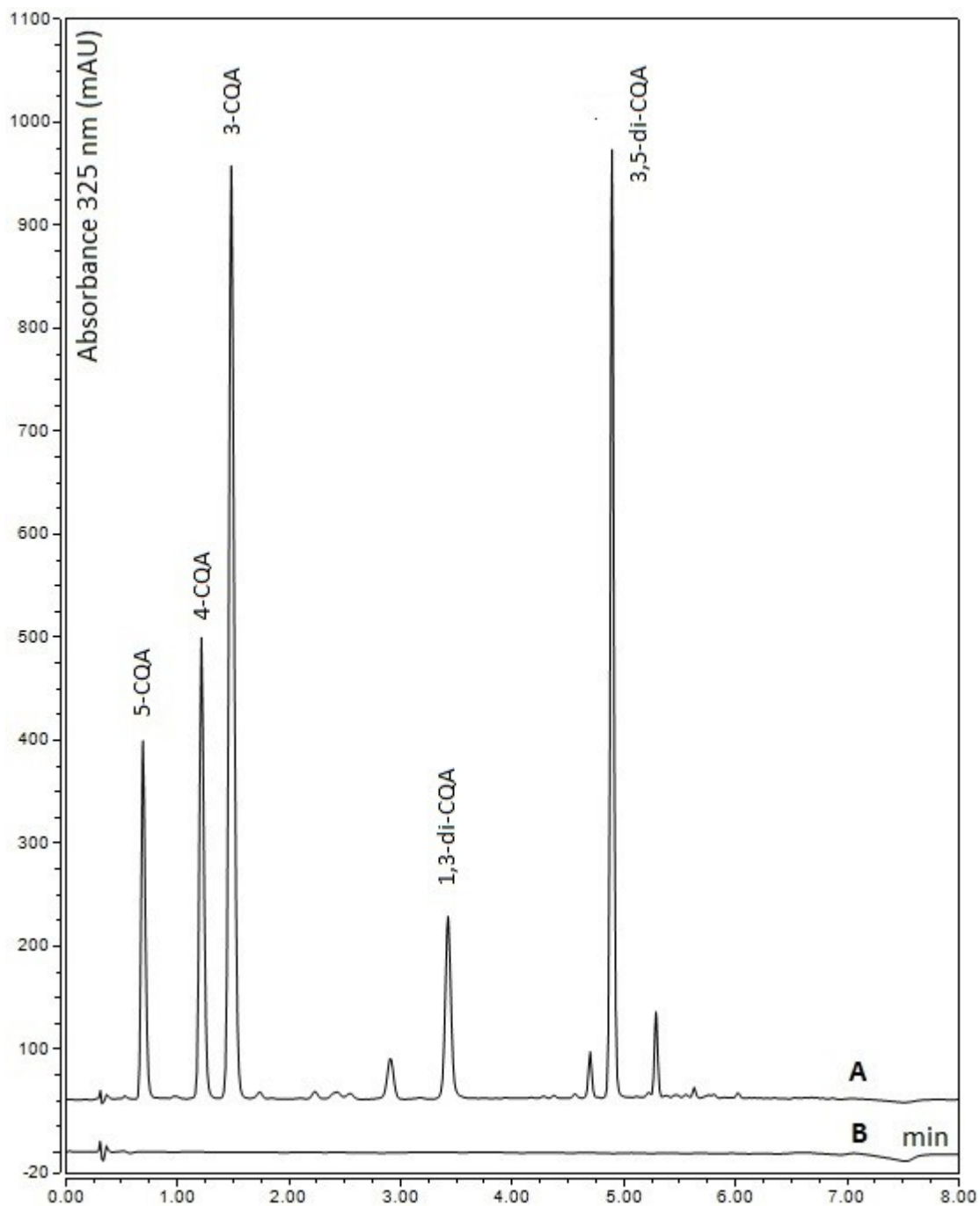
Pro validaci analytické metody byla vybrána kolona Ascentis Express RP-Amide a gradientová eluce, která využívala směs acetonitrilu a 5%-ní kyseliny mravenčí. Tyto podmínky vedly k nejlepšímu rozlišení píků a také k nejkratší délce analýzy. Jako nejvhodnější průtok mobilní fáze byl zvolen průtok o rychlosti 0,9 ml za minutu, která respektovala protitlak systému a teplotu kolonového termostatu. Vliv teploty na separaci byl testován a výsledky jsou shrnuty v tabulce 11 a 12, které zahrnují data z měření správnosti, přesnosti a robustnosti metody. Jako optimální teplota kolonového termostatu byla vyhodnocena teplota 30°C. Na základě UV-VIS spektra a absorpčního maxima všech analyzovaných kyselin byla pro monitorování a průběh kvantitativní analýzy zvolena detekční vlnová délka o velikosti 325 nm. Optimální chromatografické podmínky jsou spolehlivé pro stanovení všech isochlorogenových kyselin a jejich derivátů, pokud se jedná o rozlišení, kapacitu a symetrii píků a o krátkou dobu analýzy. Tyto podmínky lze pozorovat na separaci na obrázku 17 pro standardní roztok a na obrázku 18 pro skutečný vzorek s přidavkem standardu. Finální podmínky analýzy jsou shrnuty v tabulce 8.

Tabulka 8: Finální podmínky analýzy

Kolona	Eluce	Mobilní fáze	Průtok	Teplota kolony	Detekční vlnová délka
Ascentis® Express RP- Amide	Gradient	ACN + 5% HCOOH	0.9 ml/min	30°C	325 nm
Časový průběh gradientu (min)			Zastoupení mobilní fáze B (ACN (%))		
0.0 – 2.5			7 – 10		
2.5 – 6.0			10 – 33		
6.0 – 6.5			33 – 60		
6.5 – 7.0			60 – 7		
7.0 – 8.0			7		



Obrázek 17: Reprezentativní chromatogram standardů isochlorogenových kyselin, který znázorňuje jejich separaci na core-shell koloně Ascentis® Express RP-Amide (100 x 2.1mm; 2.7 μ m) při teplotě 30°C a průtoku mobilní fáze 0,9 ml/min, která sestávala z acetonitrilu a 5%-ního vodného roztoku kyseliny mravenčí. Záznam byl detekován při 325 nm.



Obrázek 18: Překryv chromatogramů skutečného vzorku s přidavkem standardu 1,3-di-CQA (A) a slepého nástřiku (B).

6.2.1 Test vhodnosti chromatografického systému

Jak již byly zmíněny parametry u validace, tyto byly měřeny a vyhodnocovány z šesti opakovaných nástřiků standardních roztoků (viz část „Příprava roztoků standardů“) před samotným analyzováním reálných vzorků. Test vhodnosti chromatografického systému pro vyvinutou metodu stanovil následující parametry: opakovatelnost retenčních časů (t_R), opakovatelnost ploch píků, faktor symetrie (S), rozlišení píků (R_s) a kapacita píků (P_c). U všech parametrů byly zjištěny hodnoty relativní směrodatné odchylky pod 1,0% (tabulka 9). Všechny testované parametry dosáhly v průběhu analýz hodnot, které odpovídají kritériím přijatelnosti. Reprezentativní chromatogram separace tří isochlorogenových kyselin (chlorogenová, kryptochlorogenová a neochlorogenová) a dvou disubstituovaných derivátů (1,3- a 3,5-disubstituované kyseliny) v standardních roztocích je znázorněn na obr. 17.

Tabulka 9: Výsledky testu vhodnosti systému.

Analyt	t_R^a	Opakovatelnost		S^b	R_s^c	P_c^d
		t_R , RSD (%)	Plocha píku, RSD (%)			
5-CQA	0,68	0,19	0,20	1,29	-	40,47
4-CQA	1,20	0,12	0,21	1,26	7,34	35,09
3-CQA	1,46	0,21	0,31	1,12	3,40	31,61
1,3-di-CQA	3,38	0,04	0,22	1,10	21,47	27,79
3,5-di-CQA	4,87	0,03	0,24	1,07	19,71	46,45

^a Retenční čas, min.

