

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**Charakterizace obsahu vybraných polyfenolových
sekundárních metabolitů v brokolici metodou HPLC/MS**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Vítězslav Branda

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

OLOMOUC 2012

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v této práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry Analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Nejprve bych chtěl poděkovat svému vedoucímu Petrovi Fryčákovi za cenné rady a pomoc při vypracování této práce a za čas, který věnoval jejím opravám.

Poděkování si dále zaslouží každý, kdo mi jakkoliv v laboratoři či kdekoliv jinde při vypracování pomohl.

Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit jednoduchou metodu pro identifikaci a stanovení vybraných sekundárních metabolitů ze skupiny polyfenolů v rostlinném materiálu. Součástí práce byla příprava vzorku včetně přečištění a zakoncentrování na SPE kolonce a hydrolýza přítomných glykosidů.

Identifikace látek byla založena na základě stanovení přesné hmoty pomocí hmotnostního spektrometru s ionizací elektrosprejem a hybridním analyzátozem Q-ToF a srovnání s teoretickou hodnotou. V případě vybraných látek byly sloučeniny fragmentovány a poté byla navržena fragmentační schémata.

Pro kvantifikaci byla využita metoda hmotnostní spektrometrie. Dva nejrozšířenější flavonoly - kaempferol a quercetin - byly stanoveny v různě tepelně upravených vzorcích brokolice jak v jejich volné formě, tak i po hydrolýze jejich glykosidů. Ve volné formě byl stanoven pouze obsah kaempferolu 702 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ vzorku čerstvé brokolice. Flavonoly kaempferol a quercetin jsou ve vysoké míře v rostlinném materiálu vázány jako glykosidy a tak byla provedena hydrolýza pro jejich uvolnění a následné stanovení s těmito výsledky:

Obsah kaempferolu byl ve vzorku čerstvé brokolice 6,65 $\text{mg}/100\text{ g}$, po uvaření jak ve vodě, tak i v páře jeho obsah klesal. Detekován a kvantifikován byl ale také i ve vývaru po dané tepelné úpravě.

Obsah quercetinu byl ve vzorku čerstvé brokolice 2,58 $\text{mg}/100\text{ g}$ a po tepelné úpravě jeho množství klesalo podobně jako v případě kaempferolu.

Na závěr byla také stanovena antioxidační kapacita všech pěti vzorků s výsledky, že nejvyšší se vyskytuje ve vzorku čerstvé brokolice a to v přepočtu 5,43 $\text{mmol Fe}^{2+}/100\text{ g}$, zatímco po tepelné úpravě klesá až pod 1,00 $\text{mmol Fe}^{2+}/100\text{ g}$. Tyto výsledky korelují s výsledky stanovení kaempferolu a quercetinu po hydrolýze.

Summary

The aim of this diploma thesis was to create a simple and rapid method for identification and determination of secondary metabolites from the group of polyphenolics in plant material. Part of this work was also the sample preparation including solid-phase extraction and hydrolysis of present glycosides.

The identification of compounds was based on the determination of accurate mass by mass spectrometer with ESI and hybrid analyser Q-ToF and the comparison with a theoretical mass. Some of the compounds were fragmented and fragmentation spectra were proposed.

Two most common flavonols - kaempferol and quercetine - were determined in fresh broccoli and after boiling and steaming. These two compounds are available in this plant material as free aglycones and also as glycosides. That is why the acidic hydrolysis was performed.

Free aglycone of kaempferol was determined with this result: the amount of kaempferol in a fresh broccoli was 702 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, quercetin was under the limit of quantification. In a sample of boiled and steamed broccoli, the amount of these compounds was under the limit of quantification as well.

After hydrolysis, the amount was 6.65 mg/100 g of kaempferol and 2.58 mg/100 g of quercetine in a sample of fresh broccoli. After cooking the amount decreased in cases of both compounds.

In the end, an independent study for antioxidant capacity was performed using FRAP assay. The results showed the same trend of a significant decrease after boiling in water and in steam. The results in fresh broccoli was 5.43 mmol $\text{Fe}^{2+}/100\text{ g}$ and after boiling the amount is decreasing even under 1.00 mmol $\text{Fe}^{2+}/100\text{ g}$.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1. Polyfenolické látky	2
2.1.1. Kategorizace polyfenolických látek	3
2.2. Antioxidační kapacita.....	8
2.3. Instrumentace.....	8
2.3.1. Kapalinová chromatografie	8
2.3.2. Ultra účinná kapalinová chromatografie UHPLC	10
2.3.3. Hmotnostní spektrometrie	11
2.3.4. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.....	15
2.4. Aplikace LC-MS při studiu fenolických látek.....	16
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1. Instrumentace.....	26
3.2. Chemikálie.....	26
3.3. Metoda	27
3.4. Pracovní postup	27
3.5. Použité programové vybavení	29
4. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	29
4.1. Vývoj metody pro identifikaci polyfenolových látek v extraktu brokolice.....	29
4.2. Stanovení quercetinu a kaempferolu v extraktech brokolice.....	40
5. ZÁVĚR.....	49
6. LITERATURA	50
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57

1. ÚVOD

Pro separaci a detekci nízkomolekulárních látek je vhodným řešením spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Je to často volená technika při analýze biologického materiálu a proto je tato metoda také v případě této diplomové práce použita na identifikování a stanovení několika flavonoidů z rozsáhlé skupiny polyfenolů.

Polyfenoly jsou přírodní sekundární metabolity prospěšné lidskému organismu především svými antioxidačními vlastnostmi. Díky potřebám identifikování a stanovení těchto látek v potravě se vyvíjí mnoho analytických metod včetně spojení LC/MS. V případě této diplomové práce byla jako rostlinný materiál zvolena brokolice, která je běžnou součástí stravy ve střední Evropě a bohatým zdrojem polyfenolů.

Experimentální část této práce je rozdělena na identifikační a kvantifikační. Nejprve byly charakterizovány látky v rostlinném vzorku na základě stanovení přesné hmoty pomocí hmotnostního spektrometru s ionizací elektrosprejem a hybridním analyzátozem Q-ToF a srovnání s přesnou hmotou dle jejího sumárního vzorce. Několik vybraných látek bylo poté fragmentováno pro potvrzení jejich struktury.

Druhá část se týká kvantifikace dvou flavonolů - kaempferolu a quercetinu. Tyto látky se v rostlinném materiálu vyskytují jak volné, tak s navázanými glykosidy. Ve vzorcích brokolice, která byla různě tepelně upravována, byly stanovovány jak obsahy volných flavonolů, tak i množství kaempferolu a quercetinu uvolněných po hydrolýze z glykosidů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Polyfenolické látky

Polyfenoly patří do velké skupiny chemických sloučenin nazývané fenolické látky. Mezi polyfenoly se řadí více než 8000 látek s fenolickou strukturou, které obsahují jednu nebo více fenolových jednotek a zároveň minimálně alespoň jednu a více navázaných hydroxy skupin.¹ Mohou to být látky s malou molekulovou hmotností, např. fenolické kyseliny, ale také vysokomolekulární komplexní polymery. V přírodě se v přirozené formě nejčastěji vyskytují jako konjugáty mono- až poly-sacharidů.¹ Polyfenolické látky mají vliv na barevnost a chuť ovoce či zeleniny a z tohoto důvodu jsou také často jejich koncentrace sledovány.²

Jsou to přírodní sekundární metabolity a hrají důležitou roli v růstu a reprodukci rostlin, především jako ochranné prostředky před patogeny. Jejich prospěšnost pro lidské zdraví není založena jen na jejich antioxidačních vlastnostech, ale také snižují riziko kardiovaskulárních nemocí a mají antialergení a antimikrobiální účinky.³ Polyfenoly jsou redukční činidla (tzn. donory vodíku) a v lidském těle mají tři hlavní antioxidační účinky: chelatace iontů kovů přes své dihydroxyfenolické struktury, zachycování a neutralizování reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) a regenerace α -tokoferolu redukcí jeho α -tokoferoxylového radikálu.⁴

Nejdůležitější funkcí je zachycování ROS, čímž pozitivně narušují oxidaci lipidů. Konkrétně se jedná o alkoxylové (RO^*) a peroxylové (ROO^*) radikály. Ty reagují s polyfenoly (PP, polyphenolics) za vzniku fenolického radikálu, který je stabilnější a další řetězová reakce není pravděpodobná, viz. rovnice 1) a 2).⁴ Poté se ještě tento radikál může účastnit terminačního kroku radikálové reakce, opět s alkoxylovým či peroxylovým radikálem za vzniku stabilní sloučeniny, viz. rovnice 3) a 4).²



Nerovnováha mezi ROS a antioxidanty způsobuje oxidační stres, který je příčinou mnoha patogenních procesů, jako například rakovina nebo různé neurodegenerativní choroby - Parkinsonova a Alzheimerova nemoc.² Jako příklad ROS lze uvést volné radikály: superoxid (O_2^-), hydroxylový radikál (OH^\cdot) a hydroperoxyl (HO_2^\cdot) nebo látky, které nejsou volnými radikály - např. peroxid vodíku (H_2O_2).

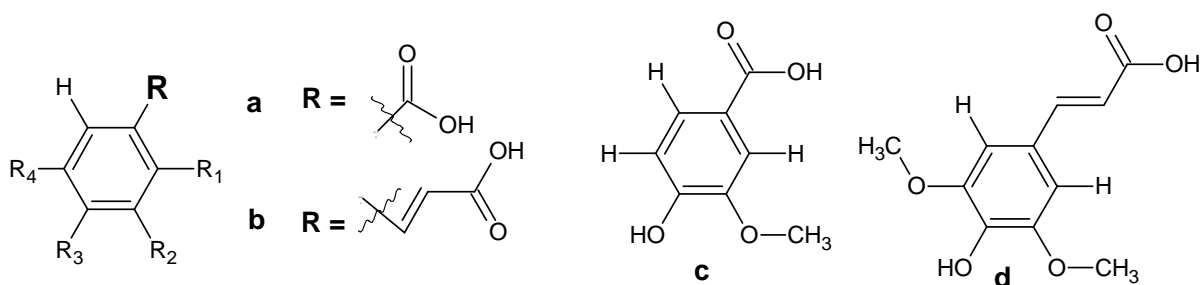
2.1.1. Kategorizace polyfenolických látek

Polyfenoly mohou být rozděleny do několika skupin podle více parametrů. Mohou se dělit do kategorií podle počtu uhlíků a aromatických cyklů a také dle spojení těchto cyklů.^{1,3} Dále jsou rozděleny podle samotného aglykonu, tzn. necukerné složky polyfenolu.

První skupinou jsou jednoduché fenolické kyseliny. Prospěšné pro lidský organismus jsou hlavně svými antioxidačními vlastnostmi.⁵

Mohou se dělit na deriváty kyseliny benzoové s uhlíkovou kostrou C6-C1 a kyseliny skořicové s uhlíkovou kostrou C6-C3. Kyselina benzoová obsahuje 6 uhlíků aromatického kruhu a 1 uhlík karboxylové skupiny. Jejími deriváty jsou např. kyselina vanilová, která má v pozici R_2 navázanou methoxy skupinu a v pozici R_3 hydroxy skupinu, jak lze vidět na obrázku 1. Dalšími příklady jsou kyselina salicylová či gallová.⁵

Kyselina skořicová má karboxylovou skupinu od aromatického jádra oddělenou dvěma uhlíky dvojně vazby. Příkladem derivátu je např. kyselina sinapová s dalšími dvěma methoxy skupinami a jednou hydroxy skupinou na fenolickém jádru, viz. obrázek 1. Dalšími jsou např. kyselina chlorogenová či kávová.⁵



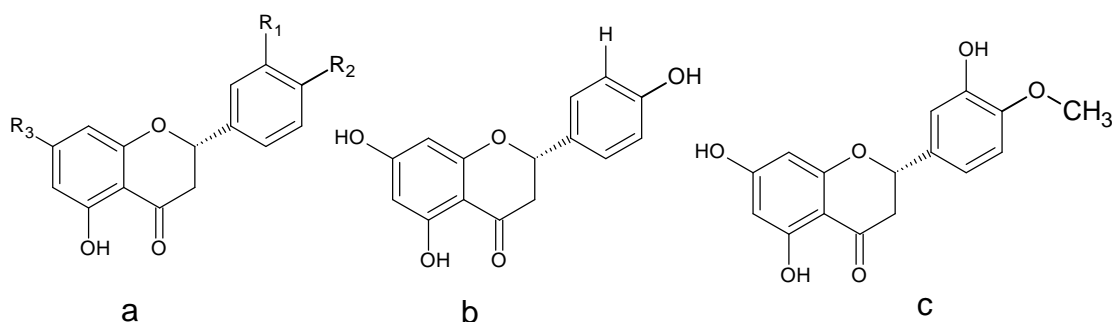
Obrázek 1: Obecná struktura fenolické kyseliny, a) kyselina benzoová, b) kyselina skořicová, c) kyselina vanilová a d) kyselina sinapová.

Právě kyselina kávová, hydroxyskořicová, vanilová, ferulová a protokatechuová se nacházejí ve většině rostlin, zatímco další se vyskytují pouze v určitých druzích.⁵

Dvě primární kyseliny, benzoová a skořicová, jsou syntetizovány z aromatické aminokyseliny L-fenylalaninu, která je produktem šikimátové cesty.⁶ Konverze fenylalaninu na hydroxykyselinu probíhá tříkrokově jako metabolismus fenylpropanoidů.⁵

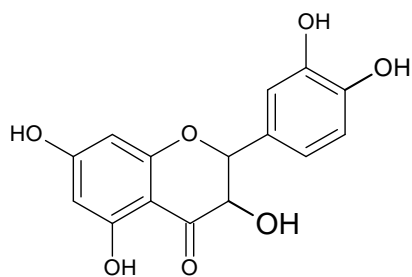
Druhou skupinou jsou flavonoidy. Jejich struktura se skládá ze dvou fenolických cyklů nejčastěji spojených tříuhlíkatým heterocyklem, jak je vidět na obrázku 2 na příkladu flavanonu. Právě toto spojení dále rozděluje flavonoidy na flavanony, flavanonoly, izoflavony, flavonoly, flavony, flavanoly a anthokyanidiny.² Dalším prvkem rozlišujícím flavonoidy jsou substituce na hydroxy skupinách na fenolických cyklech, např. alkylace, acylace, sulfonace nebo glykosylace.⁷

První ze skupiny flavonoidů jsou flavanony. Jejich příkladem je hesperetin, naringenin, taxifolin, eriocitrin či pinocembrin. Jsou to látky, které se primárně vyskytují v citrusech.⁸ Například látky naringenin a neohesperidin jsou zodpovědné za hořkost grapefruitů, hesperetin se vyskytuje v pomerančích a eriodictyol v citronech.⁷



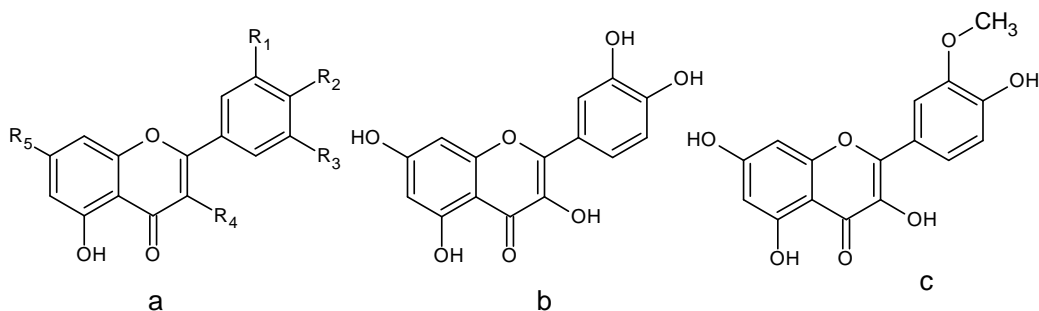
Obrázek 2: a) Obecná struktura flavanonu, b) naringenin a c) hesperetin.

V citrusových plodech se také vyskytují látky, které patří do skupiny flavanonolů. Zástupcem je polyfenol taxifolin.⁹



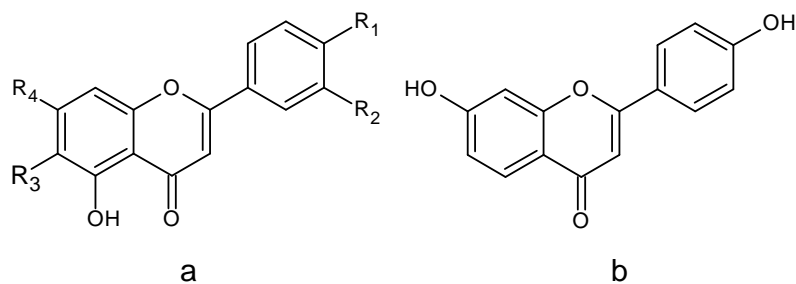
Obrázek 3: Taxifolin

Mezi nejvýznamější flavonoly patří quercetin a kaempferol, které jsou silnými antioxidanty. Nejdůležitější pozitivní vlastností quercetinu je jeho schopnost inhibovat oxidaci LDL (low-density lipoprotein).² Dalšími zástupci této skupiny jsou například astragalín, isorhamnetin, myricetin či rutin.



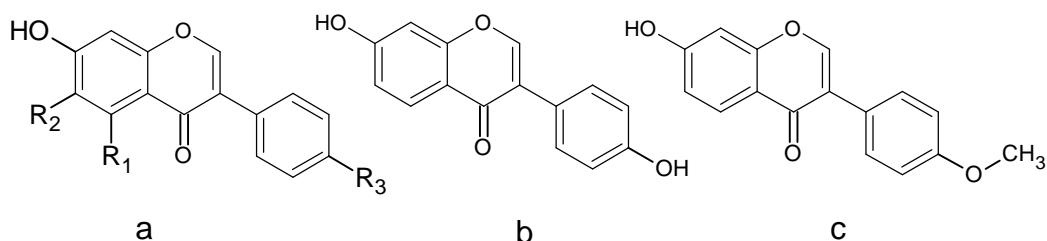
Obrázek 4: a) Obecná struktura flavonolu, b) quercetin a c) isorhamnetin.

Další skupinou flavonoidů jsou flavony. Příkladem je např. apigenin, tangeretin či luteolin. Od flavonolů se liší tím, že na pozici 3 chybí hydroxylová skupina.⁸ Flavony se nejčastěji vyskytují v ovoci i zelenině společně s flavonoly.⁸



Obrázek 5: a) Obecná struktura flavonu, b) apigenin.