^b Faktor symetrie

^c Rozlišení píků

^d Kapacita píků

6.2.2 Kalibrace

K testování odezvy detektoru byly připraveny kalibrační roztoky standardů o šesti koncentracích. Linearita navržené metody byla zkoumána v rozsahu 1 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ pro chlorogenovou kyselinu a pro všechny další analyzované sloučeniny v rozsahu 1 – 450 $\mu\text{g/ml}$. Rozdíl v horním limitu kvantifikace byl mezi chlorogenovou kyselinou a dalšími analyty kvůli signifikantně vyššímu obsahu chlorogenové kyseliny v přípravných doplňcích stravy, než je obsah ostatních isochlorogenových kyselin a disubstituovaných derivátů. Směrnice, úseky a kalibrační rozmezí jsou v tabulce 10.

Tabulka 10: Analytické parametry vyvinuté metody (kalibrace standardu, regresní koeficienty, limity detekce a kvantifikace).

Analyt	Kalibrační rozmezí ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Směrnice	úsek	R^2	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
3-CQA	1-1000	0,1140±0,0007	-1,1018±0,2980	0,9996	0,33	1,10
4-CQA	1-450	0,1153±0,0015	-0,0342±0,4213	0,9987	0,35	1,15
5-CQA	1-450	0,1165±0,0015	0,0046±0,3931	0,9988	0,30	0,99
1,3-di-CQA	2-450	0,0942±0,0013	-0,0394±0,3334	0,9986	0,53	1,78
3,5-di-CQA	1-450	0,1377±0,0015	0,0367±0,4113	0,9988	0,22	0,73

6.2.3 Přesnost, správnost a selektivita

Přesnost vyvinuté metody byla podmíněna analyzováním na sobě nezávislých vzorků doplňku stravy „Vieste Zelená káva Premium“ s přidavkem roztoku standardu 1,3-disubstituované chlorogenové kyseliny (tato kyselina byla nalezena ve všech přípravcích pod limitem kvantifikace). Přesnost v rámci dne byla měřena na šesti opakovaných přípravách doplňku stravy „Vieste Zelená káva Premium“ v jednom dni. Mezidenní přesnost byla stanovena v rozmezí tří dnů. Správnost byla vyjádřena výtěžností sloučenin na dvou různých koncentračních hladinách (400 a 650 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro chlorogenovou kyselinu a 150 a 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro zbytek analyzovaných složek). Data, která jsou uvedena v tabulce 11 ukazují, že metoda prokázala uspokojivé hodnoty výtěžnosti pro všechny analyzované sloučeniny a byly v rozmezí 98,2 a 101,0%. Relativní směrodatná odchylka byla stanovena pro měření v rámci dne pro všechny analyty od 0,3% do 1,4% a pro mezidenní přesnost 0,3% až 3,0%. Výsledky ukazují, že správnost a přesnost nově vyvinutých metod jsou vhodné pro běžnou analýzu vzorku. Všechny analyzované isochlorogenové kyseliny a jejich disubstituované deriváty byly úspěšně separovány v průběhu pěti minut. U hodnocení parametru selektivity také nebyla zaznamenána přítomnost žádných interferujících píků v retenčních časech které náleží daným sloučeninám a to tak, že byly porovnány chromatogramy analýzy vzorku s přidavkem a slepého (obr. 18). Výsledky ukázaly, že vyvinutá metoda má vysokou selektivitu pro měření isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů v rostlinných extraktech.

Tabulka 11: Správnost (recovery) a přesnost vyvinuté UHPLC metody.

Analyt	Správnost (%)		Přesnost v rámci dne (RSD, %)	Přesnost mezi dny (RSD, %)
	úroveň 1 ^a	úroveň 2 ^b		
3-CQA	99,4	99,0	0,27	0,38
4-CQA	98,8	98,5	0,33	0,33
5-CQA	98,8	99,5	0,28	0,33
1,3-di-CQA	101,0	99,9	0,27	1,25
3,5-di-CQA	98,2	98,9	1,37	2,95

^a Koncentrace 400 µg.ml⁻¹ pro CH; 150 µg.ml⁻¹ pro ostatní látky

^b Koncentrace 650 µg.ml⁻¹ pro CH; 300 µg.ml⁻¹ pro ostatní látky

6.2.4 Limit detekce a limit kvantifikace

Tyto limity analyzovaných sloučenin byly stanoveny jako nejnižší koncentrace, které mohly být stanoveny jako statisticky rozdílné od slepého nástřiku a poskytující poměr signál/šum roven 3 (signal-to-noise S/N=3) pro limit detekce a 10 (S/N=10) pro limit stanovení. Výsledky limitů detekce a kvantifikace pro našich pět analytů v roztocích s přídavky jsou uvedeny v tabulce 10. Hodnoty limitů detekce se nacházely v rozsahu od 0,30 do 0,53 µg/ml. Tyto výsledky prokazují, že metoda je dostatečně citlivá pro analýzu potravních doplňků.

6.2.5 Stabilita

Zkoumání stability standardních zásobních roztoků skladovaných 2 týdny v mrazáku při teplotě -10°C a stability vzorků uchovávaných při 20°C v autosampleru po dobu 72 hodin kvůli podezření na teplotní nestabilitu všech analyzovaných látek ve vodném prostředí bylo dáno povědomím o pozorováních, které byly prováděny během vývoje metody a o hodnotách publikovaných dat [42]. Jak již je znázorněno v tabulce 12, zásobní roztoky byly považovány za stabilní pro období delší než 2 týdny při -10°C a roztoky vzorků v autosampleru po dobu 72 hodin při teplotě 20°C. Minimální odchylky ploch píků u zásobních roztoků ukazují, že optimalizované a validované podmínky vyvinuté metody jsou dosti robustné a že delší skladování vialek v autosampleru nijak značně neovlivňuje výsledky analýz.

6.2.6 Robustnost

Robustnost nově vyvinuté metody byla prokázána měřením vlivu malých a záměrných změn analytických parametrů na retenční dobu a počty píků všech analyzovaných sloučenin. Parametry, které byly brány v úvahu byly teplota kolonového

termostatu ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) a složení mobilní fáze A ($\pm 0,5\%$ vodného roztoku mravenčí kyseliny). Výsledky, které byly získány měřením za uvedených podmínek, jsou shrnuty v tabulce 12. Zatímco na retenční časy píků měly vliv změny související s teplotou kolony a se složením mobilní fáze A, plochy píků všech analyzovaných isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů ovlivněny nebyly. Minimální změny ploch píků všech analyzovaných sloučenin ve vzorcích měřených za různých podmínek dokazují, že validovaná metoda je dostatečně robustní a drobné změny v analytických parametrech neovlivňuje přesné stanovení analyzovaných složek.

Tabulka 12: Robustnost validované UHPLC metody a stabilita vzorků.

Parametr		Analyt				
		3-CQA	4-CQA	5-CQA	1,3-di-CQA	3,5-di-CQA
Teplota kolony $+5^{\circ}\text{C}$ (35°C)	Plocha píku	+0,5%	+0,9%	+0,2%	-0,3%	+0,8%
	t_R	-9,4%	-9,4%	-6,4%	-10,5%	-3,2%
Teplota kolony -5°C (25°C)	Plocha píku	+0,5%	+0,9%	+0,1%	-0,8%	+0,1%
	t_R	+11,5%	+11,3%	+7,6%	+8,2%	+3,0%
Mobilní fáze A $+0,5\%$ HCOOH ($4,5\%$)	Plocha píku	-0,2%	-0,3%	+0,1%	-0,7%	-0,9%
	t_R	+9,0%	+8,4%	+6,6%	+5,8%	+2,0%
Mobilní fáze A $-0,5\%$ HCOOH ($5,5\%$)	Plocha píku	-0,6%	-1,6%	-0,6%	-1,9%	-1,7%
	t_R	-5,9%	-6,3%	-5,4%	-5,5%	-1,9%
Stabilita vzorků v autosampleru po dobu 3 dnů (20°C)	Plocha píku	-3,0%	-1,6%	-3,1%	+0,2%	-2,5%
Stabilita vzorku v mrazáku po dobu 14 dnů (-10°C)	Plocha píku	+0,0%	+0,2%	-0,2%	+0,0%	-0,3%