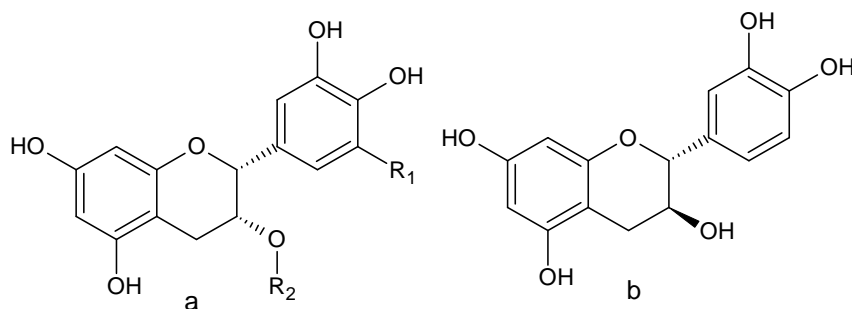
Izoflavony jsou látky, které patří do mezi fytoestrogeny. V největší míře se nacházejí v luštěninách, konkrétně v sojových plodech.¹⁰ Zástupci této skupiny jsou daidzein, formononetin či genistein.



Obrázek 6: a) Obecná struktura izoflavonu, b) daidzein a c) formononetin.

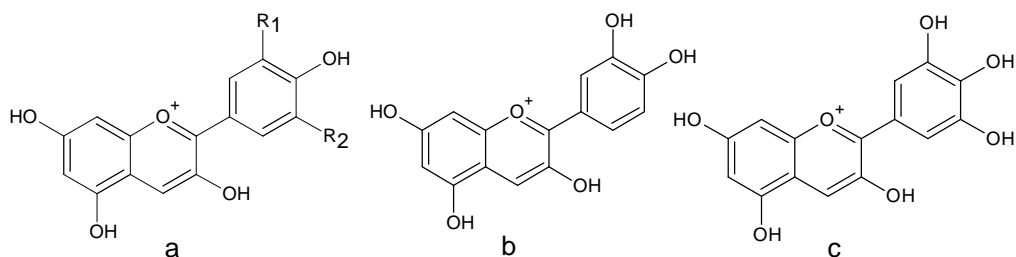
Dále lze mezi flavonoidy také zařadit flavanoly.¹ Příkladem je látka nazývaná katechin, od které je odvozeno mnoho derivátů, především estery a optické izomery díky dvěma chirálním centřům.

Monomerní flavanoly jsou nejčastějšími flavonoidy v čajových lístcích a kakaových bobech.² Dále mohou katechin a epikatechin dohromady tvořit polymerické struktury, které se se obecně nazývají tanniny, další látky z řady silných antioxidantů.⁷



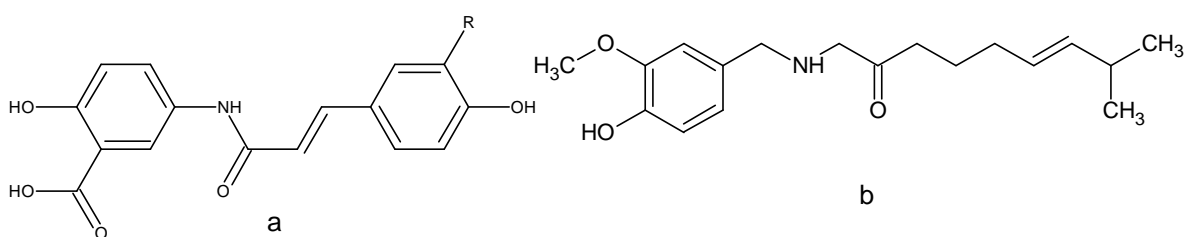
Obrázek 7: a) Obecná struktura (-)- epikatechinu, b) (+)- katechin.

Další skupinou flavonoidů jsou antokyanidiny. Ve formě glykosidů a acylglykosidů to jsou červeno-fialová barviva zvaná antokyaniny, kterých je přes 500 druhů. Liší se různou methoxylací a hydroxylací na fenolických cyklech.¹⁰ 90 % antokyaninů je spojováno se třemi základními antokyanidiny a jejich methylovanými deriváty: kyanidinem, delphinidinem a pelargonidinem.⁷



Obrázek 8: a) Obecná struktura anthokyanidinu, b) kyanidin a c) delphinidin.

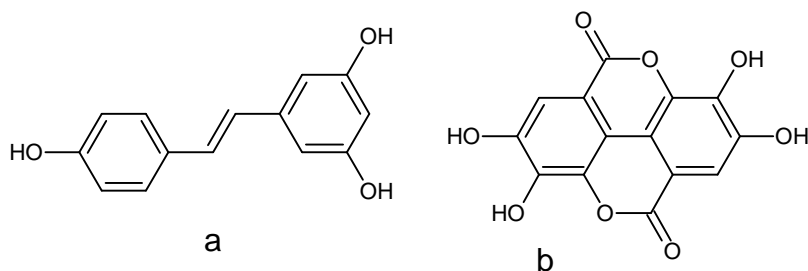
Mezi další polyfenoly mohou být zahrnuty fenolické látky, které obsahují atom dusíku jako funkční substituent, polyfenolické amidy. Nejvýznamějšími zástupci jsou kapsaicinoidy a avenanthramidy. Látka kapsaicin je silný antioxidant zodpovědný za pálivost chilli papriček a avenanthramid zvyšuje inhibici oxidace LDL.¹



Obrázek 9: a) Obecná struktura avenanthramidů, b) kapsaicin.

Existuje také mnoho neflavonoidních polyfenolických látek, které se nedají zařadit do žádné z předchozích skupin. Jsou to například tanniny, což jsou dimery fenolických kyselin: kyselina ellagová jako dimer kyseliny gallové.

Další známou látkou z této skupiny je resveratrol, který patří mezi stilbeny a nachází se ve vysokých koncentracích v hroznovém víně a jeho produktech či jahodách.¹



Obrázek 10: a) Resveratrol, b) kyselina ellagová

2.2. Antioxidační kapacita

Polyfenolické látky jsou prospěšné lidskému organismu především svými antioxidačními vlastnostmi. Tento účinek lze obecně charakterizovat a stanovit jako antioxidační kapacita, která se dá měřit několika způsoby.³⁹

První možností je reakcí se stabilními volnými radikály jako např. galvinoxyl či 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH). Celková kapacita je ovlivněna stechiometrií molekuly radikálu i antioxidantu. Následně se ke stanovení úbytku počtu volných radikálů používá UV/Vis spektrofotometrie díky absorpci světla radikály ve viditelné oblasti.³⁹

Dalším stanovením antioxidační kapacity je obecná kompetitivní metoda, kam patří například ORAC stanovení (oxygen radical absorbance capacity).³⁹ Obecným principem kompetitivní metody je využití standardu, jehož úbytek se v přítomnosti či absenci antioxidantu stanovuje. V případě metody ORAC se využívá ztráty fluorescence činidla (např. fluorescein či phycoerythrin) při přítomnosti antioxidantu.³⁹

Jinou variantou stanovení antioxidační kapacity je měření množství zredukovaných kovových iontů - konkrétně metoda FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) s železitými případně metoda CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Power) s měďnatými ionty. Princip metody FRAP je založen na reakci zredukovaných železnatých iontů s činidlem tripyridyltriazinem při kyselém pH za vzniku barevného komplexu, který je následně stanoven UV/Vis spektrofotometrií.⁴⁰

2.3. Instrumentace

2.3.1. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je nejstarší známá chromatografická technika vynalezena Michaiem Cvetem. Původním uspořádáním byla především papírová chromatografie (PC, paper chromatography) a následně tenkovrstvá (TLC, thin layer chromatography).¹¹ Jejich princip je podobný, rozlišují se pouze stacionární fází (SF, stationary phase), kdy u PC je to celulóza a u TLC např. oxid hlinitý nebo silikagel. Poté vznikla kolonová LC (liquid chromatography), kdy principem separace byly interakce se stacionární fází a hnací silou byla gravitace. Až v 70. letech 20. století vznikla

vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, high-performance liquid chromatography). Její základ byl v plynové chromatografii (GC, gas chromatography), od které se liší velkými pracovními tlaky a interakcemi s mobilní fází. Samozřejmě jsou i rozdíly v detekci či další instrumentaci.

Nejjednodušší HPLC sestava se skládá ze zásobníků mobilní fáze (MF, mobile phase), čerpadla MF, nástřikového zařízení, kolony a detektoru.¹¹ Nejdůležitější částí celého systému je čerpadlo mobilní fáze. Ty se dělí na dva druhy: čerpadla na principu velkoobjemové stříkačky; které se používají pro kapilární kolony, mají bezpulzní režim, ale je tu zdlohavější výměna a promývání mobilní fáze; a čerpadla s malým objemem činné části, které obsahují dva zpětné ventily a používají se například pro náplňové kolony.

Mobilní fáze může být mísená z několika čerpaných rozpouštědel (nejčastěji dvě až tři) ve směšovací komoře. Tato mobilní fáze následně eluuje analyty z kolony. Eluce může být izokratická, kdy se složení MF nemění, a nebo gradientová, např. binární, ternární či kvartérní dle počtu složek. Následuje dávkování vzorku a u HPLC jsou dvě možnosti. První je manuálně přesnou stříkačkou pomocí šesticestného ventilu se smyčkou nebo vnitřním prostorem. Druhou možností dávkování jsou automatické autoinjektory.

V minulosti byla průměrná kolona pro HPLC systém náplňová s délkou jednotek až desítek cm a vnitřním průměrem 4,6 mm s velikostí částic 5 μm .¹² V současnosti se velikost částic snižuje na 2 až 3 μm . Lze se také setkat s monolitickými kolonami vyplněnými porézními polymery. Systémy v HPLC jsou dva hlavní – separace na polárních fázích (NP, normal phase) a separace na nepolárních chemicky vázaných fázích (RP, reverse phase) – a několik dalších jako například chromatografie na měničích iontů, chromatografie iontových párů, gelová permeační chromatografie či afinitní chromatografie.¹¹

Základním principem NP-LC je adsorpce. MF je méně polární než sorbent a tak analyt soutěží o aktivní místa na povrchu adsorbentu s MF. Retence je pak výsledkem rozdílu interakcí analytu s adsorbentem a MF s adsorbentem, což jsou především interakce dipól-dipól.¹³ Díky tomu je tento druh chromatografie vhodný pro separaci izomerů či látek s více funkčními skupinami, naopak vůbec neseperuje homologické řady, např. alkany.

Chromatografie na reverzních fázích (RP-LC) využívá silné polární mobilní fáze a nepolární fáze stacionární, např. silikagelu s C8 či C18 fázemi. Hnacím mechanismem

retence jsou hydrofobní interakce mezi molekulami vody v MF a analytem. To lze popsat dvěma ději a to rozdělováním a adsorpcí.^{14,15} Rozdělování závisí na chemické afinitě analytu k mobilní či stacionární fázi. Analyt může být ovšem ještě minoritně adsorbován na zbytkový povrch stacionární fáze a tím negativně přispět k retenci. Tento druh kapalinové chromatografie je v současnosti jedním z nejvíce využívaným a je výhodný pro separaci homologů.

Detektory kapalinové chromatografie mohou být rozděleny dle několika vlastností, např. destruktivní či nedestruktivní nebo selektivní či univerzální.¹¹ Mezi nejrozšířenější detektory patří spektrofotometrické. Jedinou podmínkou je zde nutnost absorpce záření. Selektivním a velmi citlivým detektorem je fluorimetrický s podmínkou vykazování fluorescence. V opačném případě je ještě možnost derivatizace dodáním fluoroforu do vzorku. Velmi citlivými selektivními detektory jsou elektrochemické, kde se měří změna proudu při průchodu elektroaktivní látky. Podmínkou je vodivá mobilní fáze a dělí se dále na amperometrické a coulometrické.

Jeden ze základních univerzálních detektorů je refraktometrický.¹¹ Jeho výhodou je jeho široké spektrum využití, ovšem nelze použít s gradientem MF. Principem je zde rozdíl indexu lomu světla mobilní fáze a analytu, každého v jiné měrné cele. Dalším je vodivostní detektor, kdy je intenzita signálu dána elektrickou vodivostí mezi dvěma elektrodami. Podobným je bezkontaktní vodivostní detektor, kde se používá vysokofrekvenční střídavé napětí.

Další možnosti detekce pro kapalinovou chromatografii je například detektor rozptylu světla s odpařením mobilní fáze (ELSD, evaporative light scattering detector), aerosolový detektor nabitých částic (CAD, charged aerosol detector) nebo radiometrický či detektor optické otáčivosti. Je zde také možnost kombinace s různými spektrometrickými metodami, jako např. atomová absorpční či emisní spektroskopie nebo hmotnostní spektrometrie.

2.3.2. Ultra účinná kapalinová chromatografie UHPLC

Cílem chromatografické separace je co nejrychlejší a nejefektivnější dělení látek. Dalším krokem pro zvýšení účinnosti kolon a zkrácení analýzy bylo zmenšení velikosti

částic SF pod 2 μm . To ale vedlo ke zvýšení operačního tlaku a tak nemohly být využívány klasické HPLC sestavy.¹⁶

Jednou možností, jak tomuto předejít je princip kapalinové elektrochromatografie (CEC, capillary electrochromatography), kdy je průtok kolonou je zprostředkováván elektroosmózou.¹⁶ Druhou cestou je vývoj pump, ventilů a kolon, které pracují s tlaky vyššími než 400 bar, které jsou maximem u běžné HPLC sestavy.¹⁷ Pro tento účel byla vyvinuta současná ultra účinná kapalinová chromatografie (UHPLC, ultrahigh pressure liquid chromatography), která využívá částice stacionární fáze s velikostí pod 2 μm a operační tlaky až 1000 bar.¹⁸

2.3.3. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda s neobvykle širokým polem působnosti - od rozboru potravin až po hledání života na Marsu.^{19,20} Díky svým vynikajícím vlastnostem, např. rychlosti a velmi nízkým limitům detekce, se i v jedenadvacátém století řadí mezi přední fyzikálně-chemické metody.

Joseph John Thomson představil svůj první hmotnostní spektrometr v roce 1912. Blokové schéma typu – vzorek – zdroj iontů – analyzátor – detektor – zpracování dat - je ale stále stejné. Zavádění vzorku může být buď přímé a nebo z různých analytických separačních metod. Například z chromatografie – kapalinové či plynové. Mezi další možnosti může patřit kapilární elektroforéza (CE, capillary electrophoresis) či průtoková injekční analýza (FIA, flow injection analysis).

2.3.3.1. Ionizace

Ionizační techniky se dělí podle množství energie dodávané analytu při ionizaci na tvrdé a měkké.²¹ Do první kategorie patří ionizace elektronem (EI, electron ionization). Obecným principem je, že molekuly vzorku jsou vystaveny proudu energetických elektronů (70 eV), které z molekul v plynné fázi vytváří molekulové ionty či fragmenty. V případě EI vzniká nejčastěji kation radikál M^+ odtržením elektronu z molekuly analytu. Tato technika se používá v GC-MS a poskytuje vysoké fragmentace analytu.^{22,23}

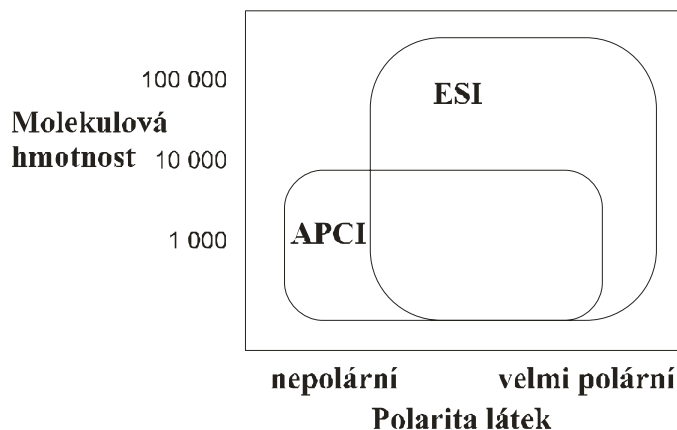
Mezi další ionizační techniky se řadí chemická ionizace (CI, chemical ionization). Dodává analytům menší energii a tak je oproti EI relativně měkčí ionizační metodou.

Narozdíl od EI dodává také informaci o molekulovém píku.²¹ Jako reakční plyn se nejčastěji používá methan či isobutan.

Měkkou ionizační technou je ionizace elektrosprejem (ESI, electrospray ionization), což je druh ionizace za atmosférického tlaku (API, atmospheric pressure ionization). Tato ionizační technika je vedle malých organických molekul výhodná i pro vysokomolekulární látky, např. proteiny díky jejich vícenásobnému nabití. Elektrosprej samotný je vytvořen díky silnému elektrostatickému poli v oblasti mezi sprejovací kapilárou a protiležící elektrodou. Na konci kapiláry se v důsledku elektrochemické reakce tvoří náboj, který je dodán kapce, která se protahuje se zvyšováním napětím a jakmile je překročena síla povrchového napětí, mění svůj polokulovitý tvar na tzv. Taylorův kužel, z kterého jsou dále uvolňovány menší kapky. Ty se mohou dále rozdělovat na více menších v důsledku odpařování rozpouštědla; nabitý molekulový ion se pak uvolňuje z povrchu kapky. Ovšem v případě látek s velkou molekulovou hmotností nenastává desorpce, nýbrž uvolnění iontu díky vypařování rozpouštědla, které probíhá už od vzniku samotné kapky.^{21,24,25}

Další druh ionizace je chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, atmospheric pressure chemical ionization), měkká ionizační technika. Analyt je veden přímo do zmlžovače a poté jsou kapky zahřáty na teplotu, kdy nastává odpařování rozpouštědla a vzorku v proudu plynu. Další krok je ionizace, která nastává v koronárním výboji. APCI se používá spíše pro středně polární až méně polární látky a s elektrosprejem se navzájem doplňují.

Pro obě ionizační techniky za atmosférického tlaku platí, že při pozitivní ionizaci nastává nejčastěji přijetí protonu za vzniku $[M+H]^+$. V negativním módu je z molekuly analytu proton odstraněn a vzniká $[M-H]^-$.^{21,26,27}



Obrázek 11: Volba ionizační techniky za atmosférického tlaku v závislosti na polaritě látky a její molekulové hmotnosti.

Další ionizační techniky jsou například bombardování urychlenými atomy či ionty (FAB/FIB, fast atom/ion bombardment). Nejčastěji se používají prvky argon, xenon či cesium o energii 5 až 10 keV.²¹ Jinou možností je desorpce a ionizace laserem (LDI, laser desorption ionization) nebo desorpce a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI, matrix assisted LDI). Druhá zmíněná se využívá především pro relativně velké molekuly - do 25 až 30 kDa²⁸ - proteiny či peptidy. Další používané ionizační metody jsou ještě např. fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, atmospheric pressure photo ionization) či nanoelektrosprej.