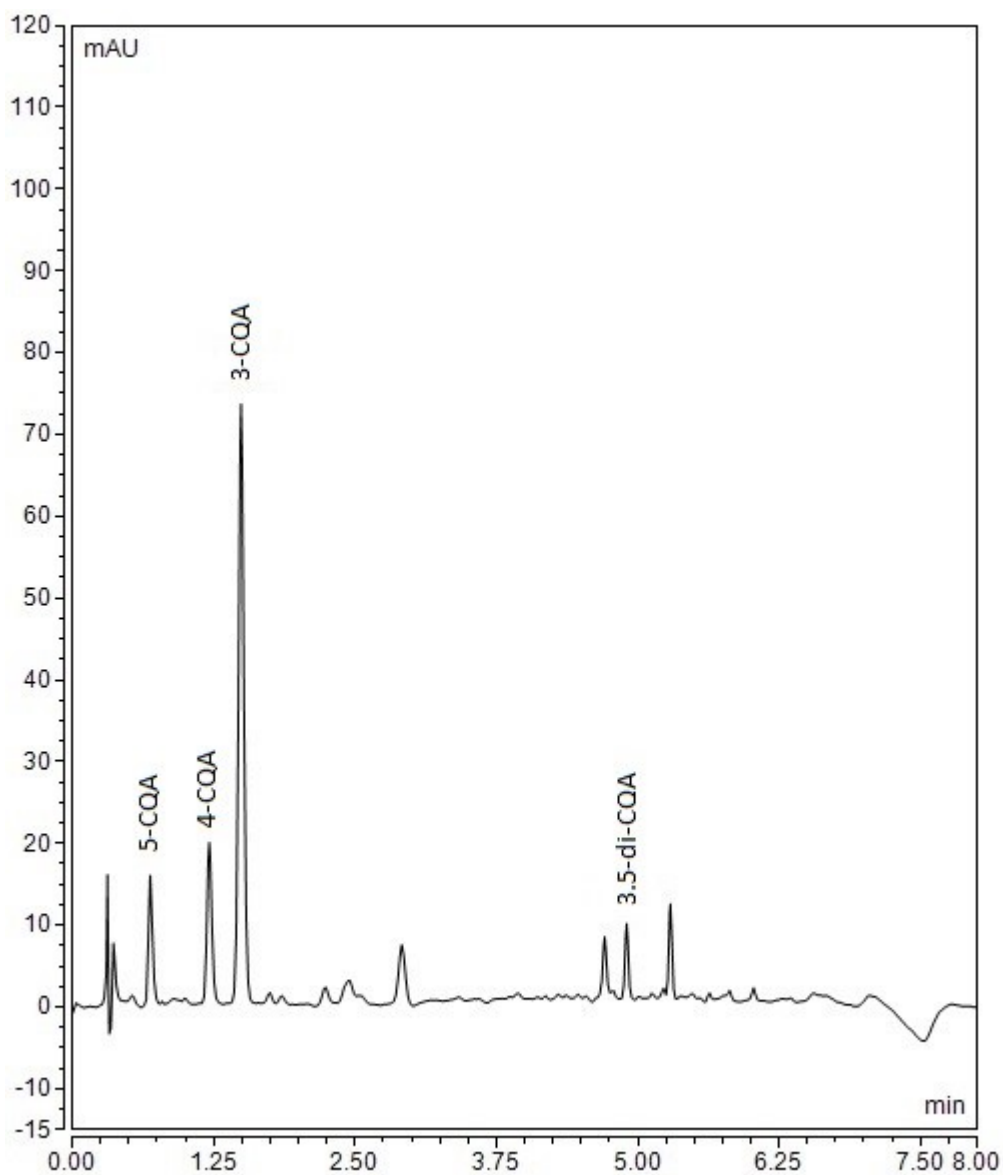
6.2.7 Stanovení isochlorogenových kyselin a disubstituovaných derivátů v doplňcích stravy

Nově vyvinutá metoda byla aplikována ke stanovení isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů v doplňcích stravy. Vzorky byly dostupné na trhu v lokálních lékárnách. Dostatečná přesnost, vysoká preciznost a nízké limity kvantifikace ukázaly, že metoda je spolehlivá pro provedení kvantitativní analýzy všech isochlorogenových kyselin a disubstituovaných derivátů v komerčních preparátech. Každý pík nalezen ve vzorcích byl identifikován porovnáním konkrétních retenčních časů s retenčními časy příslušných referenčních standardů. Reprezentativní chromatogram vzorku doplňku stravy „Vito life“ - kapsle se zeleným extraktem, je

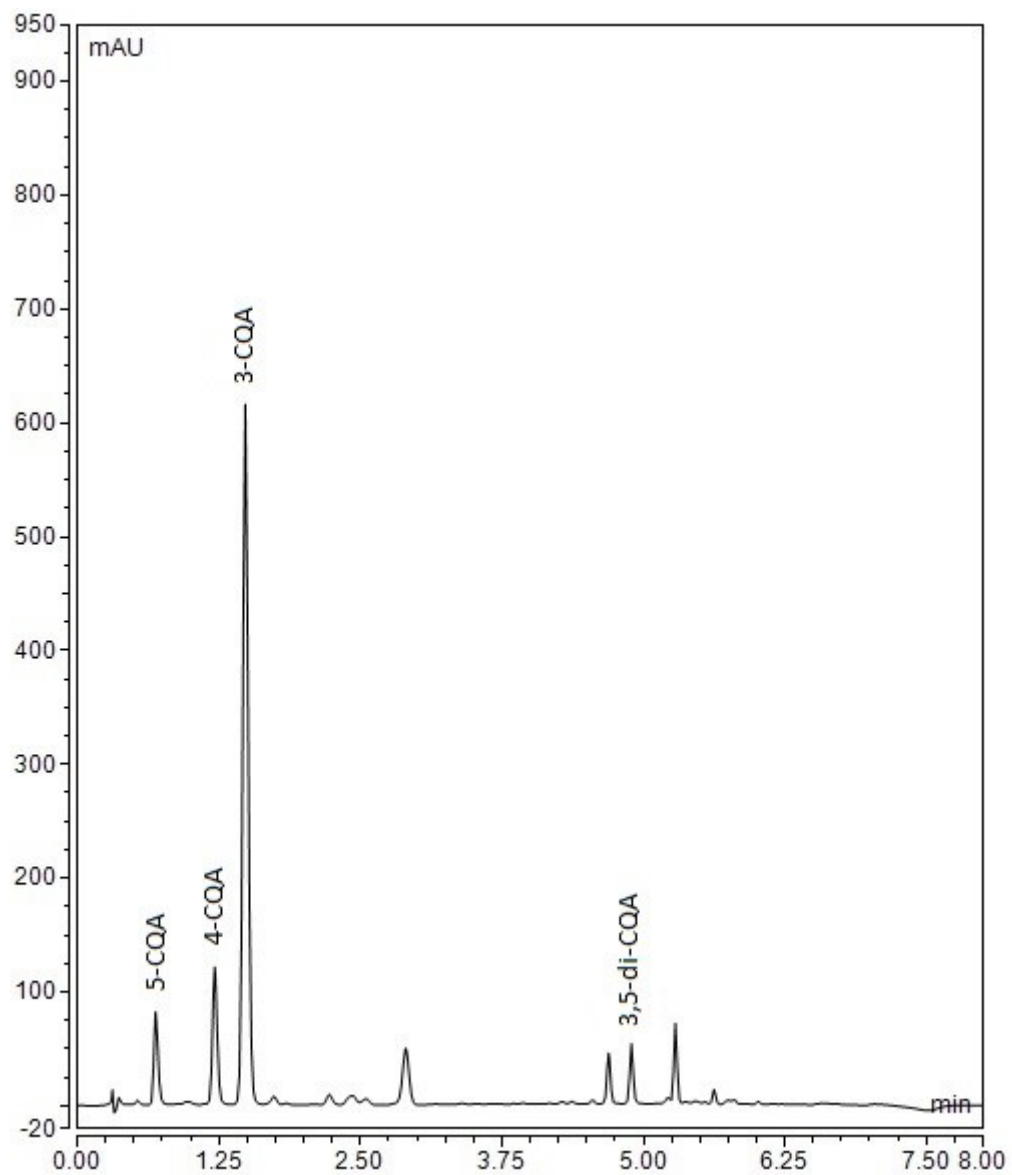
znázorněn na obrázku 23. Množství obsahu isochlorogenových kyselin a disubstituovaných derivátů těchto kyselin v různých doplňcích stravy včetně celkového množství analyzovaných složek v jednodávkové formě (v tomto případě tvrdé kapsle), ve 100 mg preparátu a ve 100 mg extraktu použitého v každém doplňku stravy (deklarované množství extraktu v jednodávkové formě byla definována výrobcem) jsou zobrazeny v tabulce 13. Ve všech analyzovaných preparátech doplňků stravy byla nalezena v největší míře chlorogenová kyselina, po které nalezeným množstvím následovala kyselina kryptochlorogenová a neochlorogenová. 3,5-disubstituovaná kyselina byla stanovena jako menšinová složka v extraktu zelené kávy. 1,3-disubstituovaná kyselina nebyla přítomna v žádném vzorku nad limitem kvantifikace. Jak lze pozorovat, obsah všech analyzovaných složek se lišil v různých vzorcích. Avšak byl spatřen velký rozpor mezi množstvím použitého extraktu a obsahu isochlorogenových kyselin a jejich derivátů v jedné kapsli každého preparátu. Největší síla extraktu zelené kávy byla prokázána v přípravku s názvem „Zelená káva Premium“, která činila 78,0 mg isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů na 100 mg extraktu. Přesto ale bylo množství těchto kyselin v jedné dávce relativně nízké kvůli menšímu množství použitého extraktu zelené kávy v jedné kapsli.