2.3.3.2. Analyzátoři

Jakmile jsou v iontovém zdroji vytvořeny plynné ionty, jsou okamžitě urychleny elektrickým polem do analyzátoru, který jednotlivé ionty odděluje dle jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z).²¹ Každý analyzátor používá odlišný princip separace iontů. Mohou být rozděleny mezi pulsní, kam patří iontová past, průletový analyzátor a iontová cyklotronová rezonance. Druhá skupina se nazývá spojité analyzátoři a patří sem magnetické analyzátoři a kvadrupólové filtry.²¹

První spektrometr vytvořený Thomsonem v roce 1897 měl jako analyzátor magnet, z čehož se vyvinuly moderní sektorové analyzátoři. V elektrickém poli probíhá nejen zrychlení iontů, ale i separace dle jejich kinetických energií. V magnetickém poli jsou ionty separovány podle své hodnoty m/z .²¹

Dalším je kvadrupólový analyzátor. Díky své výhodné ceně, vysoké rychlosti snímání a vysokému počtu iontů přicházejících z ionizátoru na detektor, se řadí mezi nejběžnější analyzátory. Složení tohoto zařízení je ze čtyř elektrodoých tyčí. Zrychlené ionty putující z iontového zdroje jsou zde separovány dynamickým elektrickým polem kvadrupólu podle svých hodnot m/z . Tím pádem může (ve skenovacím módu) v daném okamžiku pouze jedna hodnota m/z přicházet do následného detektoru.²¹

Iontová past je analyzátor, který obecně využívá oscilační elektrické pole k uchování iontů. Existuje 2D lineární iontová past, která byla vyvinuta později a 3D iontová past, někdy nazývána jako třídímenzální iontová past. Ta se skládá z koncové vstupní a výstupní elektrody a prstencové středové elektrody dohromady tvořící kvadrupólové pole. To ionty zachycuje ve svém středu na stálých dráhách. Následně je hmotnostní spektrum získáno díky změnám hodnot napětí a frekvence a uvolnění nejdříve iontů s nižším m/z , které jsou poslány do otvoru elektrody do detektoru. Používá se ještě přídavek helia jako inertního plynu, který má dvě funkce. První je chlazení (snížení energie iontů) a druhou je soustředění iontů uprostřed iontové pasti.^{21,29,30} Vzhledem ke způsobu funkce lze provádět MSⁿ, několikanásobné fragmentování látky.

Průletový analyzátor (TOF, time of flight) ionty separuje podle rychlosti během jejich letu trubící poté, co jsou urychleny rozdílem potenciálů. Poměr hmotnosti ku náboji je zjištěn z času letu ze zdroje iontů do detektoru. Nespornou výhodou TOF je možnost detekovat vysokomolekulární sloučeniny a tak se využívá společně s MALDI k identifikaci látek s molekulovou hmotností přes 30 kDa.^{21,31,32}

Mezi další analyzátory v hmotnostní spektrometrii může být zařazeno například spojení kvadrupólu s průletovým analyzátoem (q-TOF, quadrupole-time of flight). Je to tzv. hybridní analyzátor, kdy první částí je kvadrupól, druhá část je kolizní cela a třetí je průletový analyzátor. Výhodou je schopnost měřit přesnou hodnotu m/z , citlivost v rozsahu celého spektra a také možnost spojení s MALDI ionizací.³³

Mezi nejpresnější analyzátory pro hmotnostní spektrometrii patří tzv. iontová cyklotronová rezonance (ICR, ion cyclotron resonance) nebo orbitrap. ICR se v jednom ze svých uspořádání skládá z dvou trappovacích, dvou excitačních a dvou detekčních desek a supravodivého magnetu kolem nich. Uvnitř je silné magnetické pole, které udrží ionty v tzv. cyklotronovém pohybu. Následně jsou ionty excitovány napěťovým pulsem a detekovány elektrodami.³⁴

Dalším přesným analyzátozem je například orbitrap. Ten se skládá z dvou vnějších elektrod a jedné vnitřní vřetenové elektrody. Stejnoseměrné napětí je aplikováno mezi ně a urychlené ionty ze zdroje cirkulují kolem vnitřní elektrody. Frekvence oscilace iontů je pak úměrná změřenému m/z .³⁵

2.3.3.3. Detektory

Po analyzátoru ionty putují do sekce, kde se nachází detektor. Mezi prvními detektory byla například fotografická deska, která pracovala na principu ztmavení místa, kam dopadl iont. Teď už je však tento druh detektoru zastaralý a nepoužívá se. Dalším podobným je tzv. Faradayův pohárek. Ten využívá jevu, kdy jsou ionty uvnitř detektoru neutralizovány buď přijetím nebo odevzdáním elektronu, což vede k vytvoření proudu, který je následně zesílen a zaznamenán.

Ovšem nejčastějšími současnými detektory, se kterými se setkáme v hmotnostní spektrometrii, jsou zařízení na bázi elektronových násobičů. V nich ionty přicházejí na první konverzní dynodu, ze které vyrážejí elektrony, které později sekundárně na dalších dynodách emitují další elektrony. Ty jsou urychlovány a vedeny elektrickým napětím mezi dynodami na konec elektronásobiče, kde se nachází anoda spolu s konektory.³⁶

2.3.4. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Spojení kapalinové chromatografie (LC, liquid chromatography) a hmotnostní spektrometrie (MS, mass spectrometry) se zpočátku nezdálo být vhodné. MS potřebuje vzorek v plynném stavu a ve vakuu, zatímco LC se používá pro netěkavé sloučeniny, na které není vhodná plynová chromatografie. LC také potřebuje vyšší průtoky než MS, ale to vyřešil buď dělič toku a nebo moderní ionizační techniky, jako např. ESI, APCI či APPI.^{21,37}

V současnosti je spojení LC-MS využíváno díky separačním schopnostem kapalinové chromatografie a citlivé detekci hmotnostní spektrometrie. Další výhodou je možnost strukturní identifikace látek při fragmentačních měřeních MS/MS příp. MSⁿ. Stala se také rutinním nástrojem pro analýzu polárních látek, kdy není potřeba derivatizace, jako v případě plynové chromatografie.³⁸

2.4. Aplikace LC-MS při studiu fenolických látek

Fenolické látky se dají studovat buď jako jednotlivé látky, např. fenolické kyseliny nebo flavonoly, a nebo jako celkový obsah polyfenolů. V druhém případě se využívá Folin-Ciocalteuova metoda. Celkový obsah se zjistí spektrofotometricky po reakci extraktu s Folin-Ciocalteovým činidlem.⁴¹

2.4.1. Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny se v rostlinném materiálu mohou vyskytovat samostatně a nebo vázaně, např. v případě acylovaných hydroxy skupin flavonoidů. Příprava vzorku zahrnuje homogenizaci a extrakci, ve vodě, alkoholu nebo jiném organickém rozpouštědle. Pro uvolnění volných kyselin z esterických vazeb se využívá zásaditá hydrolýza.⁵ Dalším krokem ještě může být frakcionace, nejčastěji s využitím extrakce na pevné fázi (SPE, solid phase extraction). Tímto krokem se mohou oddělit malé fenolické kyseliny od polyfenolických látek s vyšší molekulovou hmotností a nebo od volných cukrů.⁵

Např. při stanovení polyfenolů v mátě, včetně volných fenolických kyselin, příprava vzorku obsahovala rozdrcení vzorku a extrakci v 70 % methanolu v automatickém extraktoru.⁴² Následný extrakt byl odpařen za sníženého tlaku a poté rozpuštěn v deionizované vodě. Vzorek byl frakcionován na SPE kolonce a fenolické látky byly eluovány 40 % methanolem. Identifikace a stanovení látek bylo provedeno na UPLC-MS sestavě na koloně s C18 reverzní fází a MF směsí okyselené vody a okyseleného acetonitrilu. Eluce byla gradientová s celkovým časem 7,5 minuty a průtokem 0,4 ml/min. Hmotnostní spektrometr byl nastaven na ionizaci elektrosprejem v negativním módu.⁴² Fenolické kyseliny zde stanovené byly rozmarýnová a salvianolová s m/z $[M-H]^-$ 358,9 a 717,3. Jejich limit detekce (LOD, limit of detection) a limit kvantifikace (LOQ, limit of quantification) byl v jednotkách ng v 1 g vzorku.⁴²

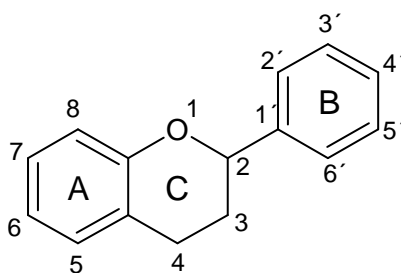
Další metoda pro stanovení fenolických kyselin a jejich aldehydů v potravinových doplncích byla vyvinuta na HPLC-MS sestavě.⁴³ Použitý systém obsahoval kolonu s navázanou fenylovou skupinou a mobilní fází byl okyselený 30 % MeOH s 0,2 mM tetraethyljodidem amonným jako ion-párovacím činidlem. Hmotnostní spektrometr byl vybaven elektrosprejem pracujícím v negativním módu. Limit detekce byl stanoven v řádu jednotek pg v jednom nástřiku. Analyty stanovené zde byly kyseliny

gallová, hydroxybenzoová, hydroxyfenyloctová, syringová, kumarová a ferulová a jejich aldehydy. Vyvinutá metoda byla poté aplikována na vzorky pšeničných a ovesných otrub.⁴³

Flavonoidy a fenolické kyseliny byly také stanovovány v rostlině tradiční čínské medicíny - kustovnici cizí.⁴⁴ Extrakce byla provedena 50 % MeOH a analyty byly zakoncentrovány na SPE kolonce s C18 reverzní fází. Analýza byla provedena na HPLC-DAD-ESI-MS sestavě s C18 kolonou a ESI v negativním módu. 52 látek bylo separováno během 70-ti minutové gradientové eluce, od fenolických kyselin až po glykosidy quercetinu, kaempferolu a isorhamnetinu.⁴⁴

2.4.2. Flavonoidy

Flavonoidy patří mezi nejrozsáhlejší skupinu polyfenolických látek a jdou dále rozdělit do několika skupin dle několika parametrů. Nejčastěji se dělí podle spojení dvou fenolických cyklů a jejich hydroxylace.⁷ V přírodě se vyskytují s navázanými hydroxy skupinami, které mohou být dále methylovány, acylovány nebo sulfonovány či jako glykosidy.³⁸ Cukerná část bývá nejčastěji navázána k aglykonu v pozici 3 a 7 přes kyslík hydroxy skupiny, ale také přes uhlík v pozici 6 a 8. Mezi tyto glykosidy nejčastěji patří rhamnosa, glukosa, galaktosa a arabinosa.⁴⁴



Obrázek 12: Obecná struktura flavonoidů.

2.4.2.1. Flavony

Do první skupiny flavonoidů, flavonů, patří látky jako jsou apigenin, tangeretin, luteolin či quercitrin. Stanovení těchto látek bylo studováno v několika vzorcích. Například deriváty apigeninu byly identifikovány v rajčatech a rajčatových produktech.⁴⁵ Příprava tekutých vzorků se skládala z centrifugace, extrakce supernatantu ethanolom v ultrazvuku

a centrifugace následované odpařením supernatantu do sucha a rozpuštěním v deionizované okyselené vodě. Vzorky s vyšší hustotou nebyly před extrakcí odstředěny, ale postup byl stejný. Výsledné extrakty byly nanесeny na anexovou SPE kolonku a analyty se eluovaly okyseleným methanolem.⁴⁵ Analytický systém se skládal z HPLC-MS sestavy s kolonou s C18 fází a okyselenou mobilní fází voda s acetonitrilem a průtokem 0,4 ml/min. Eluce byla gradientová s celkovou dobou 20 min a detekcí hmotnostním spektrometrem, který obsahoval ionizaci ESI v negativním módu. Sledované flavony byly: apigenin-C-hexosid-hexosid, apigenin-C-hexosid-pentosid a apigenin-7-O-glukosid.⁴⁵

Látky z této skupiny byly také stanoveny v několika druzích tymiánu.⁴⁷ Jednalo se o flavony apigenin a apigenin-7-O-glukoside. Homogenizované vzorky byly extrahovány 60 % methanolem v ultrazvuku, následovala centrifugace a filtrace. Separační část se skládala z kolony s C18 stacionární fází a MF okyselené vody a methanolu o průtoku 0,2 ml/min. Eluce byla gradientová s celkovým časem 30 minut. MS část sestavy se skládala z ESI v negativním módu a obsahovala kvadrupólový analyzátor. Dosažený LOD a LOQ byl v jednotkách ng/ml.⁴⁷

Jedna z identifikačních studií flavonoidů byla zaměřena na charakterizaci flavonů v okrasné dřevině zvané hlavotis peckovitý známé svým antihyperglykemickým efektem.⁴⁸ Použitá sestava byla HPLC-DAD-ESI-MS. 7 glykosidů flavonů a 2 volné aglykony byly identifikovány podle jejich retenčních časů, UV spekter, molekulových hmotností, MS-MS spekter.⁴⁸

2.4.2.2. Flavonoly

Mezi flavonoly lze zařadit například tyto látky (aglykony): quercetin, kaempferol, isorhamnetin a rutin. Identifikace prvních tří a především jejich glykosidů a esterů byla provedena ve vzorcích brokolice pomocí HPLC-DAD-ESI-MS. Isorhamnetin a jeho deriváty byly ale nalezeny pouze ve stopovém množství.⁴⁹ Byla provedena vodná extrakce zhomogenizovaného a zmrazeného vzorku (60 min, 100 °C), který se poté smíchal s polymerními adsorpčními kuličkami a naplnil do kolony. Následovalo promytí vodou a eluce methanolem, který se vysušil a následný odparek se rozpustil v 50 % methanolu. Na závěr se fenolická frakce přečistila na koloně s C18 a iontově-výměnnou fází. Identifikováno bylo několik kombinací flavonol-glykosidů s až pěti cukernými jednotkami,

například quercetin-3-sophorotrioside-7-sophoroside, případně ještě acylované deriváty kyselin kávové, sinapové, ferulové a kumarové.⁴⁹

Mezi vybranými polyfenoly stanovenými v tymiánu byly také flavonoly a to quercetin a rutin.⁴⁷ Jejich LOD a LOQ bylo shodné se skupinou flavonů a ve vzorku bylo zjištěno množství quercetinu v řádu jednotek $\mu\text{g/g}$, zatímco rutinu v řádu desítek $\mu\text{g/g}$ pevného vzorku.⁴⁷

Další alternativní LC-MS metodou pro stanovení flavonolů v rostlinné matrici, konkrétně ve vinných hroznech, v jejich slupkách a semenech, může také být sériové zapojení dvou chromatografických kolon za sebou pro dosažení co nejvyšší účinnosti.⁵⁰ V tomto případě byly využity kolony s C18 fází, kdy byly látky frakcionovány okyselenou směsí voda methanol. MS detekce proběhla pomocí ionizace elektrosprejem s analyzátozem trojitým kvadrupólem. Příprava vzorku se lišila dle povahy materiálu. Zatímco slupky byly homogenizovány kapalným dusíkem, semena hroznů byla rozdrcena pouze mechanicky. Extrakce obou vzorků byla provedena okyseleným 70 % methanolem v ultrazvuku a poté byly extrakty odstředěny a zfiltrány. Další přečištění či zakoncentrování v tomto případě nebylo provedeno.⁵⁰

Stanovené flavonoly byly glykosidy quercetinu, kaempferolu, isorhamnetinu, taxifolinu, myricetinu a syringetinu s nejvyšším obsahem quercetine-glukosidu 329 mg/kg ve slupkách červených hroznů odrůdy Red Globe.⁵⁰

Stejnou matrici si pro studium polyfenolů zvolil také Holecker et al.⁵¹ Zmražený a zhomogenizovaný prášek ze slupek a semen byl extrahován okyseleným 40 % methanolem, odstředěn a sediment reextrahován stejným rozpouštědlem. Smíchané supernatanty byly odpařeny a v prvním případě rozpuštěny v methanolu, odstředěny a analyzovány. Druhá část byla rozpuštěna ve vodě a zakoncentrována na SPE kolonce s C18 a polystyren-divenylbenzenovou fází.⁵¹

Z 54 identifikovaných látek bylo několik flavonolů - glykosidy quercetinu, kaempferolu, isorhamnetinu a rutin. Ze studie vyplývá, že optimální extrakční činidlo pro stanovení tohoto druhu látek je methanol okyselený 0,1 % kyseliny chlorovodíkové. Byla také srovnána volba přímého nástřiku nebo zakoncentrování na SPE kolonkách. Nakonec byla jako vhodnější zvolena metoda přímého nástřiku, kdy rozhodla nevýhodná ekonomická stránka SPE analýzy (rozpuštědla, kolonky) a malé rozdíly v koncentracích fenolických látek, tzn. malý vliv matrice.⁵¹

Spojení LC-MS si pro stanovení flavonolů v květním nektaru a medu vybral také Truchado et al.⁵² Důvodem pro identifikování a stanovení polyfenolického profilu v těchto vzorcích bylo zjištění místa původu medu. Vzorky nektaru byly zředěny, odstředěny a supernatanty přečištěny na SPE kolonkách s C18 fází. Eluce byla provedena čistým methanolem. Vzorky medu byly rozpouštěny v okyselené vodě, dokud nebyly homogenní a kapalné a poté byly nanесeny na SPE kolonku jako v prvním případě.

Ve studii bylo zjištěno, že například med z eukalyptu obsahuje malé koncentrace glykosidů flavonoidů, ale byly nalezeny i charakteristické flavonoidní aglykony - myricetin, luteolin a tricetin. Potvrzeno to bylo analýzou květního nektaru z eukalyptu, kde se tyto aglykony vyskytovaly ve formě sophorosidů.⁵²

2.4.2.3. Flavanony

Flavanony jsou látky, které se především vyskytují v citrusových plodech. Mezi jejich zástupce patří např. naringenin či hesperetin.