Tabulka 13: Stanovení isochlorogenových kyselin a disubstituovaných derivátů v preparátech vybraných nutraceutik, obsahujících extrakt zelené kávy.

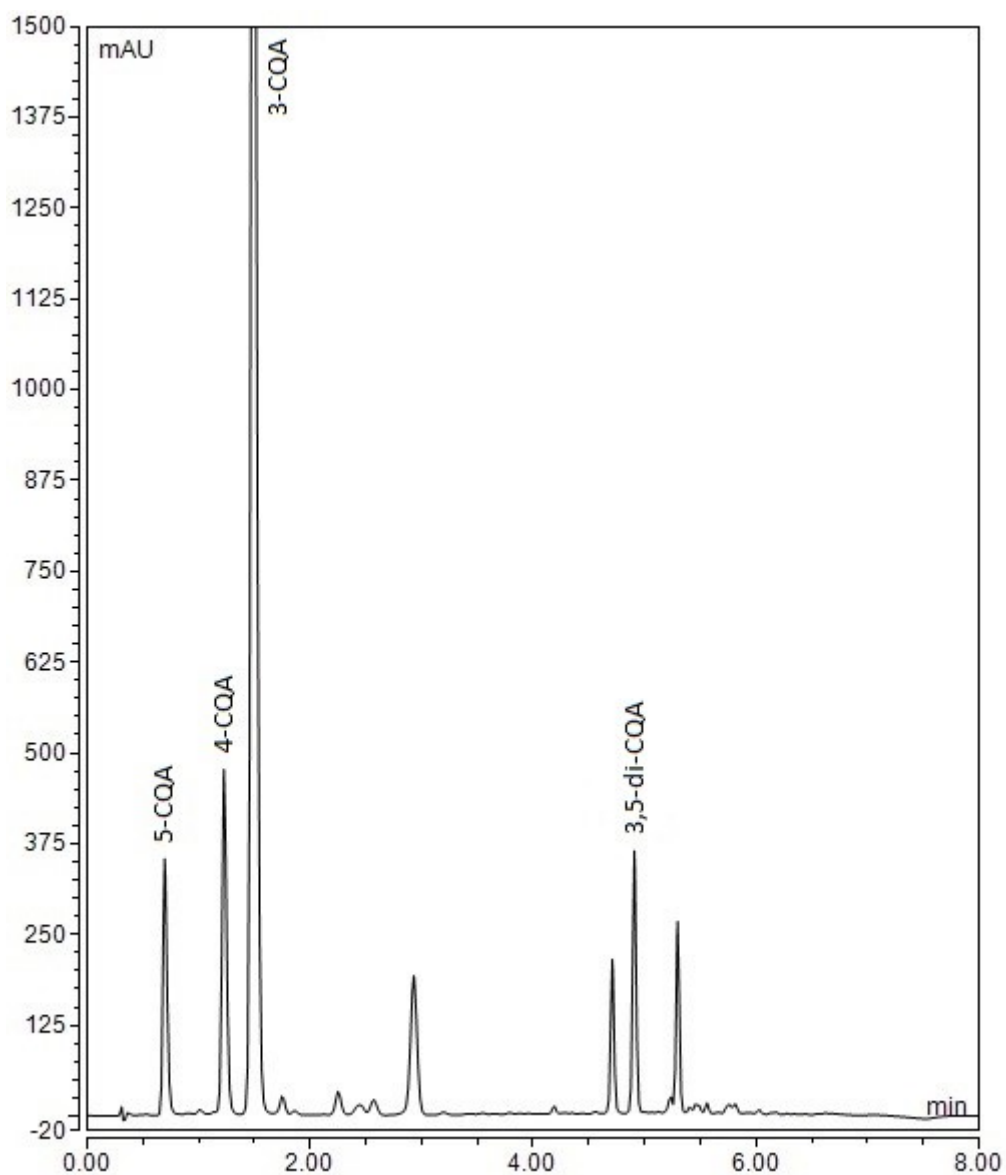
Doplňek stravy s extraktem zelené kávy (obchodní název)	Množství nalezeno v jedné kapsli (mg)					Celkem	Množství nalezeno v 100 mg preparátu (mg)	Množství nalezeno v 100 mg extraktu (mg)
	3-CQA	4-CQA	5-CQA	1,3-di- CQA	3,5-di- CQA			
Zelená káva max	98.5±0.3	20.3±0.1	14.1±0.0	<LOQ	12.0±0.2	144,9	28,8	29,0
Vito life kyselina chlorogenová	69.0±0.3	18.3±0.1	13.0±0.0	<LOQ	5.4±0.3	105,7	26,3	26,4
Zelená káva bylinný extrakt	61.7±0.1	9.7±0.0	6.6±0.0	<LOQ	4.8±0.0	82,8	20,8	41,4
Zelená káva extra	16.5±0.2	3.5±0.0	2.3±0.0	<LOQ	1.0±0.1	23,3	5,8	11,7
Zelená káva Premium	14.8±0.0	2.5±0.0	1.5±0.0	<LOQ	0.6±0.0	19,4	3,8	78,0
Vito life zelená káva	9.5±0.1	2.2±0.0	1.5±0.0	<LOQ	0.6±0.0	13,8	3,5	3,8
Kilostop	1.8±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	<LOQ	0.1±0.0	2,6	0,4	40,2