Možnosti charakterizace těchto látek v citrusech byly studovány pomocí HPLC s UV a fluorescenční detekcí. Čerstvě vymačkaná šťáva a koncentráty byly odstředěny na centrifuze a zfiltrvány. Byly studovány dvě extrakční metody: první s dimethylformamidem a oxalátem amonným a druhá s methanolem. Spolu s nimi byl ještě studován vliv teploty před centrifugací a vliv pH na výtěžnost extrakce. Studie potvrdila přítomnost hesperidinu, narirutinu a neoponcirinu a absenci naringenu a neohesperidinu ve vzorcích pomerančových džusů.⁵³

Některé flavanony byly ale stanoveny i ve vzorcích tymiánu, jako předchozí flavonoidy.⁴⁷ Jednalo se o flavanony naringenin, eriodictyol a dihydroquercetin. Limity detekce a kvantifikace byly obdobné jako v předchozích případech a jejich koncentrace ve vzorku byla v řádu stovek ng/ml v případě eriodictyolu a naringenu a v řádu tisíců ng/ml v případě dihydroquercetinu.⁴⁷

2.4.2.4. Flavanoly (katechiny)

Příprava vzorků flavanolů je obdobná jako v případě flavonolů. Holecker et al. a Cavaliere et al. identifikovali a stanovovali ve vinných hroznech kromě flavonolů také flavanoly.^{50,51} V prvním případě byla vyvinuta metoda pro stanovení 5 flavanolů:

katechinu, epikatechinu, epikatechin gallátu, prokyanidinu B1 a prokyanidinu B2.⁵¹ V druhé práci byly stanoveny stejné flavanoly ve slupkách vinných hroznů, a to včetně sum jejich dimerů, trimerů a tetramerů. V semenech byly stanoveny především galláty již zmíněných flavanolů.⁵⁰

Katechin a epikatechin byly také stanovovány ve vzorcích čerstvých mandlí.⁵⁴ Analýza se týkala slupek mandlí a ořechu samotného, ale také vody, ve které se mandle vařily, aby se slupka odstranila. Zde se ale stanovoval pouze obsah celkových polyfenolů Folin-Ciocalteovou reakcí. Pevné vzorky byly lyofilizovány po dobu 7 dní a poté rozdrceny pod kapalným dusíkem. Následně byly provedena extrakce hexanem pro zbavení se lipidů a po centrifugaci vysušení a extrakce methanolem. Posledním krokem bylo vysušení extraktu a rozpuštění v pufru pro Folin-Ciocalteovu reakci nebo v mobilní fázi pro LC analýzu.⁵⁴ V HPLC-MS stanovení bylo identifikováno 20 flavonoidů, z čehož byly 2 flavanoly, 3 flavanony a 15 flavanolů či flavanol-glykosidů.⁵⁴

Stanovení flavanolů, konkrétně katechinu, epikatechinu a jejich dimerů a trimerů, bylo provedeno ve vzorku kakaového prášku. Byly zjišťovány hodnoty antioxidantů v extraktu před a po reakci s ROS, v tomto případě peroxidem vodíku a 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyllovým radikálem. Kakaový prášek byl nejdříve extrahován hexanem pro zbavení tuků a poté extrahován do methanolu v ultrazvuku. Po odstředění byly supernatanty zfiltrány, odpařeny a rozpuštěny v 20 % methanolu. Na separaci byla použita kolona s C18 fází a na detekci hmotnostní spektrometr s ESI v negativním módu.⁵⁵

2.4.2.5. Flavanonoly

Nejznámějším zástupcem skupiny flavanonolů je sloučenina taxifolin, která se nejčastěji vyskytuje v citrusových plodech.¹ Identifikován a stanoven byl ale také v kuličkách prosa spolu s mnoha dalšími polyfenoly metodou HPLC-DAD-ESI-MS.⁵⁶ Vzorky byly pomlety, prosáty a extrahovány hexanem pro odstranění lipidů. Polyfenolické látky byly poté opakovaně extrahovány v ultrazvuku do 70 % acetonu, odstředěny a supernatanty smíseny. Po odpaření byly extrakty rozpuštěny ve vodě a pH upraveno na hodnotu 2. Volné fenolické látky byly poté extrahovány do diethyletheru a ethyl acetátu (1:1). Vodná fáze byla alkalicky zhydrolyzována a obě fáze odpařeny a následně rozpuštěny v methanolu.⁵⁶ Separační systém se skládal z LC s C18 kolonou a mobilní fází směsi okyselené vody a methanolu obsahujícího 5 % acetonitrilu. Eluce byla gradientová s celkovým časem 40 minut a detekce obsahovala ionizaci elektrosprejem v negativním

módu. Byly identifikovány flavanonoly taxifolin, taxifolin-O-hexoside a taxifolin-O-pentoside a na základě fragmentačních spekter.⁵⁶

Odlišný vzorek – víno – si vybral Vitrac et. al.⁵⁷ Látky v něm identifikované a stanovené byly především resveratrol, deriváty stilbenu, ale také 2 flavanonoly astilbin a dihydromyricetin-3-O-rhamnosid. Ty byly identifikované pomocí UV-Vis detektoru, zatímco na ostatní látky byl použit detektor fluorimetrický. Použitá mobilní fáze byla shodná pro obě stanovení - okyselená směs vody a acetonitrilu - zatímco objem dávkovaného vzorku pro fluorimetrickou detekci byl pětikrát menší než pro UV detektor. Výhodou této metody je jednoduchá příprava vzorku, když vzorky vín byly před analýzou pouze zfiltrovány a poté dávkovány.⁵⁷

2.4.2.6. Izoflavony

Skupina izoflavonů se od flavonů liší nejvíce tím, že fenolický kruh B aglykonu je navázán v pozici 3 a ne v pozici 2.

Tyto látky byly charakterizovány a stanoveny například v sojových výživových doplňcích metodou LC-MS.⁵⁸ Separační a detekční systém se narozdíl od předchozích studií flavonoidů lišil použitím APCI místo ESI. Výhodou této metody je jednoduchá a rychlá příprava vzorku, kdy po extrakci 75 % acetonitrem se odstředěný a zfiltrovaný supernatant použil přímo pro analýzu. Celkem bylo stanoven 9 izoflavonů, které byly identifikovány na základě srovnání se standardy a zároveň podle jejich fragmentačních spekter a jejich koncentrace byla stanovena ve třech reálných vzorcích.⁵⁸

Izoflavony jsou jedny z látek patřící do skupiny fytoestrogenů. Z tohoto důvodu byly stanovovány v 35 vzorcích různých doplňků stravy. Extrakce proběhla v ethanolu v ultrazvuku a po následném zředění byly přidány vnitřní standardy izoflavonů s ¹³C značenými uhlíky. Analýza proběhla na LC-MS přístroji s izotopově značenými standardy.⁵⁹

Další vzorky, ve kterých byl obsah izoflavonů stanovován, byly sinice a řasy, jak sladkovodní, tak mořské.⁶⁰ Byl také studován vliv přípravy vzorku a to sonifikace na účinnost a výtěžnost extrakce. Byla použita jak klasická ultrazvuková lázeň, tak i přístroj se sondou. Poté následovala superkritická fluidní extrakce a obsah byl stanoven pomocí ultraúčinné LC ve spojení s MS s ESI v negativním módu, analyzátozem trojitým kvadrupólem a ionty byly sledovány v módu MRM (multiple reaction monitoring).⁶⁰

2.4.2.7. Anthokyanidiny

Anthokyaniny jsou červená barviva vyskytující se v mnoha druzích ovoce a zeleniny. Strukturálně to jsou glykosidy anthokyanidinů.

Tyto látky byly stanovovány ve vzorcích semen a slupek vinných hroznů.⁵⁰ Bylo potvrzeno, že se vyskytují ve vysokých koncentracích ve vzorcích slupek červených hroznů, zatímco v bílých nikoliv. Byly studovány glukosidy a acyl-glukosidy těchto anthokyanidinů: delfinidinu, kyanidinu, petunidinu, peonidinu a malvidinu. Aby tyto látky v chromatogramu dávaly ostré a symetrické píky, musela být také upravena separační metoda přidáním 5-ti až 10-ti % kyseliny mravenčí jako modifikátoru. Díky tomu měla metoda pro tyto látky vyšší LOD než pro ostatní flavonoidy a separace měla nižší účinnost.⁵⁰

Stanovení a identifikace anthokyaninů byly také provedeny v plodech rostliny myrty obecné, která se ve středomoří používá při výrobě likéru.⁶¹ Příprava vzorku byla naložení do 70 % ethanolu. Extrakt se poté již pouze zředil a pro kvantitativní analýzu byl přidán vnitřní standard kyanidin-3-O-galactopyranosid. Takto bylo metodou HPLC-MS stanoveno 9 anthokyaninů, z čehož bylo 5 glukosidů a 4 arabinosidy. Byla také studována fragmentace anthokyanidinů, tzn. aglykonů anthokyaninů, na MS analyzátoru iontové pasti.⁶¹

Jiný vzorek k analýze těchto látek si zvolil Macz-Pop et al. a to fazole druhu *Phaseolus vulgaris*.⁶² Identifikovány a stanoveny byly mono- a di-glukosidy kyanidinu a pelargonidinu a oproti dalším studiím anthokyanidinů byly ve vzorcích nalezeny i volné aglykony kyanidinu, pelargonidinu a peonidinu. Charakterizace majoritních složek byla provedena na LC s UV-Vis detektorem na základě retenčních časů a UV spekter. Kvantifikace byla provedena pomocí LC-MS s ESI v pozitivním módu. Příprava vzorku se skládala z homogenizace vzorku, extrakce v okyseleném methanolu ultrazvuku a následné centrifugace. Supernatant byl vždy oddělen a tento krok se 5x opakoval. Výsledný extrakt byl odpařen a rozpuštěn v deionizované vodě. Dalším krokem bylo přečištění vzorku a to opakovanou extrakcí hexanem a odpaření na 2 ml vodného extraktu, který byl poté nanesen na SPE kolonku s C18 fází. Eluce byla provedena okyseleným methanolem, který byl odpařen a odparek rozpuštěn v deionizované vodě.⁶²

Charakterizace a stanovení anthokyaninových barviv v několika desítkách druhích vína bylo také cílem Papouškové et al.⁶³ Pro kvantifikování několika desítek glykosidů pelargonidinu, cyanidinu, delphinidinu, peonidinu, petunidinu a malvidinu se použila kalibrační závislost malvidin-3-glukosidu. Tato práce se také zabývala srovnáním metody UHPLC a μ LC s výsledkem, že obě techniky jsou pro stanovení anthokyaninů vhodné, ale UHPLC nabízí nižší hodnoty LOD, LOQ a větší reprodukovatelnost.⁶³

Dalším vzorkem, ve kterém byly anthokyaniny studovány byla rostlina zimolez kamčatský.⁶⁴ V této studii byla nejdříve prováděna frakcionace látek na semipreparativní koloně a následně identifikace glykosidů s využitím techniky μ LC/MS a MS².

2.4.3. Další polyfenolické látky

Třetí skupinou, která patří mezi polyfenolické látky, jsou sloučeniny, které nejsou ani fenolické kyseliny, ani flavonoidy.

Prvním zástupcem jsou tanniny, které se mohou dělit na hydrolyzovatelné a kondenzované.² Hydrolyzovatelné tanniny jsou estery gallové kyseliny, kondenzované jsou polymery polyhydroxy-flavanol monomerů.

Polymerické tanniny a jejich oligomery z hroznového vína byly analyzovány z důvodu jejich účinku proti infekčním plísním. Tanniny inhibují stilben-oxidase, která v nezralých hroznech oxiduje resveratrol a pterostilben, čímž zabraňuje infekci plísní šedé *Botrytis cinerea*.⁶⁵ V této studii byla provedena extrakce a frakcionace tanninů a látky byly poté detekovány MS s iontovou pastí.⁶⁵

Dalším vzorkem, kde byly tanniny studovány, byla rostlina růže čínská užívaná v tradiční čínské medicíně. Spolu s hydrolyzovatelnými tanniny (gallotanniny a ellagotanniny) byly také identifikovány a stanoveny flavonoly a anthokyaniny.⁶⁶ Látky byly kvantifikovány jak v methanolicém extraktu pomocí LC-MS, ale také metodou MALDI-QIT-TOF-MS, kdy byl dávkován 1 μ l zředěného extraktu na vzorkovací podložku.⁶⁶

Další skupinou jsou polyfenolické amidy. Patří sem avenanthramidy a kapsaicinoidy.

Byla vyvinuta LC-MS metoda pro stanovení avenanthramidů a poté aplikována na vzorky ovsa.⁶⁷ Vzorek mouky byl opakovaně extrahován 80 % ethanolem, odpařen a rozpuštěn v methanolu. Separční část analýzy proběhla systémem reverzních fází

s kolonou s navázanou C18 fází a okyselenou mobilní fází acetonitril - voda. MS detekce byla nastavena na ionizaci elektrosprejem v pozitivním módu spolu s kvadrupólovým analyzátozem.⁶⁷

Kapsaicinoidy jsou látky, které způsobují pálivost chilli papriček či různých pepřů.⁶⁸ Nejdříve bylo pět těchto látek (nordihydrokapsaicin, kapsaicin, dihydrokapsaicin, homokapsaicin a homodihydrokapsaicin) identifikováno metodou LC-MS a poté byla vyvinuta metoda pro jejich stanovení ve vzorcích pepřů pomocí metody HPLC s fluorimetrickým detektorem. Rozdíl oproti jiným stanovení polyfenolů byl ten, že zde byla využita monolitická kolona a výhodou doba analýzy - 8 minut.⁶⁸

Další skupinou patřící do této kategorie mohou být stilbeny a jejich nejznámější zástupce resveratrol. Jsou to látky, které se nacházejí ve vysokých koncentracích ve vinných hroznech a ve víně. V této reálné matici byly stanoveny spolu s flavonoidy metodou HPLC s fluorimetrickým detektorem. Konkrétní stilbeny a jejich optické izomery zde stanovené byly piceid, astringin, resveratrol a pallidol.⁵⁷

Shodnou rostlinnou matici si vybral i Holecker et al.⁵¹ Kromě flavonoidů byl i resveratrol-3-O-glukosid identifikován a stanoven ve vzorcích vinných hroznů. LOD této metody byl v případě tohoto stilbenu v řádu desítek ng/ml.⁵¹

Stilbeny se však mohou vyskytovat i například v chmelu a proto byla vyvinuta metoda LC-MS pro analýzu piva.⁶⁹ Příprava vzorku se skládala z odplynění vzorku v ultrazvuku, následného zředění a přečištění na SPE kolonce s C18 fází. Analyty byly eluovány okyseleným methanolem (1 M kys. octová) a okyseleným ethyl acetátem. Výsledný extrakt byl odpařen a rozpuštěn v mobilní fázi. Sledované analyty byly *trans*- a *cis*-resveratrol a *trans*- a *cis*-piceid. Celková koncentrace sumy obou optických forem resveratrolu byla ve většině piv v řádu jednotek až desítek µg/l.⁶⁹

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Instrumentace

Praktická část diplomové práce byla vypracována s využitím ultra-účinného kapalinového chromatografu (UPLC, Acquity, Waters) a hmotnostního spektrometru Q-ToF Premier (Waters) s ionizací elektrosprejem a hybridním analyzátozem Q-ToF. Použitá kolona byla značky Kinetex 2,6 μm - C18 (50 x 2,1 mm).



Obrázek 13: Kapalinový chromatograf Acquity (vlevo) a hmotnostní spektrometr Premier (vpravo).
(Katedra Analytické chemie, Univerzita Palackého, Olomouc)

3.2. Chemikálie

Přesné navážky standardů byly rozpuštěny v methanolu (Fisher Chem., HPLC grade) na zásobní roztok o koncentraci 1 mg/ml. Použité standardy byly kaempferol (Sigma, 97 %), quercetin (Sigma, 98 %), quercetin-3-glukoside (Sigma, 98 %) a rutin (Fluka, 95 %).

V případě mobilní fáze byla použita deionizovaná voda (Lach:ner, Water for HPLC), acetonitril (J.T.Baker, HPLC, gradient grade) a kyselina mravenčí (99,7 %).

Při přípravě vzorku byla použita deionizovaná voda (Millipore, Water Purification Systems, Direct UV, 18,2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}^2$) a methanol (Fisher Chem., HPLC grade).

Při studiu hydrolyzy byly použity tyto chemikálie: HCl (konc. 35 %), NaOH (98 %), NH₄OH (konc. 25 %) a octan amonný (95 %).

Pro stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP byly použity tyto chemikálie: standard tripyridyltriazinu (Sigma, > 98 %), FeCl₃ (97 %) a Mohrova sůl.

3.3. Metoda

Nastavení kapalinového chromatografu bylo s těmito parametry: průtok 0,6 ml/min a mobilní fáze A: 0,1 % HCOOH ve vodě a B: 0,1 % HCOOH v acetonitrilu s gradientovou elucí 2 % B do času 2 min, poté lineární nárůst na 100 % B v čase 7,5 min, pak pokles zpět na 2 % B v čase 9 min a ekvilibrace s 2 % B do času 10 min.

Hmotnostní spektrometr obsahoval ionizaci elektrosprejem a byl nastaven na tyto podmínky, které byly studovány při měření 4 standardů.

Teplota ve zdroji byla studována v rozmezí 80 - 120 °C v krocích po 10 °C a na základě výsledků bylo vybráno 120 °C.

Teplota desolvatačního plynu byla studována v rozmezí 250 - 450 °C v krocích po 50 °C a na základě výsledků bylo vybráno 450 °C.

Průtok desolvatačního plynu byl studován v rozmezí 400 - 800 l/hod po v krocích 100 l/hod a na základě výsledků bylo vybráno 700 l/hod.

Napětí na vstupní šterbině (sampling cone) bylo studováno v rozmezí 20 - 60 V v krocích po 10 V a na základě výsledků bylo vybráno 50 V.

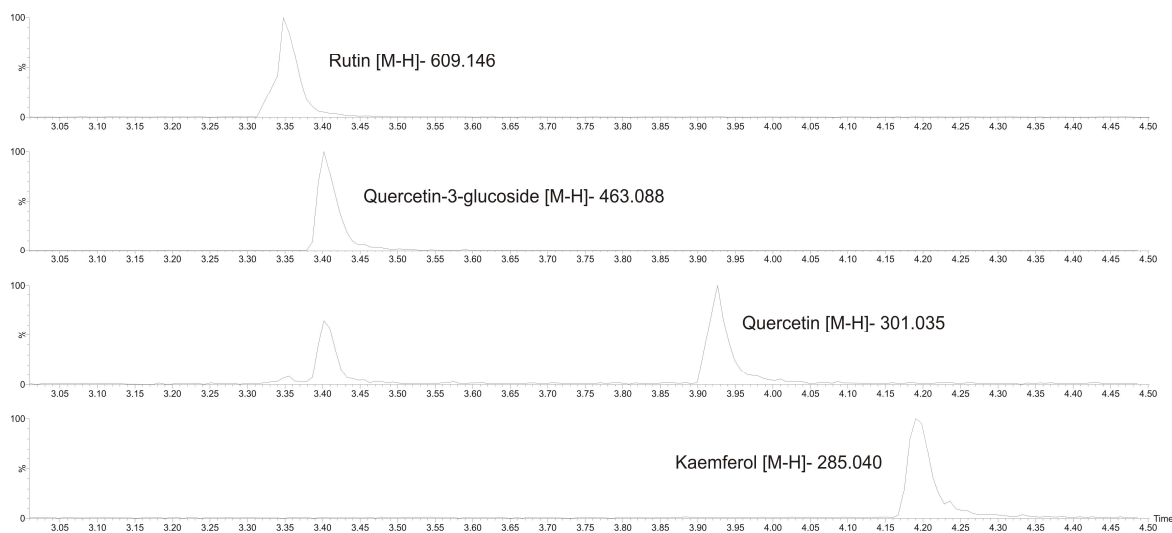
Nastavení optiky (pre-filter) bylo studováno v rozmezí 4 - 10 voltů v krocích po 1 V a na základě výsledků bylo vybráno 6.

Posledním parametrem byla optimální kolizní energie, která byla studována v rozmezí 20 - 40 V v krocích po 5 V a na základě výsledků byla vybrána hodnota 30 V.

3.4. Pracovní postup

Z připravených zásobních roztoků kaempferolu, quercetinu, quercetin-3-glukosidu a rutinu o koncentraci 1 mg/ml byly metodou postupného ředění připraveny kalibrační roztoky o koncentraci 1000 ng/ml, 300 ng/ml, 100 ng/ml, 30 ng/ml, 10 ng/ml a 3 ng/ml. Každý bod byl změřen třikrát.

Souběžně se všemi kalibračními body a vzorky byl do mobilní fáze přimícháván vnitřní standard leucin-enkefalin pro normalizaci odezvy o průtoku 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ a koncentraci 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Obrázek 14: Chromatogram standardů o koncentraci 1000 ng/ml.

Příprava vzorku z čerstvého rostlinného materiálu (brokolice, *Brassica Oleracea* var. *italica*), který byl zakoupen v místním supermarketu v období březen - duben 2012, se skládala z několika kroků. Prvním byla homogenizace vzorku o přibližné hmotnosti 2 g s následnou extrakcí do 100 ml 50 % methanolu. Vzorek byl sonifikován, po odstředění zfiltrován a tento rostlinný extrakt byl připraven pro další použití.

Pro přečištění a zakoncentrování vzorku byla použita SPE (solid-phase extraction) metoda. Byly studovány dva druhy SPE kolonek: s C18 a anexovou fází (Waters, Oasis, MAX, 60 mg) a pouze s C18 fází (Waters, Oasis, HLB, 30 mg).

SPE kolonka MAX byla kondicionována 2 ml MeOH a následně 2 ml H₂O. Poté se naněsl okyselený vzorek (5 ml či 10 ml v případě vývarů, v 1 % HCOOH), který se následně promyl 2 ml 5 % NH₄OH v H₂O. Prvním elučním činidlem byl 1 ml MeOH a druhým 1 ml 2 % HCOOH v MeOH. Poté byly vzorky odpařeny a rozpuštěny v 1 ml deionizované vody.

U SPE kolonky HLB pouze s C18 fází byl krok kondicionování a nanášení vzorku shodný, jen s menším objemem - 1 ml. Poté byla kolonka promyta vodou (1 ml) a látky byly eluovány v 1 ml 100 % MeOH. Vzorek byl následně odpařen a rozpuštěn v deionizované vodě.

Pro uvolnění flavonolů z jejich glykosidů byla provedena hydrolyza po SPE v 50 % MeOH pomocí 2 M - HCl po dobu 75 minut při 80 °C. Neutralizace byla provedena 2 M - NH₄OH.

Tepelná úprava brokolice se skládala z vaření v páře a ve vodě. Množství brokolice vařené v páře bylo 58,1 g a následého vývaru bylo 95 ml. Pro vaření ve vodě bylo použito 59,2 g a vývaru po vaření bylo 270 ml. Oba vzorky byly vařeny po dobu 10 min.

Antioxidační kapacita byla stanovena pomocí metody FRAP.⁴⁰ Bylo připraveno reakční činidlo ze směsi octanového pufru o pH 3,6, standardu tripyridyltriazinu a železitých iontů. Pro stanovení vzorků byly vytvořeny kalibrační směsi tohoto činidla spolu s různými koncentracemi železnatých iontů - 100, 300, 500 a 700 a 1000 μM Fe²⁺. Absorbance byla poté měřena při 596 nm.

3.5. Použité programové vybavení

Základní statistické zpracování dat bylo realizováno pomocí programu Microsoft Excel 2003.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Vývoj metody pro identifikaci polyfenolových látek v extraktu brokolice

4.1.1. Extrakce polyfenolů z rostlinného materiálu

Kvalitativní část této práce byla rozdělena do několika kroků. Nejdříve byla provedena literární rešerše, ze které byl vytvořen seznam látek, které byly následně hledány v reálných vzorcích.^{49,72,73}

Poté byly změřeny první vzorky. Byla provedena extrakce zhomogenizovaného vzorku brokolice v methanolu, vzorek byl zfiltrován, zředěn a nastříknut do systému

LC/MS. Hodnoty m/z pozorovaných iontů jsou uvedeny v Tabulce 1. Jejich identifikace byla založena na stanovení přesné hmoty pomocí hmotnostního spektrometru s ionizací elektrosprejem a hybridním analyzátozem Q-ToF a srovnání s přesnou hmotou jejího sumárního vzorce a také na základě fragmentačních spekter.

Charakteristickým rysem glykosidů je fakt, že pod stejným poměrem m/z se může vyskytovat více izomerů. Tento fakt je diskutován v kapitole 4.1.3. Fragmentace.

Tabulka 1: Pravděpodobné přiřazení látek nalezených v methanolicém extraktu. Zleva: název látky, vzorec, přesná teoretická hmotnost M a $[M-H]^-$, chyba v ppm a celková intenzita (součet scanů přes pík). Zkratka K znamená kaempferol.

Název látky	C _x H _y O _z	M	[M-H] ⁻	Chyba (ppm)	Intenzita
Kyselina skořicová	C ₉ H ₈ O ₂	148,0524	147,0452	4,1	329
Kyselina kumarová	C ₉ H ₈ O ₃	164,0473	163,0401	4,3	128
Kyselina kávová	C ₉ H ₈ O ₄	180,0422	179,0349	11,2	123
Kyselina chinová	C ₇ H ₁₂ O ₆	192,0633	191,0561	6,3	1490
Kyselina sinapová	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,0684	223,0612	4,5	85
Katechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,0790	289,0717	-5,2	75
Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,0427	301,0354	2,0	826
Kyselina chlorogenová	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,0950	353,0878	6,5	322
Feruloyl-glucoside	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	356,1107	355,1035	7,0	480
Sinapoyl-glucoside	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	386,1212	385,1134	4,7	1320
Kaempferol-3-O-glucoside / quercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,1005	447,0932	-0,4	194
1-sinapoyl-gentiobiose	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₅	548,1741	547,1668	-4,6	137
K-3,7-diglucoside / K-glucosyl-glucoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,1533	609,1461	4,4	301
1-sinapoyl-2-feruloyl-gentiobiose	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₈	724,2214	723,2141	0,6	914
1,2-disinapoyl-gentiobiose	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₉	754,2320	753,2247	-0,8	701
1,2'-disinapoyl-2-feruloyl-gentiobiose	C ₄₄ H ₅₀ O ₂₂	930,2793	929,2715	-0,2	478
1,2,2'-trisinapoyl-gentiobiose	C ₄₅ H ₅₂ O ₂₃	960,2899	959,2827	1,8	687

4.1.2. Extrakce na pevné fázi

Pro přečištění a zakoncentrování vzorku rostlinného materiálu byla vyvinuta SPE metoda. Byly studovány kolonky 2 typů - HLB s C₁₈ fází a MAX s C₁₈ a anexovou fází.

V případě typu HLB kolonek byla testována eluce látek postupně různými směsmi voda – methanol s rostoucí eluční silou (20, 50 a 100% MeOH s 1% HCOOH). Nalezené

látky jsou uvedeny v Tabulce 2. Byla vždy vybrána eluce s nejvyšší intenzitou dané hmoty a nejvíce látek se eluovalo ve frakci obsahující 50 % methanolu. Toto eluční činidlo bylo používáno při dalších SPE extrakcích.

Tabulka 2: Pravděpodobné přiřazení látek nalezených v elučních frakcích. Zleva: název látky, vzorec, přesná teoretická hmotnost M a $[M-H]^-$, eluční činidlo, chyba v ppm a celková intenzita (součet scanů přes pík). Zkratka K znamená kaempferol.

Název látky	$C_xH_yO_z$	M	$[M-H]^-$	Eluce	Chyba (ppm)	Intenzita
Kyselina salicylová	C7H6O3	138,0316	137,0244	20 % MeOH	6,6	1530
Kyselina skořicová	C9H8O2	148,0524	147,0452	H ₂ O	7,5	1420
Vanillin	C8H8O3	152,0473	151,0401	50 % MeOH	-2,0	279
Kyselina kumarová	C9H8O3	164,0473	163,0401	50 % MeOH	6,7	1510
Kyselina vanillová	C8H8O4	168,0422	167,0349	50 % MeOH	8,4	624
Kyselina kávová	C9H8O4	180,0422	179,0349	50 % MeOH	5,6	405
Kyselina veratrová	C9H10O4	182,0570	181,0506	50 % MeOH	-0,6	251
Kyselina chinová	C7H12O6	192,0633	191,0561	H ₂ O	-6,8	3990
Kyselina ferulová	C10H10O4	194,0579	193,0506	50 % MeOH	10,9	1480
Kyselina sinapová	C11H12O5	224,0684	223,0612	50 % MeOH	5,4	1180
Kyselina chlorogenová	C16H18O9	354,0950	353,0878	50 % MeOH	6,5	6470
Feruloyl-glucoside	C16H20O9	356,1107	355,1035	50 % MeOH	7,3	3390
Sinapoyl-glucoside	C17H22O10	386,1212	385,1134	50 % MeOH	4,2	9060
K-3-O-glucoside	C21H20O11	448,1005	447,0932	50 % MeOH	2,9	1060
1-sinapoyl-gentiobiose	C23H32O15	548,1741	547,1668	50 % MeOH	2,7	8120
K-3,7-diglucoside / K-glucosyl-glucoside	C27H30O16	610,1533	609,1461	50 % MeOH	-1,3	1140
1-sinapoyl-2-feruloyl-gentiobiose	C33H40O18	724,2214	723,2141	100 % MeOH	5,7	1930
1,2-disinapoyl-gentiobiose	C34H42O19	754,2320	753,2247	100 % MeOH	3,5	2460

Druhým typem SPE byla kolonka MAX s C18 a anexovou fází. Po nanesení okyseleného vzorku a promytí hydroxidem amonným, byla opět provedena frakcionace vzorku, v tomto případě ale pouze dvěma činidly: methanolem a okyseleným methanolem (2 % HCOOH). Kromě kyseliny ferulové se všechny nalezené látky eluovaly v okyseleném elučním činidle, viz. Tabulka 3.

Tabulka 3: Pravděpodobné přiřazení látek nalezených v elučních frakcích. Zleva: název látky, vzorec, přesná teoretická hmotnost M a $[M-H]^-$, eluční činidlo, chyba v ppm a celková intenzita (součet scanů přes pík). Zkratka K znamená kaempferol, Q quercetin.

Název látky	$C_xH_yO_z$	M	$[M-H]^-$	Eluce	Chyba (ppm)	Intenzita
Kyselina salicylová	C7H6O3	138.0316	137.0244	H ⁺ MeOH	7.3	328
Kyselina skořicová	C9H8O2	148.0524	147.0452	H ⁺ MeOH	12.2	71
Vanillin	C8H8O3	152.0473	151.0401	H ⁺ MeOH	8.6	40
Kyselina kumarová	C9H8O3	164.0473	163.0401	H ⁺ MeOH	0.9	268
Kyselina vanillová	C8H8O4	168.0422	167.0349	H ⁺ MeOH	6.0	257
Kyselina kávová	C9H8O4	180.0422	179.0350	H ⁺ MeOH	6.7	318
Kyselina chinová	C7H12O6	192.0633	191.0561	H ⁺ MeOH	4.7	657
Kyselina ferulová	C10H10O4	194.0579	193.0506	MeOH	-11.4	559
Kyselina sinapová	C11H12O5	224.0684	223.0612	H ⁺ MeOH	6.3	424
Kaempferol	C15H10O6	286.0477	285.0405	H ⁺ MeOH	-1.1	1100
Quercetin	C15H10O7	302.0427	301.0354	H ⁺ MeOH	3.0	215
Kyselina chlorogenová	C16H18O9	354.0950	353.0878	H ⁺ MeOH	4.2	730
Feruloyl-glucoside	C16H20O9	356.1107	355.1035	H ⁺ MeOH	3.4	213
Sinapoyl-glucoside	C17H22O10	386.1212	385.1140	H ⁺ MeOH	-8.6	1220
1-sinapoyl-gentiobiose	C23H32O15	548.1741	547.1668	H ⁺ MeOH	-4.8	1500
K-3,7-diglucoside / K-glucosyl-glucoside	C27H30O16	610.1533	609.1461	H ⁺ MeOH	-8.7	2290
Q-3-O-sophoroside = Q-3,7-di-O-glucoside	C27H30O17	626.1483	625.1410	H ⁺ MeOH	-6.6	61
1-sinapoyl-2-feruloyl-gentiobiose	C33H40O18	724.2214	723.2141	H ⁺ MeOH	1.7	2220
1,2-disinapoyl-gentiobiose	C34H42O19	754.2320	753.2247	H ⁺ MeOH	-1.2	3900
K-3-O-sophoroside-7-O-glucoside	C33H40O21	772.2062	771.1989	H ⁺ MeOH	4.4	108
1,2'-disinapoyl-2-feruloyl-gentiobiose	C44H50O22	930.2793	929.2720	H ⁺ MeOH	3.2	190
Q-3-O-(p-coumaric)-sophoroside-7-O-glucoside / K-3-O-caffeoyldiglucoside-7-O-glucoside	C42H46O24	934.2379	933.2306	H ⁺ MeOH	2.8	34
K-3-O-feruloyldiglucoside-7-O-glucoside	C43H48O24	948.2535	947.2463	H ⁺ MeOH	1.2	70
1,2,2'-trisinapoyl-gentiobiose	C45H52O23	960.2899	959.2827	H ⁺ MeOH	1.0	321
K-3-O-sinapoyldiglucoside-7-O-glucoside	C44H50O25	978.2641	977.2568	H ⁺ MeOH	3.0	278
K-O-(feruloyl)-sophorotrioxide-7-O-glucoside	C49H58O29	1110.3063	1109.2991	H ⁺ MeOH	2.0	170
K-O-(sinapoyl)-sophorotrioxide-7-O-glucoside	C50H60O30	1140.3169	1139.3097	H ⁺ MeOH	1.4	207

4.1.3. Fragmentace

Pro potvrzení identifikace několika vybraných látek byly sloučeniny v reálném vzorku fragmentovány kolizní energií 30 V. Na základě literatury a teorie o fragmentaci flavonoidů a jejich glykosidů byla potvrzena jejich identifikace a navržena fragmentační schémata.^{70,71}

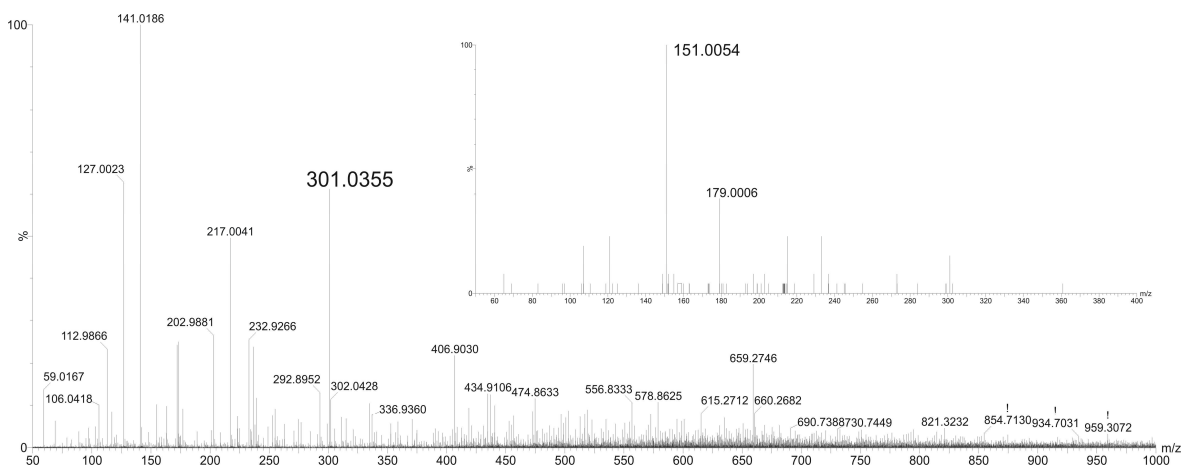
Přesná hmotnost 609,1461 odpovídá několika látkám se shodným sumárním vzorcem. Této hmotnosti odpovídá spojení aglykonu kaempferolu a dvou hexos - glukosidů. V chromatogramu byly nalezeny 4 píky pro tuto přesnou hmotu. Nejprve byl vyloučen standard rutin (se shodným poměrem hmotnosti a náboje), neboť po přidavku tohoto standardu byl v chromatogramu nalezen další pík.

Poté byla studována fragmentační spektra těchto látek, která v negativním módu vždy poskytla ion s m/z 285 (aglykon kaempferolu) a v případě dvou pík také ion o m/z 429, který je dle Vukicse et al. přítomný v případě disacharidového glykanu.^{70,71} Z toho vyplývá, že se může jednat o kaempferol-*O*-diglukosidy s glykanem navázaným v pozicích 3 a nebo 7.

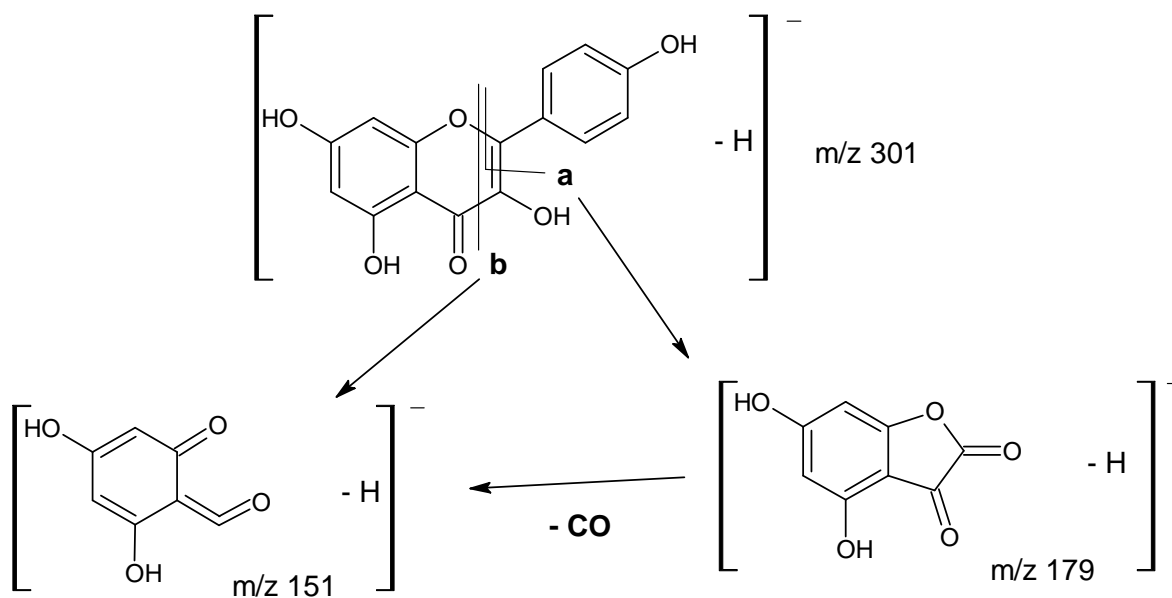
Další dva píky, které neobsahovaly charakteristický ion 429 mohou být kaempferol-di-*O*-glukosidy s dvěma glukosovými jednotkami vázanými odděleně na různé hydroxyskupiny aglykonu.