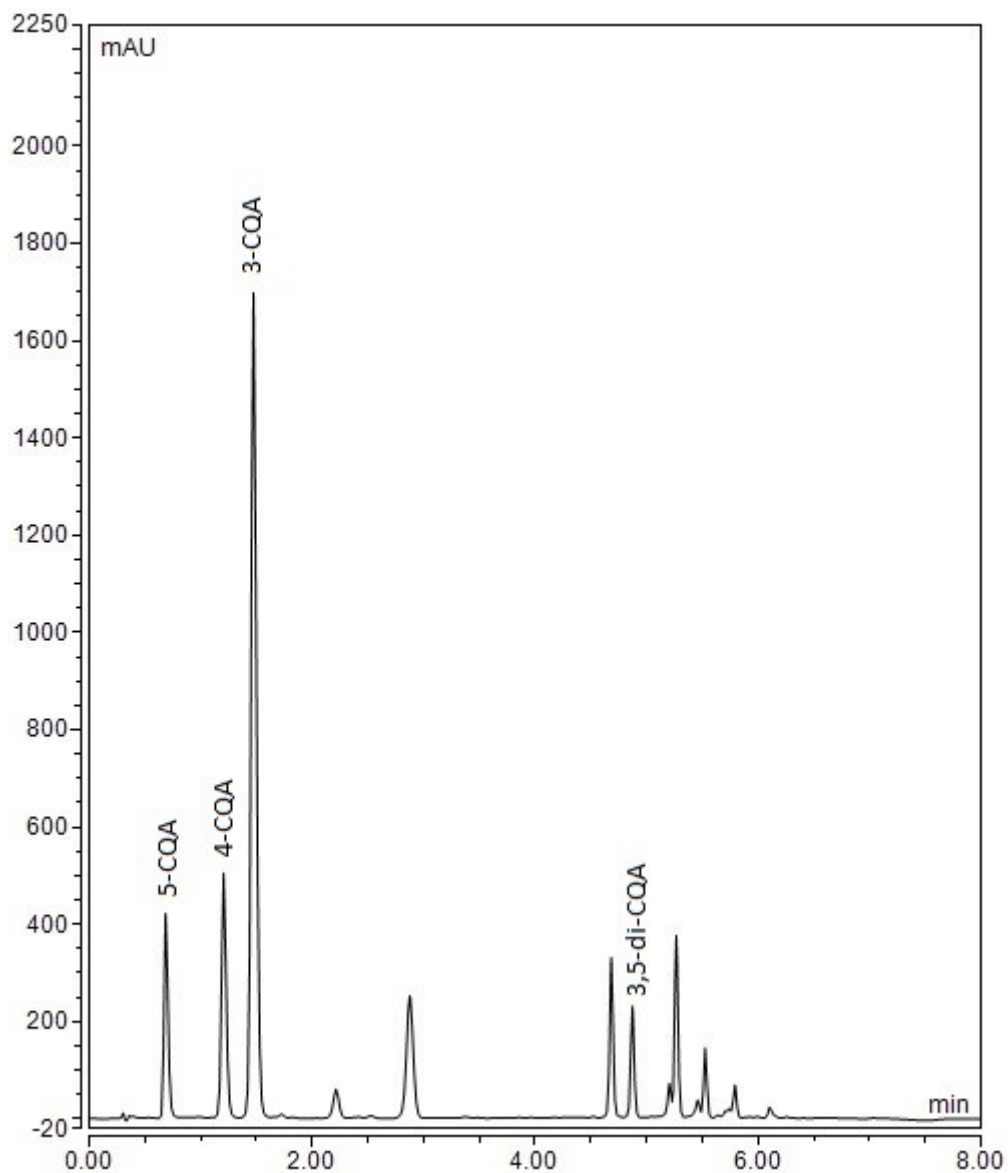
Obrázek 19: Přípravek Kilostop – chromatogram stanovení kyseliny chlorogenové, kryprochlorogenové, neochlorogenové a 3,5-disubstituované kyseliny chlorogenové, pozorováno při validovaných podmínkách.



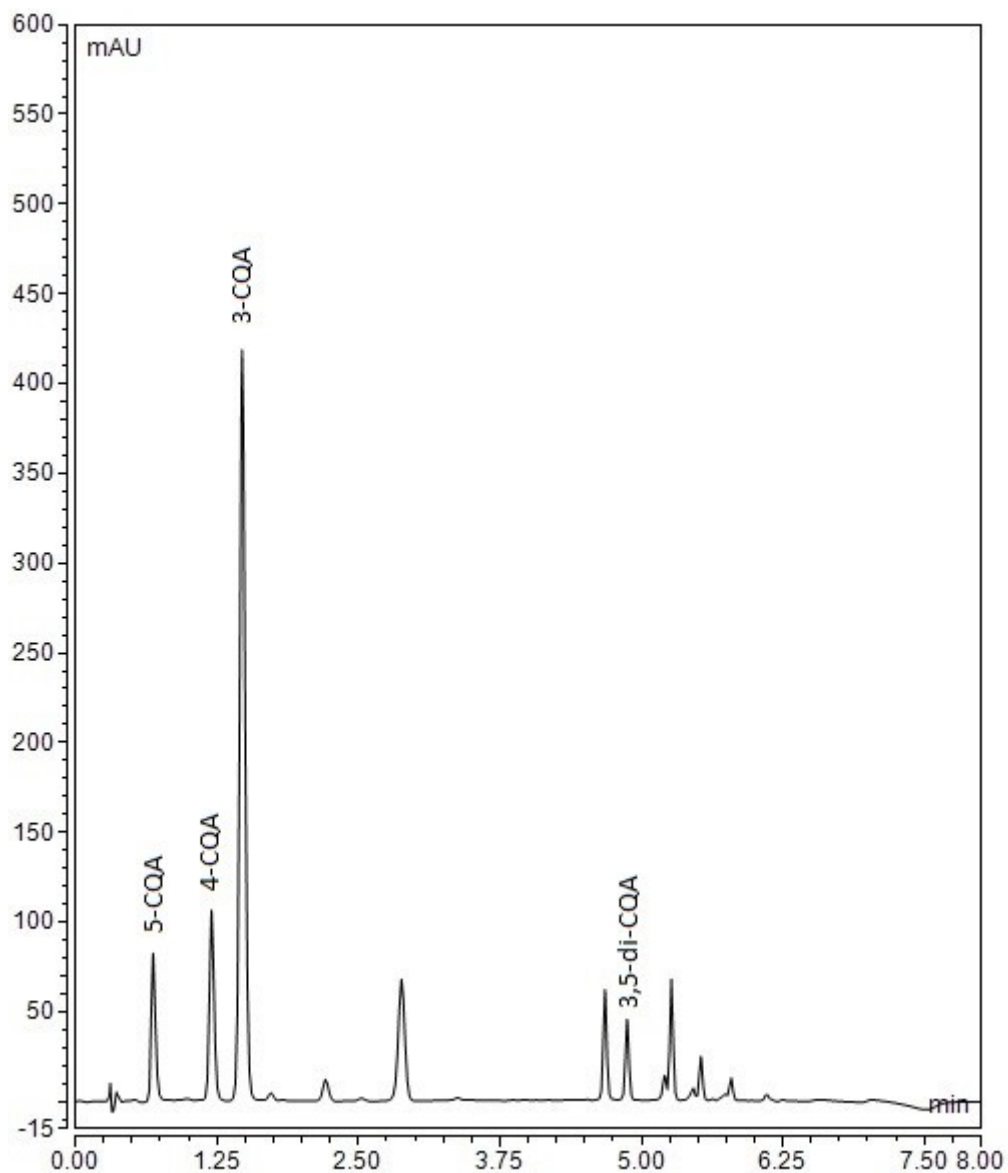
Obrázek 20: Přípravek Zelená káva Premium – chromatogram stanovení tří isochlorogenových kyselin při validovaných podmínkách.