Podobná situace nastává také u hmot s m/z 625, 463 a 447, kde se také jedná o izomery. Jejich identifikace byla opět založena na fragmentačních spektrech, potvrzení standardem v případě látky s m/z 463 (quercetin-3-glukosid) a literatury o flavonolech v brokolici.^{72,73}

První zvolenou fragmentovanou látkou byl quercetin, viz. jeho MS a ve výřezu MS/MS spektrum na obrázku 15. Navržené fragmentační schéma je na obrázku 16.



Obrázek 15: MS spektrum quercetinu (m/z 301) a ve výřezu jeho fragmentační MS/MS spektrum.

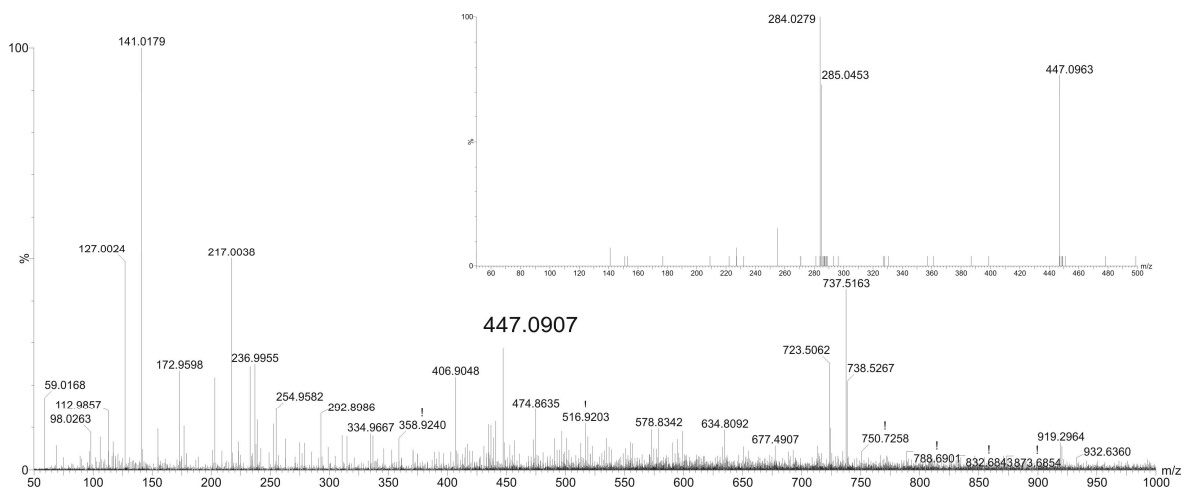


Obrázek 16: Navržené fragmentační schéma quercetinu.

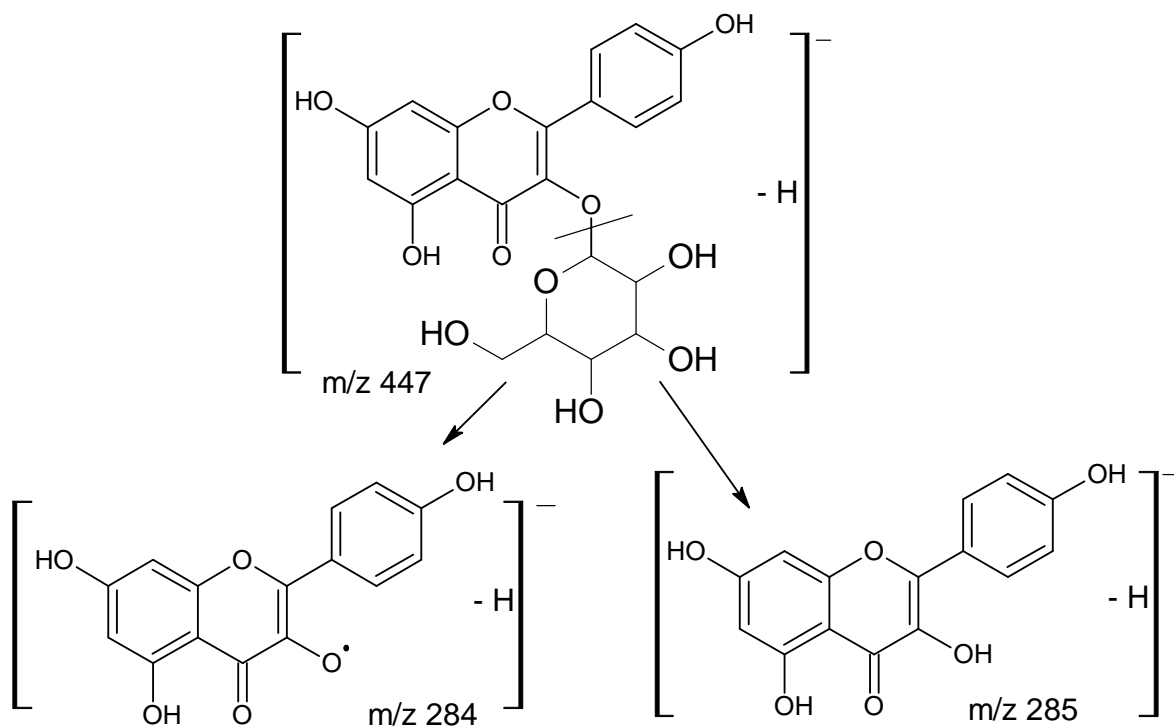
Ve sloučenině quercetinu dochází ke štěpení vazby mezi kyslíkem a uhlíkem v pozici 2 a uhlíky v pozici 2 a 3, viz. obrázek 12 obecné struktury flavonoidu. Následně může nastat dekarboxylace fragmentu o m/z 179 za vzniku fragmentu s m/z 151.⁷⁴ Ten může ale také zároveň vznikat přímo z molekuly quercetinu štěpením vazeb mezi kyslíkem a uhlíkem v pozici 2 a mezi uhlíky v pozicích 3 a 4.

Další fragmentovanou sloučeninou byl kaempferol-3-glukoside. Jeho MS spektrum a MS/MS spektrum lze vidět na obrázku 17.

Navržené fragmentační schéma je na obrázku 18, kdy fragmentací této látky vzniká její aglykon kaempferol. Současné s ním také kaempferol radikál s hmotou m/z 284.

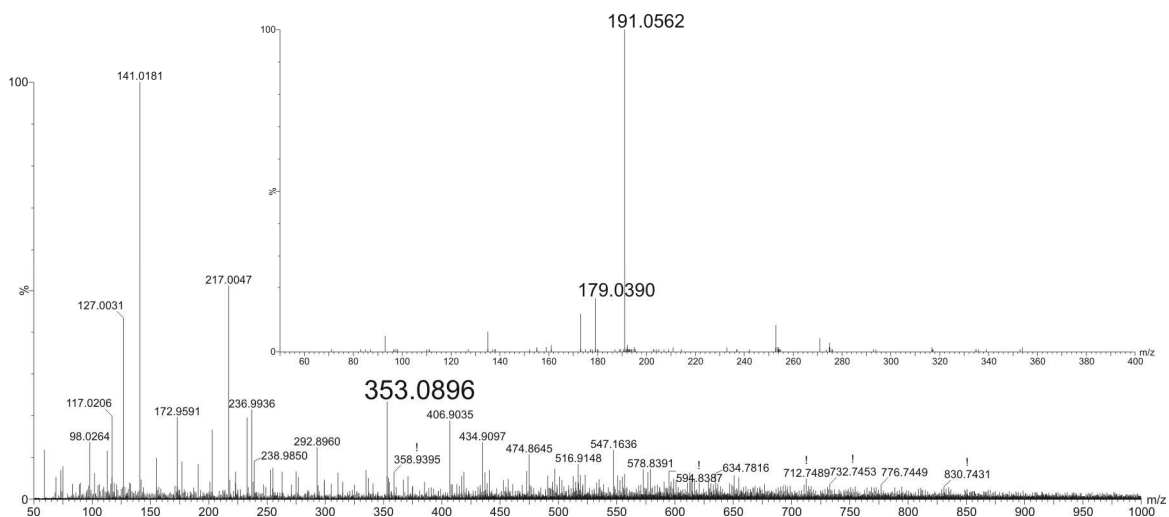


Obrázek 17: MS spektrum kaempferol-3-glukosidu (m/z 447) a ve výřezu jeho fragmentační MS/MS spektrum.



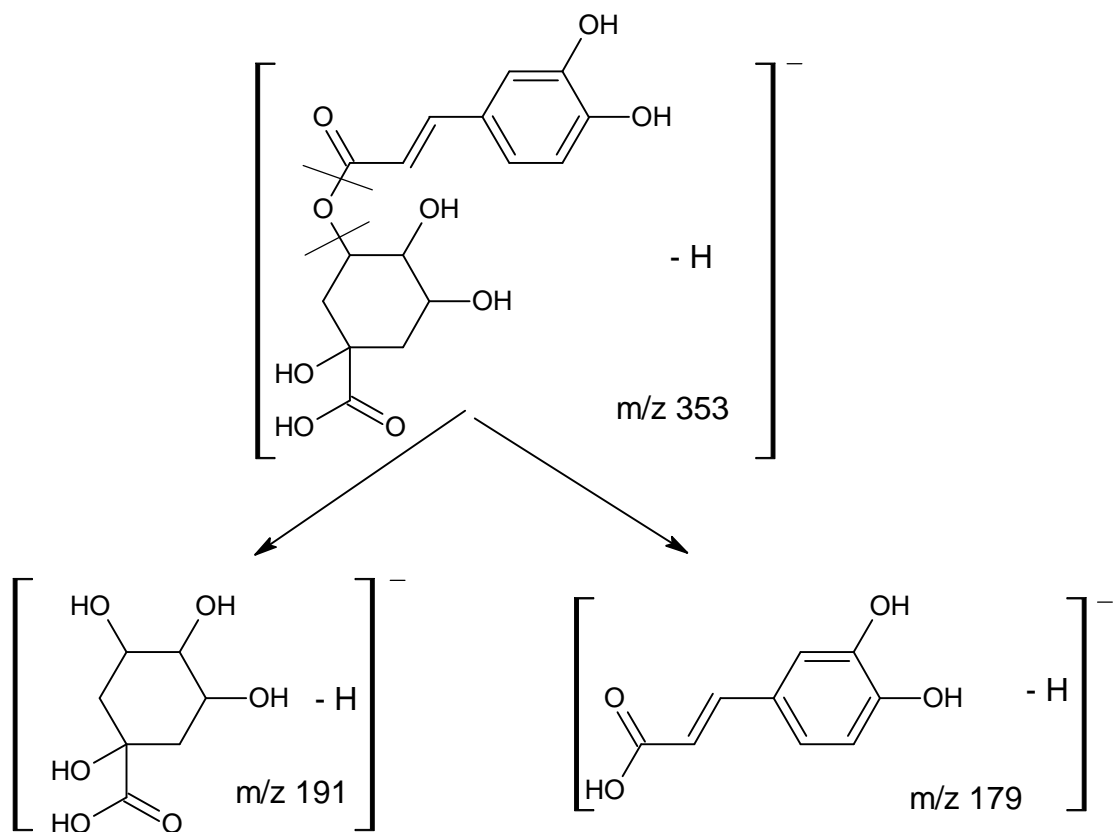
Obrázek 18: Navržené fragmentační spektrum kaempferol-3-glukosidu.

Další vybranou fragmentovanou látkou byla látka ze skupiny fenolických kyselin a to kyselina chlorogenová. Její MS a MS/MS spektrum je zobrazeno na obrázku 19.



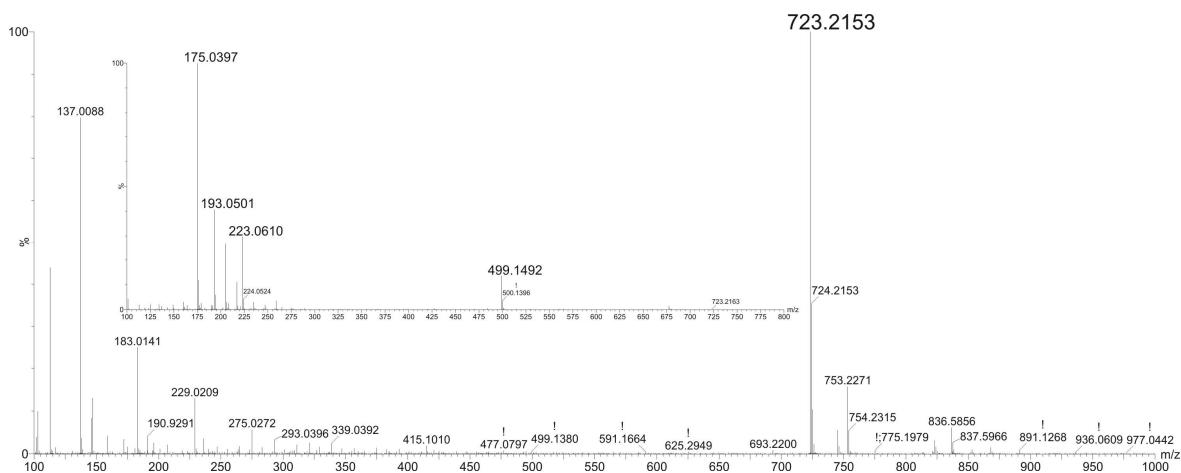
Obrázek 19: MS spektrum kyseliny chlorogenová (m/z 353) a ve výřezu její fragmentační MS/MS spektrum.

Na obrázku 20 lze vidět navržené fragmentační schéma této kyseliny. Odštěpením molekuly kyseliny kávové vzniká fragment o m/z 191 s nejvyšší intenzitou. S nižší intenzitou vzniká také samotná kyselina kávová o m/z 179.



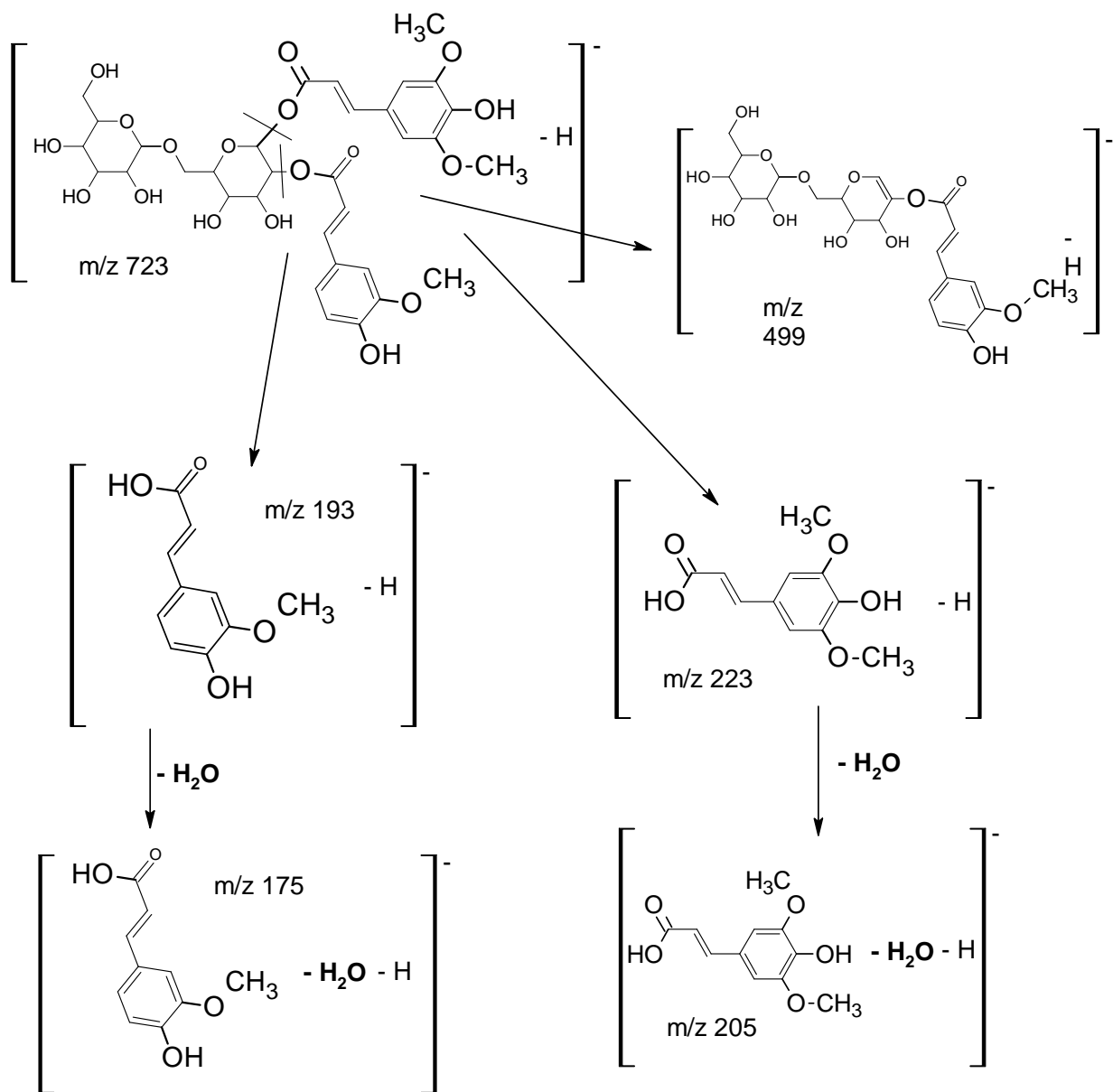
Obrázek 20: Navržené fragmentační spektrum kyseliny chlorogenové.

Další nalezenou látkou, která byla fragmentována pro potvrzení struktury, byla sinapoyl-feruloyl-gentiobiosa - disacharid s dvěma acylovanými fenolickými kyselinami. Na obrázku 21 je zobrazeno její MS spektrum s molekulovým píkem o $m/z \ 723$ a MS/MS spektrum ve výřezu.



Obrázek 21: MS spektrum sinapoyl-feruloyl-gentiobiosy (m/z 723) a ve výřezu fragmentační MS/MS spektrum.

Na obrázku 22 je navržené fragmentační schéma této látky. Ve spektru lze vidět jak dva fragmenty volných fenolických kyselin (sinapová s m/z 223 a ferulová s m/z 193), tak i jejich fragmenty po odštěpení molekuly vody s m/z 205 a m/z 175. Fragment s nejvyšší hodnotou m/z 499 se skládá z gentiobiosy a acylované kyseliny ferulové.