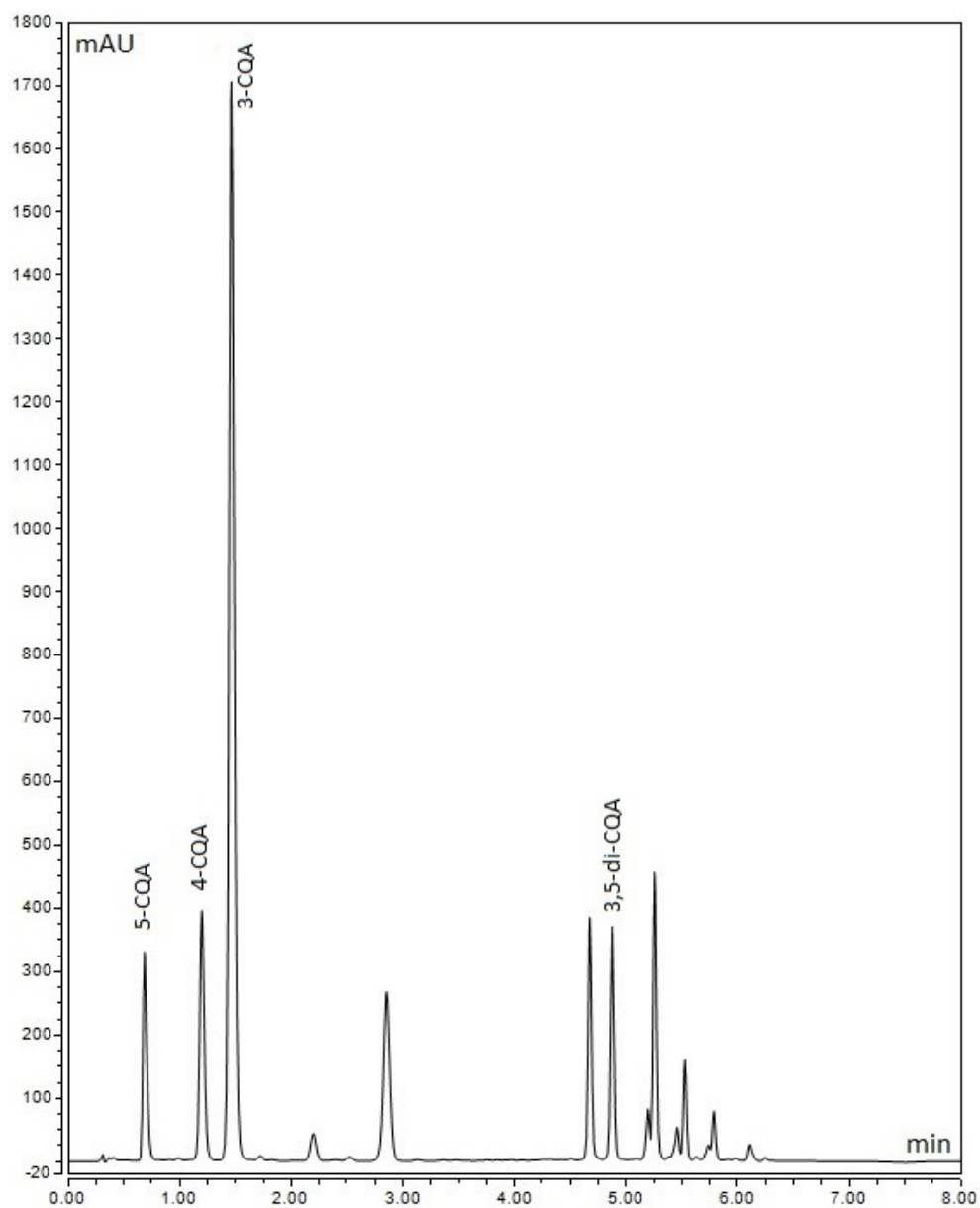
Obrázek 21: Přípravek Zelená káva – bylinný extrakt. Chromatogram stanovení isochlorogenových kyselin a 3,5-disubst. derivátu kys. chlorogenové, které bylo provedeno za validovaných podmínek.



Obrázek 22: Přípravek Vitolife kyselina chlorogenová – chromatogram stanovení isochlorogenových kyselin a 3,5-disubstituované chlorogenové kyseliny při validovaných podmínkách.



Obrázek 23: Přípravek Vitolife zelená káva – chromatogram stanovení isochlorogenových kyselin a 3,5-disubstituované kyseliny chlorogenové při validovaných podmínkách.



Obrázek 24: Přípravek Zelená káva max – chromatogram stanovení isochlorogenových kyselin a 3,5-disubstituované chlorogenové kyseliny při validovaných podmínkách.

7 Závěr

Pro separaci a současnou kvantifikaci pěti isochlorogenových kyselin včetně jejich derivátů nalezených v extraktech zelené kávy v doplňcích stravy byla vyvinuta rychlá a účinná metoda. Metoda extrakce látky z tuhé fáze do kapalné za použití ultrazvukové lázně po dobu 10 minut a extrakčního solventu o složení methanolu a 5%-ního vodného roztoku kyseliny mravenčí (25:75 v/v) se ukázala jako nejrychlejší a neúčinnější postup pro extrakci všech sloučenin z preparátů doplňků stravy. Chromatografická kolona se stacionární core-shell RP-Amide fází poskytla optimální separaci všech stanovovaných sloučenin v krátkém čase i za přítomnosti dalších sloučenin, které byly nalezeny ve vzorcích extraktů, a to při vlnové délce 325 nm. Stacionární fáze typu RP-Amide poskytla krátký čas analýzy a dostačující selektivitu, která umožnila separaci všech složek s požadovaným rozlišením a požadovanou symetrií všech píků. U validované metody byl použit gradientový eluční program, který sestával z acetonitrilu a 5%-ní roztoku kyseliny mravenčí při teplotě kolony 30°C. Vzhledem k rychlému postupu přípravy vzorků a krátkému času analýzy, který činil pouhých 8 minut je nově vyvinutá metoda dostatečně rychlá a spolehlivá pro provádění běžných analýz extraktů zelené kávy, které jsou obsaženy v doplňcích stravy.

Závěrem lze shrnout následující informace. Pozorované výsledky analýz prokázaly velkou pestrost v obsahu isochlorogenových kyselin a jejich disubstituovaných derivátů ve zkoumaných doplňcích stravy. Hlavním komponentem se ukázala kyselina chlorogenová ve všech analyzovaných extraktech testovaných nutraceutik. Kromě toho, retenční studie všech analytů při různém složení mobilní fáze byla vyhodnocena pro důkaz toho, že RP-Amide stacionární fáze má odlišnou selektivitu pro polární kyseliny než ostatní testované stacionární fáze. Stacionární fáze C18 s plně porózními nebo core-shell částicemi jsou výlučně používány k analýzám isochlorogenových kyselin a jejich derivátů, ale ne všechny jsou vhodné pro rychlou separaci těchto analytů. Pouze stacionární fáze RP-Amide v kombinaci s 5%-ním vodným roztokem kyseliny mravenčí jako mobilní fází A a acetonitrem jako mobilní fází B umožňuje rychlou separaci všech analytů s uspokojivým rozlišením, zejména pro kyselinu chlorogenovou a kryptochlorogenovou, kterého nedosáhla žádná jiná stacionární fáze v přijatelném časovém průběhu analýzy.

8 Seznam použité literatury

- [1] A. Farah, M. Monteiro, C.M. Donangelo, S. Lafay, Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans, *J. Nutr.* 138 (2008)2309–2315.
- [2] A. Farah, C.M. Donangelo, Phenolic compounds in coffee, *Braz. J. Plant Physiol.*18 (2006) 23–36.
- [3] R. Upadhyay, L.J.M. Rao, An outlook on chlorogenic acids-occurrence chemistry, technology, and biological activities, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53(2013) 968–984.
- [4] T. Ranheim, B. Halvorsen, Coffee consumption and human health: beneficial or detrimental? Mechanisms for effects of coffee consumption on different risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus, *Mol. Nutr. Food Res.* 49 (2005) 274–284.
- [5] E. Salazar-Martinez, W.C. Willett, A. Ascherio, J.E. Manson, M.F. Leitzmann, M.J. Stampfer, F.B. Hu, Coffee consumption and risk for type 2 diabetes mellitus, *Ann. Intern. Med.* 140 (2004) 1–8.
- [6] A.A. Almeida, A. Farah, D.A.M. Silva, E.A. Nunam, M.B.A. Glória, Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8738–8743.
- [7] M.D. Santos, M.C. Almeida, N.P. Lopes, G.E.P. Souza, Evaluation of the antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity of the natural polyphenol chlorogenic acid, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2006) 2236–2240.
- [8] G. Haghi, A. Hatami, R. Arshi, Distribution of caffeic acid derivatives in *Gundelia tournefortii* L, *Food Chem.* 124 (2011) 1029–1035.
- [9] T. Bakuradze, N. Boehm, C. Janzowski, R. Lang, T. Hofmann, J.P. Stockis, F.W. Albert, H. Stiebitz, G. Bytof, I. Lantz, M. Baum, G. Eisenbrand, Antioxidantrich coffee reduces DNA damage, elevates glutathione status and

- contributes to weight control: results from an intervention study, *Mol. Nutr. Food Res.* 55(2011) 793–797.
- [10] F. Wang, C. Li, Y. Zheng, Y. Li, G. Peng, Study on the anaphylactoid of three phenolic acids in Honeysuckle, *J. Ethnopharmacol.* 170 (2015) 1–7.
- [11] H. Xu, X. Li, J. Chen, Comparison of phenolic compound contents and antioxidant capacities of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruits, *Food Sci. Biotechnol.* 23 (2014) 2013–2020.
- [12] J. Wang, D.Q. Lu, X.Q. Ling, J.L. Wang, H.Q. Qiao, P.K. Ouyang, Simultaneous determination of four active components in tobacco wastes by LC, *Chromatographia* 69 (2009) 561–566.
- [13] A.A. Carneiro, Y.Y. de Barros, M.M. de Freitas, L.A. Simeoni, P.O. Magalhães, D. Silveira, Y.M. Fonseca-Bazzo, Identification and quantification of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. tablets and capsules, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 11 (2017) 94–102.
- [14] A. Farah, T. de Paulis, L.C. Trugo, P.R. Martin, Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1505–1513.
- [15] A. Farah, T. de Paulis, D.P. Moreira, L.C. Trugo, P.R. Martin, Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated Arabica coffees, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 374–381.
- [16] M. Monteiro, A. Farah, D. Perrone, L.C. Trugo, C. Donangelo, Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans, *J. Nutr.* 137 (2007) 2196–2201.
- [17] Y. Chang, A. Ge, X. Yu, X. Jiao, J. Li, J. He, J. Tian, W. Liu, J.T. Azietaku, B. Zhang, X. Gao, Simultaneous determination of four phenolic acids and seven alkaloids in rat plasma after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Jinqi Jiangtang Tablet by LC-ESI-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 117 (2016) 1–10.

- [18] D. Kremr, D.J. Cocovi-Solberg, P. Bajerová, K. Ventura, M. Miró, On-line monitoring of in-vitro oral bioaccessibility tests as front-end to liquid chromatography for determination of chlorogenic acid isomers in dietary supplements, *Talanta* 166 (2017) 391–398.
- [19] C. Luo, X. Wang, G. Gao, L. Wang, Y. Li, C. Sun, Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweet potato cultivars by HPLC–DAD and HPLC–ESI–MS/MS, *Food Chem.* 141 (2013)2697–2706.
- [20] A. Nugroho, K.H. Kim, K.R. Lee, M.B. Alam, J.S. Choi, W. Kim, H. Park, Qualitative and quantitative determination of the caffeoylquinic acids on the Korean mountainous vegetables used for Chwinamul and their peroxynitrite-scavenging effect, *Arch. Pharm. Res.* 32 (2009)1361–1367.
- [21] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *Journal of chromatography A*, 1357 (2014) 36–52.
- [22] Ascentis Express RP-Amide: Combining an embedded polar group stationary phase and fused-core particles, dostupné ze stránky sigma-aldrich.com/express (citováno 17.4.2018)
- [23] Y. Sato, S. Itagaki, T. Kurokawa, J. Ogura, M. Kobayashi, T. Hirano, M. Sugawara, K. Iseki, In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid, *International Journal of Pharmaceutics* 403 (2011) 136–138.
- [24] J. Yumha Laiz, R. Rodrigo, Beneficial effects of chlorogenic acids on essential hypertension, *International Journal of Food and Nutritional Science*, Vol. 3, Issue 2 (2016) 1–5.
- [25] I. Tomac, M. Šeruga, E. Beinrohr, Characterization of chlorogenic acids in coffee by flow – through chronopotentiometry, *Food Anal. Methods* (2017) 10:3924–3933.

- [26] J. Fibigr, D. Šatínský, P. Solich, A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a *Silybum marianum* extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 134 (2017) 203–213.
- [27] J. Fibigr, D. Šatínský, P. Solich, A UHPLC method for the rapid separation and quantification of anthocyanins in acai berry and dry blueberry extracts, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 143 (2017) 204–213.
- [28] H. Sklenářová, *Separáčn  analytick  metody – vysoko u inn  kapalinov  chromatografie*, dostupné z https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/242277/mod_resource/content/3/HPLC.pdf (citováno 17.4.2018)
- [29] C. Smith, Choosing–and not choosing–UHPLC, *Life Science Articles* (2013), dostupné z <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/149206-Choosing-and-Not-Choosing-UHPLC/> (citováno 17.4.2018)
- [30] L. Nov kov , M. Douša, *Modern  HPLC separace v teorii a praxi I.* (2013)
- [31] LCGC Editors, Market Profile: UHPLC versus standard HPLC, *LCGC North America*, Vol. 31, Issue 5 (2013) 360, dostupné z <http://www.chromatographyonline.com/market-profile-uhplc-versus-standard-hplc-0> (citováno 17.4.2018)
- [32] M. W. Dong, K. Zhang, Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development, *Trends in Analytical Chemistry* 63 (2014) 21–30.
- [33] Thermo Fisher Scientific, UltiMate™ 3000 RSLCnano System, dostupné z <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ULTIM3000RSLCNANO>
- [34] Astina KILOSTOP, citováno z: <https://www.drmax.cz/astina-kilostop-cps-60> (citováno 17.4.2018)
- [35] Zelen  káva extra, citováno z: [https://www.awashop.cz/zelena-kava-extra-s-
vitaminem-c-a-chromem-cps-
60/?gclid=EAIaIQobChMI1bjHitLX2QIV27rACh24_QFvEAQYASABEgK8FPD_BwE](https://www.awashop.cz/zelena-kava-extra-s-vitaminem-c-a-chromem-cps-60/?gclid=EAIaIQobChMI1bjHitLX2QIV27rACh24_QFvEAQYASABEgK8FPD_BwE) (citováno 17.4.2018)

- [36] Zdrovit Zelená káva Max, citováno z: https://www.drmax.cz/zelena-kava-max?gclid=EAlaIQobChMIzKWw4tDX2QIVHLXACH13cgHeEAQYASABEgJ_2_D_BwE (citováno 17.4.2018)
- [37] Vieste Zelená káva Premium, citováno z: https://www.benu.cz/vieste-zelena-kava-prem-s-l-karnit-a-vlak-cps-100?aw=1&gclid=EAlaIQobChMI8-m6ldLX2QIV27rACH1r7QHAEAQYASABEgJDAvD_BwE (citováno 17.4.2018)
- [38] Topvet, Zelená káva bylinný extrakt, citováno z: https://www.pilulka.cz/topvet-zelena-kava-bylinny-extrakt-tob-60?x=g&gclid=EAlaIQobChMI7qif_dHX2QIV1LbACH0B-wAuEAQYASABEgL30PD_BwE (citováno 17.4.2018)
- [39] VITO LIFE, Zelená káva, citováno z: https://www.doplanky.stravy.cz/vito-life-zelena-kava-100-tobolek.html?utm_source=cz_google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Deto xikaci+a+antioxidanty&utm_term=VITO+LIFE+-+Zelena+kava+100+tobolek&gclid=EAlaIQobChMIk-6zrtLX2QIVRrbACH23Og4UEAQYASABEgKarFD_BwE (citováno 17.4.2018)
- [40] VITO LIFE Kyselina chlorogenová, citováno z: <https://www.vitolife.eu/doplanky-stravy/vito-life-kyselina-chlorogenova-100-tbl/> (citováno 17.4.2018)
- [41] ICH, November, ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005 (Retrieved 05 May 2017). Available from: <http://www.ich.org/>.
- [42] A.L. Dawidowicz, R. Tyspek, The influence of pH on the thermal stability of 5-O-caffeoylquinic acids in aqueous solutions, *Eur. Food Res. Technol.* 233(2011) 223–232.