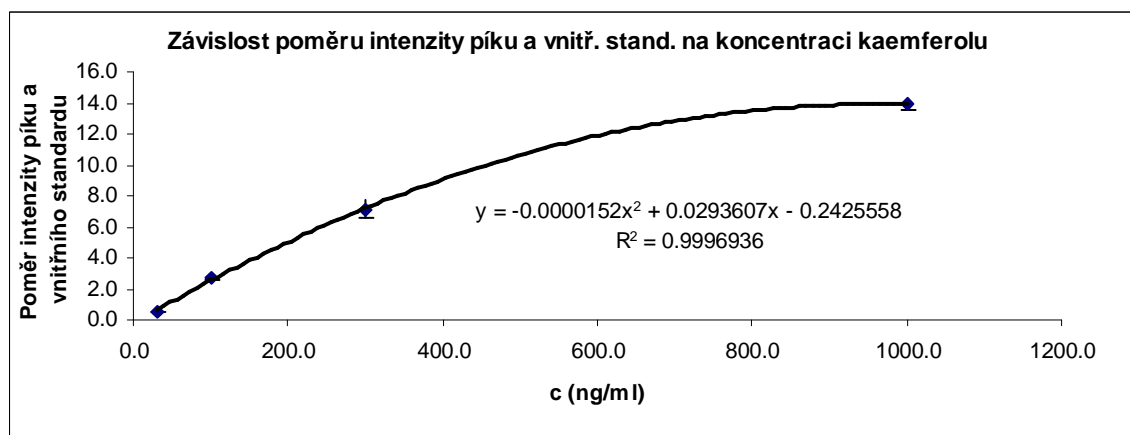
Obrázek 22: Navržené fragmentační spektrum sinapoyl-feruloyl-gentiobiosy.

4.2. Stanovení quercetinu a kaempferolu v extraktech brokolice

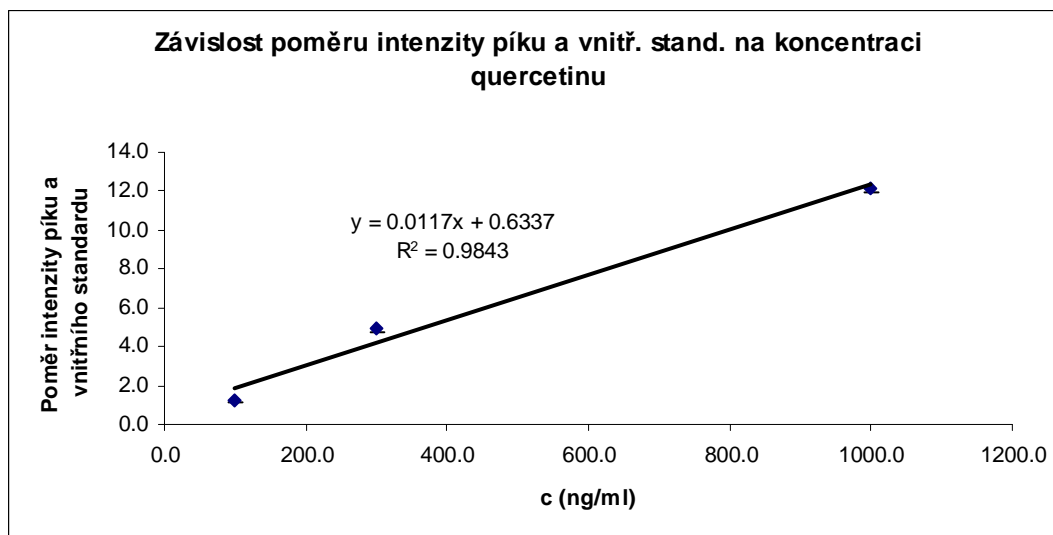
4.2.1. Kalibrační závislost

Pro stanovení kaempferolu byla použita kalibrační závislost v rozsahu koncentrací 30 až 1000 ng/ml. Závislost byla nejlépe popsána polynomickou rovnicí druhého stupně. Pro stanovení quercetinu byla použita lineární závislost.

Pro normalizaci odezvy byl při každém měření do mobilní fáze přidáván vnitřní standard leucin-enkefalinu o koncentraci 5 µg/ml.



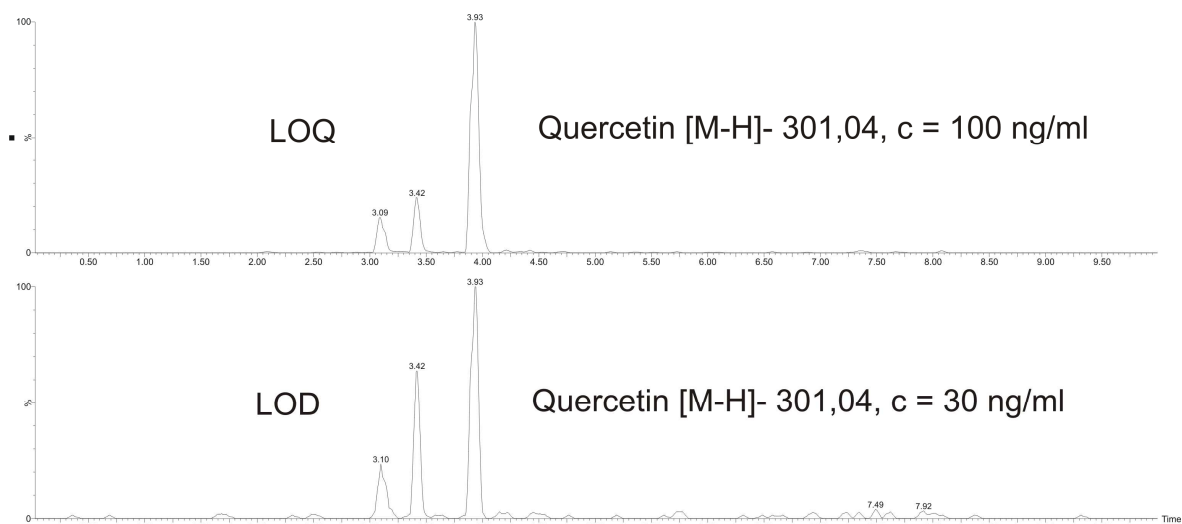
Obrázek 23: Kalibrační závislost kaempferolu v rozsahu koncentrací 30 až 1000 ng/ml.



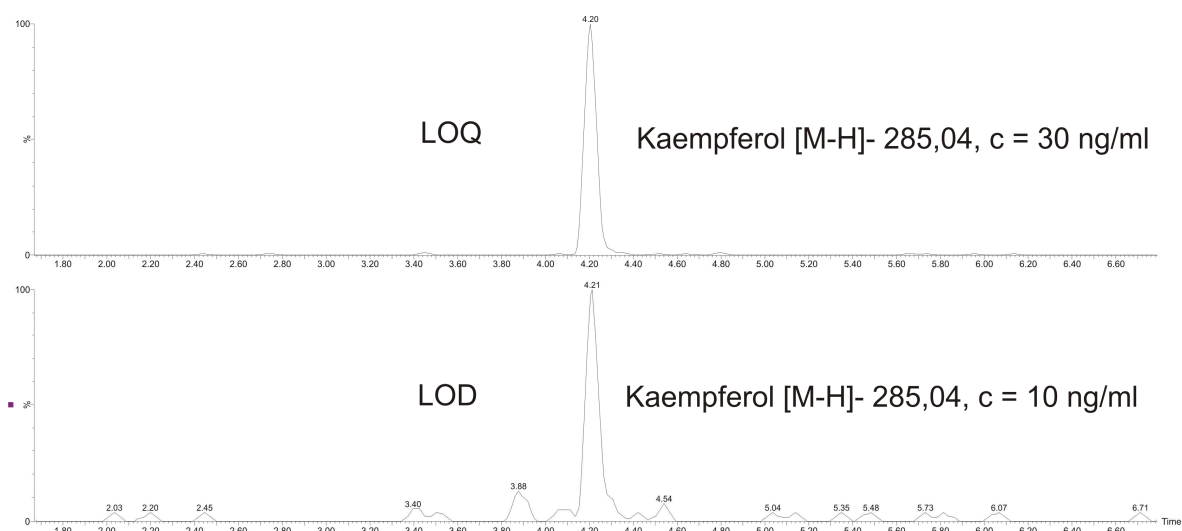
Obrázek 24: Kalibrační závislost quercetinu v rozsahu koncentrací 100 ng/ml až 1000 ng/ml.

Stanovení limitu detekce (LOD) a limitu kvantifikace (LOQ) bylo stanoveno metodou, kdy v případě LOD je poměr píku / šumu větší než 3 a v případě LOQ větší než 10.

Chromatogramy koncentrací, které splňují tyto požadavky jsou na obrázku 25 a 26. LOD pro kaempferol je koncentrace 10 ng/ml a LOQ 30 ng/ml. V případě quercetinu je LOD koncentrace 30 ng/ml a LOQ 100 ng/ml.



Obrázek 25: Chromatogramy quercetinu splňující kritéria poměru signál/šum pro LOD a LOQ.



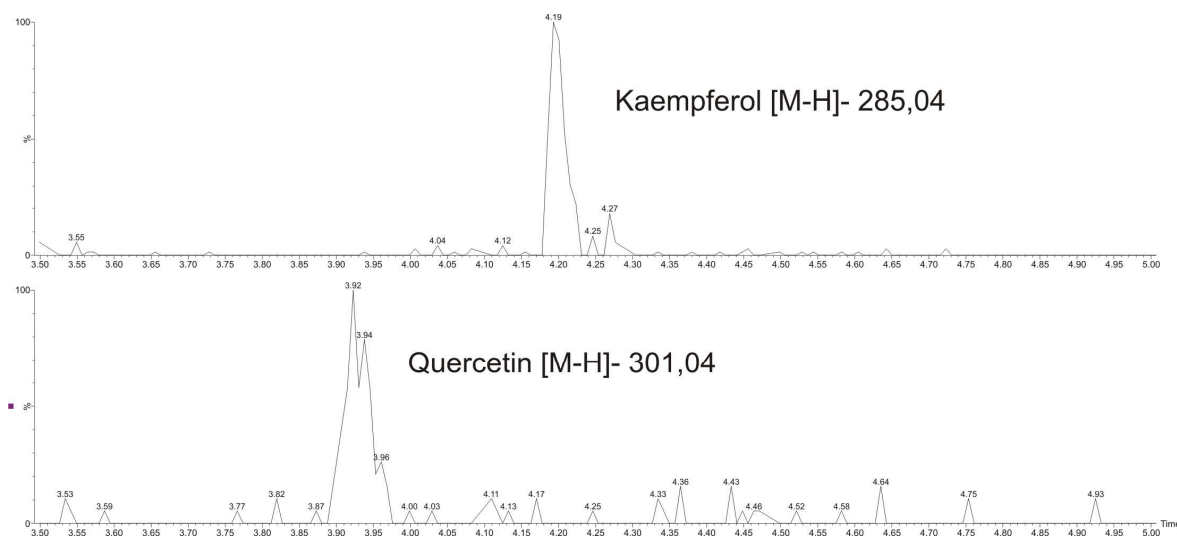
Obrázek 26: Chromatogramy kaempferolu splňující kritéria poměru signál/šum pro LOD a LOQ.

Pro studium výtěžnosti extrakce byl proveden experiment, kdy se k extraktu brokolice přidával přídavek standardu kaempferolu a quercetinu o stejné výsledné koncentraci 400 ng/ml. První přídavek byl během extrakce před SPE, druhý po SPE a třetí po hydrolyze.

Pro studium celkové výtěžnosti operací přípravy vzorku byl proveden experiment, kdy se ke vzorku přidával přídavek standardu kaempferolu a quercetinu o stejné výsledné koncentraci 400 ng/ml. První přídavek byl během extrakce před SPE, druhý po hydrolyze. Statistickým vyhodnocení výsledků na shodu stanovených koncentrací Q a K bylo zjištěno, že se koncentrace analytů ve vzorcích s oběma přídávky neliší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

4.2.2. Stanovení volného quercetinu a kaempferolu v rostlinném vzorku

Stanovení dvou látek - quercetinu a kaempferolu - bylo provedeno v rostlinném extraktu po přečištění a zakoncentrování na SPE kolonce. Každý vzorek byl 10x zředěn destilovanou vodou (po eluci v SPE byl vzorek v methanolu) a 3x změřen.



Obrázek 27: Chromatogram kaempferolu a quercetinu v extraktu po zakoncentrování na SPE.

Použité rostlinné vzorky byly čerstvá brokolice, brokolice vařená v páře a vařená ve vodě. Současně byly také oba analyty hledány ve vzorcích vývarů z vaření v páře a ve vodě, kde ovšem volný quercetin ani kaempferol nebyl detekován. Ve vzorku

brokolice vařené v páře a ve vodě byly koncentrace volného quercetinu a kaempferolu pod limitem kvantifikace a tak množství nemohlo být stanoveno.

Množství kaempferolu a quercetinu ve 100 g vzorku je uvedeno v Tabulce 4.

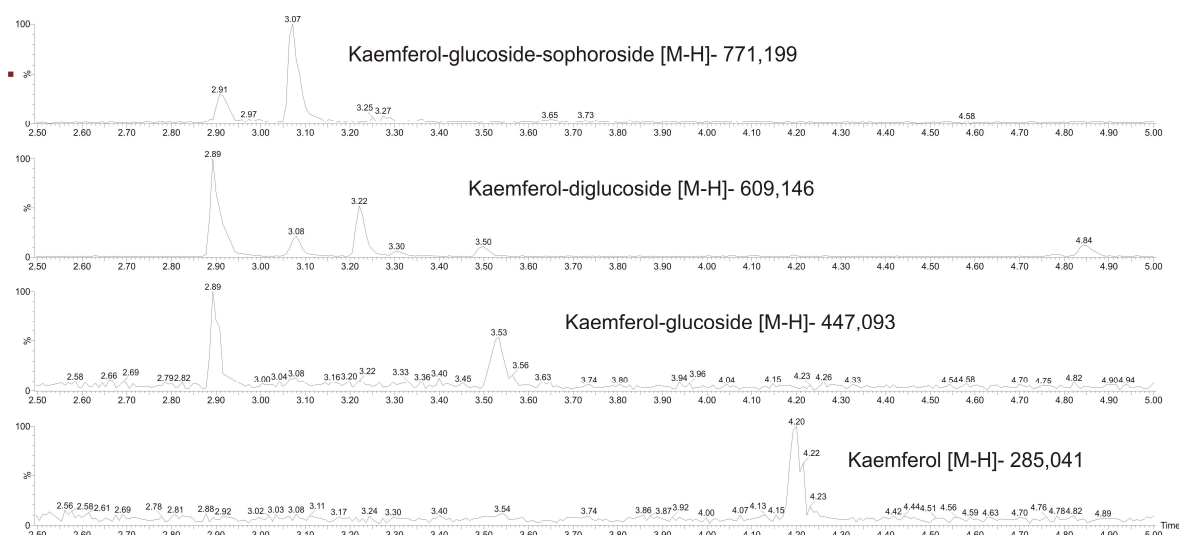
	Kaempferol	Quercetin
Typ úpravy	Obsah (µg) v 100 g	Obsah (µg) v 100 g
Čerstvá brokolice	702	n.q.
Vařená v páře	n.q.	n.q.
Vývar z vaření v páře	n.d.	n.d.
Vařená ve vodě	n.q.	n.q.
Vývar z vaření ve vodě	n.d.	n.d.

Tabulka 4: Obsah volného kaempferolu a quercetinu v brokolici (obsah ve 100 g čerstvé resp. tepelně upravené brokolice), n.d. znamená, že koncentrace analytu byla pod limitem detekce a n.q., že koncentrace analytu byla pod limitem kvantifikace.

Obsah volného kaempferolu a quercetinu se stanovoval vícekrát s několika různými vzorky brokolice. Množství bylo ale jen v jednom případě kvantifikováno, neboť obsah volných flavonolů kaempferolu a quercetinu je velmi nízký a v různých druzích brokolice se může lišit. Koh et al. udává, že celkový obsah těchto dvou látek, nejen volných aglykonů, se může lišit až o stovky procent v závislosti na ročním období.⁷⁵

Dalším vysvětlením, proč je obsah volného kaempferolu a quercetinu tak nízký, je, že tyto flavonoly jsou vázány jako glykosidy, což potvrzovala i LC/MS data těchto vzorků, kde se vyskytovaly tyto ionty: m/z 447 (kaempferol-glukosid), 609 (kaempferol-diglukosid či sophorosid) a 771 (kaempferol-glukosid-sophorosid). V případě quercetinu se jednalo o ionty: m/z 463 (quercetin-glukosid), 625 (quercetin-diglukosid či sophorosid) a 787 (quercetin-glukosid-sophorosid). Jejich identifikace byla již dříve potvrzena fragmentací.

Na obrázku 28 je vidět chromatogram s vybranými hmotami pro 4 glykosidy kaempferolu. Glykosidy s menší hmotou, ale eluující ve stejný retenční čas (např. m/z 447 a 609 v ret. čas 2,89) mohou být také produkty rozpadu během ionizace.



Obrázek 28: Chromatogram glykosidů kaempferolu ve vybraném ret. čase 2,5 až 5 minut s hmotami m/z 285 (aglykon kaempferol), 447, 609 a 771.

4.2.3. Stanovení kaempferolu a quercetinu po hydrolýze

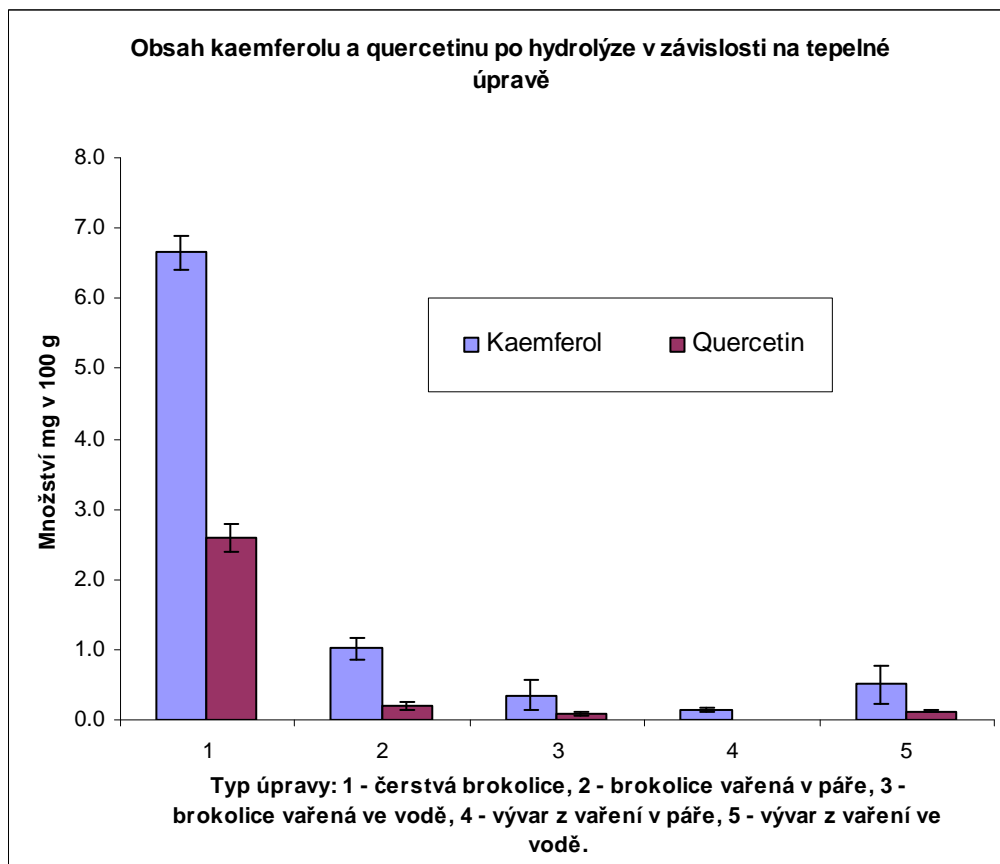
Protože se flavonoly v rostlinném materiálu vyskytují jako glykosidy, tak pro stanovení celkového obsahu flavonolů, konkrétně kaempferolu a quercetinu, byla provedena hydrolýza vzorku jak čerstvé tak tepelně upravené brokolice včetně odpovídajících vývarů.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5 a na grafu na obrázku 29.