9 Seznam obrázků a tabulek

9.1 Obrázky

Obrázek 1: Molekulární struktura tří sloučenin isochlorogenových kyselin: A – kyselina neochlorogenová, B - kyselina kryptochlorogenová, C – kyselina chlorogenová [12].....	11
Obrázek 2: UltiMate™ 3000 RSLCnano Systém [33].	14
Obrázek 3: Typy core-shell částic. A – jádro jako jednotná částice, B- jádro jako shluk několika menších částic, C – plášť typu „dutá skořápka s malou kouolí uvnitř“, A-C – plášť jako souvislá vrstva, D, E – plášť jako menší částice připevněny na velkou částici jádra nebo s agregovanými částicemi jádra na schématu F, G- inkorporace menších částic do pláště, H – více vrstev pláště, I – znázornění core-shell částice ze silikagelu s pevným jádrem a porózním pláštěm [21].....	16
Obrázek 4: Porovnání povrchově porózní částice kolony Ascentis® Expres RP-Amide a celkově porózní částice [22].	17
Obrázek 5: Výroba stacionární fáze s amidovou částí [22].	17
Obrázek 6: Preparáty použité pro účely analýzy [34-40].	23
Obrázek 7: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 15 minut při 30°C na koloně Luna Omega® Polar C18 (150 x 2.1mm; 1.6µm) formou izokratické eluce s mobilní fází o složení 95% mobilní fáze A a 5% mobilní fáze B.....	28
Obrázek 8: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 15 minut při 30°C na koloně Luna Omega® PS C18 (150 x 2.1mm; 1.6µm) formou izokratické eluce s mobilní fází o složení 95% mobilní fáze A a 5% mobilní fáze B, přičemž se píky kyselin kryptochlorogenové a chlorogenové nepodařilo oddělit.	29
Obrázek 9: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 15 minut při 30°C na koloně Kinetex® F5 (150 x 2.1mm; 1.7µm) formou izokratické eluce s mobilní fází o složení 95% mobilní fáze A a 5% mobilní fáze B, přičemž se píky kyselin kryptochlorogenové a chlorogenové nepodařilo oddělit.	30
Obrázek 10: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 15 minut při 30°C na koloně Ascentis® Express ES-Cyano (100 x 2.1mm; 3µm) formou izokratické eluce s mobilní fází o složení 95% mobilní fáze A a 5% mobilní fáze B, přičemž se píky kyselin kryptochlorogenové a chlorogenové nepodařilo oddělit.	31
Obrázek 11: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 15 minut při 30°C na koloně Ascentis® Express RP-Amide (100 x 2.1mm; 2.7µm) formou izokratické eluce s mobilní fází o složení 95% mobilní fáze A a 5% mobilní fáze B.	32
Obrázek 12: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 12 minut na koloně Luna Omega Polar C18 (150 x 2.1mm; 1.6µm) o teplotě 30°C gradientovou elucí o průtoku mobilní fáze 0.3 ml/min. Dle záznamu jsou píky kyseliny chlorogenové a kryptochlorogenové nedostatečně odděleny.	33
Obrázek 13: Chromatogram vývoje analytické metody. Separace probíhala 8 minut způsobem gradientové eluce při 30°C na koloně Kinetex® C18 (100 x 2.1mm; 2.6µm) s průtokem mobilní fáze 0.9 ml/min. Píky kyseliny kryptochlorogenové a chlorogenové se dle záznamu nepodařilo oddělit.	34

Obrázek 14: Chromatogram znázorňující vývoj analytické metody. Separace probíhala 8 minut způsobem gradientové eluce při 30°C na koloně Ascentis® Express RP-Amide (100 x 2.1mm; 2.7µm) o průtoku mobilní fáze 0.9 ml/min.	35
Obrázek 15: Porovnání separace kyselin na třech různých stacionárních fázích (Ascentis Express RP-Amide (100 x 2.1mm; 2.7µm), Kinetex C18 (100 x 2.1mm; 2.6µm), Luna Omega Polar C18 (150 x 2.1mm; 1.6µm)) za optimálních chromatografických podmínek a při použité mobilní fáze A, kterou představoval 2%-ní vodný roztok kyseliny mravenčí.	38
Obrázek 16: Porovnání rozlišení píků všech analyzovaných kyselin na třech různých stacionárních fázích (Ascentis Express RP-Amide (100 x 2.1mm; 2.7µm), Kinetex C18 (100 x 2.1mm; 2.6µm) a Luna Omega Polar C18 (150 x 2.1mm; 1.6µm)) za optimálních chromatografických podmínek pro každou kolonu a při použití různé síly mobilní fáze A (=0,5; 2 a 5%-ní vodný roztok kyseliny mravenčí).	39
Obrázek 17: Reprezentativní chromatogram standardů isochlorogenových kyselin, který znázorňuje jejich separaci na core-shell koloně Ascentis® Express RP-Amide (100 x 2.1mm; 2.7µm) při teplotě 30°C a průtoku mobilní fáze 0,9 ml/min, která sestávala z acetonitrilu a 5%-ního vodného roztoku kyseliny mravenčí. Záznam byl detekován při 325 nm.	43
Obrázek 18: Překryv chromatogramů skutečného vzorku s přidavkem standardu 1,3-di-CQA (A) a slepého nástřiku (B).	44
Obrázek 19: Přípravek Kilostop – chromatogram stanovení kyseliny chlorogenové, kryprochlorogenové, neochlorogenové a 3,5-disubstituované kyseliny chlorogenové, pozorováno při validovaných podmínkách.	51
Obrázek 20: Přípravek Zelená káva Premium – chromatogram stanovení tří isochlorogenových kyselin při validovaných podmínkách.	52
Obrázek 21: Přípravek Zelená káva – bylinný extrakt. Chromatogram stanovení isochlorogenových kyselin a 3,5-disubst. derivátu kys. chlorogenové, které bylo provedeno za validovaných podmínek.	53
Obrázek 22: Přípravek Vitolife kyselina chlorogenová – chromatogram stanovení isochlorogenových kyselin a 3,5-disubstituované chlorogenové kyseliny při validovaných podmínkách.	54
Obrázek 23: Přípravek Vitolife zelená káva – chromatogram stanovení isochlorogenových kyselin a 3,5-disubstituované kyseliny chlorogenové při validovaných podmínkách.	55
Obrázek 24: Přípravek Zelená káva max – chromatogram stanovení isochlorogenových kyselin a 3,5-disubstituované chlorogenové kyseliny při validovaných podmínkách.	56

9.2 Tabulky

<i>Tabulka 1: Výhody a nevýhody UHPLC systému [32].</i>	14
<i>Tabulka 2: Přehled dřívějších studií a podmínek separace chlorogenových kyselin.</i>	19
<i>Tabulka 3: Chromatografický systém Dionex.</i>	20
<i>Tabulka 4: Testované kolony.</i>	20
<i>Tabulka 5: Údaje o použitých doplňcích stravy.</i>	22
<i>Tabulka 6: Složení mobilní fáze v průběhu analýzy (gradientová eluce).</i>	25
<i>Tabulka 7: Podmínky vývoje chromatografické metody pro analýzu isochlorogenových kyselin.</i>	27
<i>Tabulka 8: Finální podmínky analýzy</i>	42
<i>Tabulka 9: Výsledky testu vhodnosti systému</i>	45
<i>Tabulka 10: Analytické parametry vyvinuté metody (kalibrace standardu, regresní koeficienty, limity detekce a kvantifikace).</i>	46
<i>Tabulka 11: Správnost (recovery) a přesnost vyvinuté UHPLC metody.</i>	47
<i>Tabulka 12: Robustnost validované UHPLC metody a stabilita vzorků.</i>	48
<i>Tabulka 13: Stanovení isochlorogenových kyselin a disubstituovaných derivátů v preparátech vybraných nutraceutik, obsahujících extrakt zelené kávy.</i>	50