	Kaempferol	Quercetin
Typ úpravy	Obsah (mg) v 100 g	Obsah (mg) v 100 g
Čerstvá brokolice	6.65	2.58
Vařená v páře	1.02	0.20
Vývar z vaření v páře	0.13	n.q.
Vařená ve vodě	0.35	0.08
Vývar z vaření ve vodě	0.50	0.12

Tabulka 5: Obsah kaempferolu a quercetinu v různě upravených vzorcích brokolice (přepočítaný na obsah ve 100 g čerstvé resp. tepelně upravené brokolice), n.q., že koncentrace analytu byla pod limitem kvantifikace.

Nejvyšší množství kaempferolu a quercetinu bylo stanoveno ve vzorku čerstvé brokolice a to 6,65 mg/100 g a 2,58 mg/100 g. Tyto hodnoty korespondují s výsledky Koh et al., kteří stanovovali množství kaempferolu a quercetinu v brokolice v závislosti na ročním období.⁷⁵



Obrázek 29: Vliv tepelného zpracování brokolice na celkový obsah zhydrolyzovaného kaempferolu a quercetinu.

Množství těchto dvou látek ovšem po tepelné úpravě, jak v páře, tak i ve vodě, výrazně kleslo. Obě látky jsou antioxidanty a tak je pravděpodobné, že se určitá část mohla přeměňovat díky svým redoxním vlastnostem.

Současně byly také analyzovány vývary z obou tepelných úprav a z výsledků vyplývá, že nejvíce látek se do vývaru extrahuje během vaření ve vodě. Obsah kaempferolu byl ve vodném vývaru více než 4x vyšší než v samotném uvařeném rostlinném materiálu, quercetinu 1,5x vyšší.

Možné srovnání může být s Vallejo et al.⁷⁶ V jejich studii srovnávali obsahy derivátů fenolických kyselin, především ale také obsah celkových flavonoidů po různé tepelné úpravě. Ve vzorku čerstvé brokolice byl stanoven obsah celkových flavonoidů na 65,9 mg/100 g. V případě vaření v páře klesl celkový obsah flavonoidů na 58,6 mg/100 g, zatímco při varu ve vodě až na 12,6 mg/100 g.⁷⁶ Z toho vyplývá, že při tepelné úpravě

obsah flavonoidů klesá, ve velké míře se extrahují do vody, kterou je vzorek obklopen a nejvyšší ztráty nastávají při klasickém vaření ve vodě.

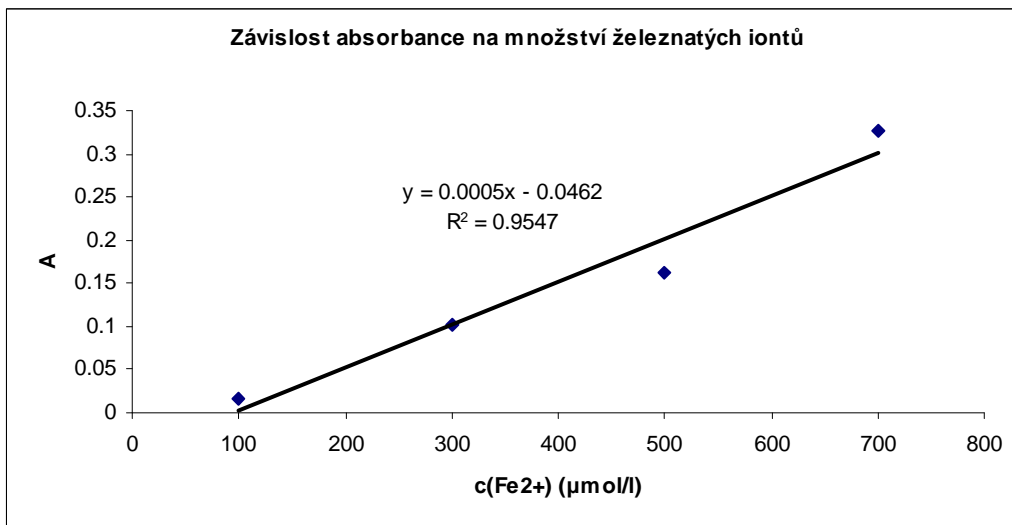
Podobnou studii vypracoval také Lopez-Berenguer et al.⁷⁷ Ti stanovovali celkový obsah polyfenolů v brokolici vařené v mikrovlnné troubě a z jejich výsledků vyplývá, že velký vliv na obsah polyfenolů v brokolici má také objem vody přidané k vařené zelenině.⁷⁷ Tento fakt v naší práci zohledněn nebyl, protože naším cílem bylo stanovit flavonoly i ve vývarech po vaření a proto bylo použito malé množství vody, aby se látky více zakoncentrovaly a byly kvantifikovatelné.

Přímé srovnání lze provést se studií dle Pellegrini et al.⁷⁸ V jejich práci stanovovali několik parametrů čerstvé a mražené brokolice po různých tepelných úpravách. Pro tuto práci je nejdůležitější výsledek stanovení kaempferolu a quercetinu po hydrolýze v čerstvé brokolici a to 18,4 a 23,5 mg/100 g vzorku. Po vaření ve vodě jejich hodnoty klesly na 8,4 a 10,0 mg/100 g vzorku a po vaření v páře 10,4 a 12,2 mg/100 g.⁷⁸

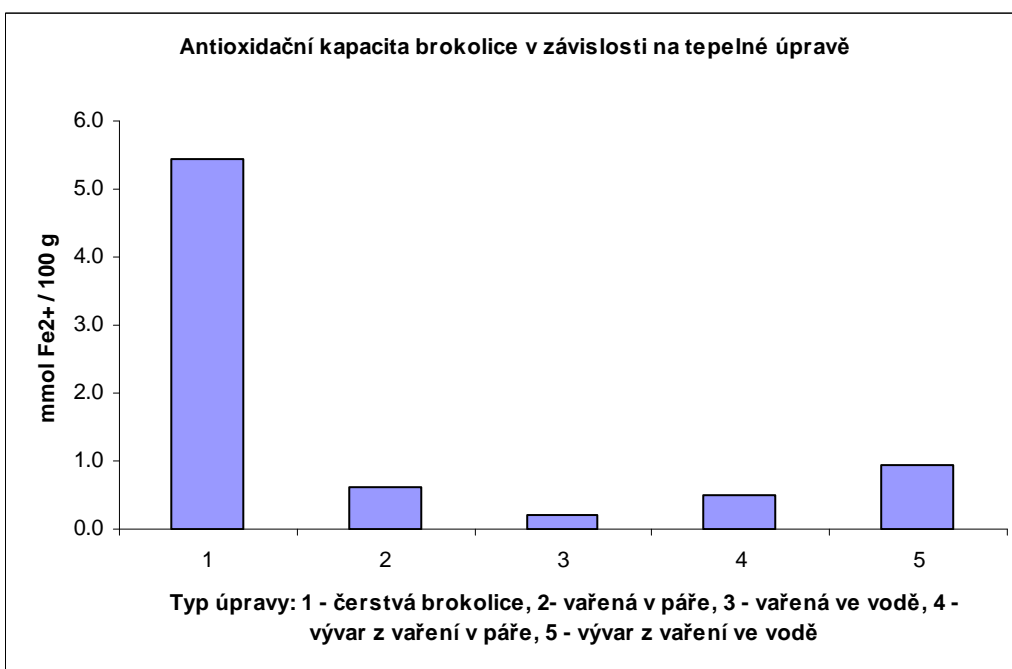
Při srovnání literárních údajů s výsledky z grafu na obrázku 29 je vidět, že v této práci byl pozorován větší pokles v množství kaempferolu a quercetinu po tepelné úpravě - možným důvodem může být materiál použité nádoby - nerezová ocel.

4.2.4. Stanovení antioxidační kapacity

Pro potvrzení výsledků ze studia vlivu tepelné úpravy brokolice na celkový obsah kaempferolu a quercetinu byla provedena nezávislá metoda stanovení antioxidační kapacity FRAP dle Benzie et al.⁴⁰ 60 µl vzorku přečištěného po SPE bylo smícháno s 1800 µl FRAP činidla a po daném čase byla změřena jejich absorbance. Dle kalibrační závislosti (viz. obrázek 30) byla zjištěna koncentrace zredukovaných železnatých iontů a přepočtena na 100 g vzorku brokolice. Výsledky jsou uvedeny v grafu na obrázku 31.



Obrázek 30: Kalibrační závislost absorbance na množství železnatých iontů.



Obrázek 31: Antioxidační kapacita brokolice v závislosti na tepelné úpravě.

Z grafu na obrázku 30 jde vidět, že nejvyšší antioxidační kapacitu měl vzorek čerstvé brokolice. To koreluje s výsledky ze stanovení kaempferolu a quercetinu po hydrolýze, kde jejich nejvyšší množství bylo také ve vzorku čerstvé brokolice a obsah s tepelnou úpravou výrazně klesal.

Miglio et al. na druhou stranu uvádí vyšší antioxidační kapacity pro brokolici vařenou v páře a ve vodě než pro čerstvou s využitím metody FRAP.⁷⁹ V případě čerstvé uvádí výsledek 5,23 mmol Fe²⁺ na 100 g vzorku, v případě vařené v páře ale 11,9 mmol

$\text{Fe}^{2+}/100\text{g}$ a vařené ve vodě $8,91 \text{ mmol Fe}^{2+}/100\text{g}$. Udávaný důvod je uvolnění karotenoidů z matrice, které přispívají k celkové antioxidační kapacitě.⁷⁹

Toto téma studoval také Roy et al.⁸⁰ Došel k podobným výsledkům, že antioxidační kapacita stanovená metodou FRAP se po vaření v páře zvyšuje. Po chromatografické studii zjistili, že ke zvýšení kapacity přispívají nefenolické frakce a také možnost lepší extrakce vázaných a volných polyfenolů z rostlinné matrice.⁸⁰

Další stanovení pomocí metody FRAP bylo provedeno ve studii dle Wachtel-Galor et al.⁸¹ V jejich případě také stanovovali antioxidační kapacitu v rostlinách rodu brukvovitých a po tepelné úpravě. V případě nevařené brokolice stanovili $0,39 \text{ mmol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$, zatímco ve vařené v páře $1,22 \text{ mmol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$ a vařené ve vodě $0,65 \text{ mmol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$.⁸¹ Z těchto výsledků vyplývá, že absolutní hodnoty se mohou lišit, ale antioxidační kapacita se s varem v páře se zvyšuje.

Poslední srovnání je s Zhang et al.⁸² V jejich studii dokonce stanovovali antioxidační kapacitu odděleně v košťálu a vrchní části brokolice metodou DPPH, tzn. reakcí se stabilním volným radikálem. Z jejich výsledků vyplývá, že už po 5-ti minutách varu ve vodě antioxidační kapacita klesá na třetinu své původní z čerstvého vzorku v obou částech brokolice stejně.⁸²

5. ZÁVĚR

V analýze rostlinného materiálu a stanovení nízkomolekulárních látek je velmi výhodné použít spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie a proto bylo využito i v tomto případě.

Tato metoda zde byla využita k identifikování některých polyfenolových látek ve vzorcích brokolice a následně stanovení dvou flavonolů - kaempferolu a quercetinu. Byla také studována tepelná úprava rostlinného vzorku a to var v páře a ve vodě.

Dva nejvyskytovanější flavonoly - kaempferol a quercetin - se vyskytují v rostlinném materiálu jak volně, tak i navázané jako glykosidy. Proto byly nejdříve stanoveny volné flavonoly s výsledky v řádech desítek až stovek μg ve 100 g vzorku a poté byla provedena hydrolýza všech vzorků pro uvolnění aglykonů z jejich glykosidů. Množství kaempferolu a quercetinu pak bylo v řádu jednotek mg v 100 g vzorku s nejvyšší hodnotou kaempferolu 6,65 mg/100 g čerstvého vzorku.

Na závěr byl proveden test na stanovení antioxidační kapacity s výsledkem, že nejvyšší kapacita se nachází ve vzorku čerstvé brokolice a po tepelné úpravě kapacita výrazně klesá. To velmi dobře koresponduje s výsledky hmotnostně spektrometrického stanovení kaempferolu a quercetinu po hydrolýze, kde nastával podobný trend.

6. LITERATURA

1. Tsao et al.: Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *Nutrients*, 2, 1231, 2010.
2. Ajila et al.: Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends, *Critical Reviews in Biotechnology*, 31, 3, 2011.
3. Cartea et al.: Phenolic Compounds in Brassica Vegetables, *Molecules*, 16, 251, 2011.
4. Rice-Evans et al.: Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids, *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 7, 1996.
5. Robbins et al.: Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2866, 2003.
6. Herrmann et al.: The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds, *The Plant Cell*, 7, 907, 1995.
7. Ignat et al.: A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 126, 1821, 2011.
8. Merken et al.: Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3, 2000.
9. Kawaii et al.: Quantitation of Flavonoid Constituents in Citrus Fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 9, 1999.
10. Mazur et al.: Phytoestrogen content in foods, *Baillieres Clinical Endocrinology and Metabolism*, 12, 4, 1998.
11. Volka K., et al.: *Analytická chemie II. 1997*, VŠCHT Praha.
12. Unger et al.: Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal. *Journal of Chromatography A*, 1184, 1-2, 2008.
13. Ballschmitter et al.: Recent developments in adsorption liquid chromatography (NP-HPLC). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 361, 8, 1998.
14. Dorsey et al.: The molecular mechanism of retention in RP-LC. *Chemical Reviews*, 89, 2, 1989.

15. Rafferty et al.: Retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography: A molecular perspective. *Analytical Chemistry*, 79, 17, 2007.
16. Jerkovich et al.: The Use of Micrometer-Sized Particles in Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography, *LCGC Asia Pacific*, 6, 4, 2003.
17. Swartz et al.: UPLC: An Introduction and Review, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 1253, 2005.
18. Wu et al.: Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations, *Journal of Separation Science*, 30, 1167, 2007.
19. Mamone et al.: Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques. *Journal of Chromatography A*, 1216, 43, 2009.
20. Fenselau et al.: Mass spectrometry in the exploration of Mars – Introduction. *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 1, 2003.
21. Hoffmann E.d., Stroobant V.: *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 2007, 3rd edition.
22. Rudge et al.: Theory of ionization of atoms by Electron Impact. *Reviews of Modern Physics*, 40, 3, 1968.
23. Rosenberg et al.: On electron impact – ionization theory. *Physica Scripta*, 77, 1, 2008.
24. Yamashita et al.: Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *The Journal of Physical Chemistry*, 88, 20, 1984.
25. Eberlin et al.: Electrospray ionization mass spectrometry: a major tool to investigate reaction mechanisms in both solution and the gas phase. *European Journal of Mass Spectrometry*, 13, 1, 2007.
26. Carroll et al.: Atmospheric-pressure ionization mass-spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews*, 17, 3, 1981.
27. Andrade et al.: Atmospheric pressure chemical ionization source. 1. Ionization of compounds in the gas phase. *Analytical Chemistry*, 80, 8, 2008.
28. Goodwin et al.: Protein and peptides in pictures: Imaging with MALDI mass spectrometry. *Proteomics*, 8, 18, 2008.
29. Todd et al.: Ion Trap Mass-Spectrometer – Past, Present and Future. *Mass Spectrometry Reviews*, 10, 1, 1991.

30. McLuckey et al.: Quadrupole ion trap mass spectrometry – Introduction. *International Journal of Mass Spectrometry*, 191, 1999.
31. Wiley et al.: Time of flight Mass Spectrometer with improved resolution. *Review of Scientific Instruments*, 26, 12, 1955.
32. Bonesini et al.: A review of recent techniques of TOF detectors. *Astroparticle, Particle and Space Physics, Detectors and Medical Physics Application*, 2004.
33. Chernushevich et al.: An introduction to quadrupole–time-of-flight mass spectrometry, *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*, 36, 849, 2001.
34. Marshall et al.: Fourier transform ion cyclotron resonance detection: Principles and experimental configurations, *International Journal of Mass Spectrometry*, 215, 59, 2002.
35. Fryčák P.: *Mass Spectrometry in The Study of Interactions of Amino Acids and Peptides with Small Molecules*, 2005.
36. Koppenaal et al.: MS Detectors. *Analytical Chemistry*, 77, 21, 2005.
37. Zhou et al.: Critical review of development, validation, and transfer for high throughput bioanalytical LC-MS/MS methods. *Current Pharmaceutical Analysis*, 1, 1, 2005.
38. Liu et al.: Advances of Modern Chromatographic and Electrophoretic Methods in Separation and Analysis of Flavonoids, *Molecules*, 13, 2521, 2008.
39. Niki et al.: Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo, *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 503, 2010.
40. Benzie et al.: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ‘‘Antioxidant Power’’: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70, 1996.
41. Forrest et al.: The Distribution of Polyphenols in the Tea Plant, *Biochemistry Journal*, 113, 741, 1969.
42. Krzyzanowska et al.: Determination of Polyphenols in *Mentha longifolia* and *M. piperita*, *Journal of AOAC International*, 94, 1, 2011.
43. Gioachinni et al.: HPLC-MS analysis of phenolic acids and aldehydes, *Journal of Chromatography A*, 730, 31, 1996.
44. Inbaraj et al.: Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–ESIMS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 549, 2010.

45. Schieber et al.: Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 910, 265, 2001.
46. Valverdu-Queralt et al.: Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF), *Food Chemistry*, 129, 877, 2011.
47. Boros et al.: Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in *Thymus* species, *Journal of Chromatography A*, 1217, 7972, 2010.
48. Zhang et al.: Characterization of flavone glycosides and aglycones in *Cephalotaxus sinensis* by HPLC-DAD-MS, *Analytical Methods*, 3, 6, 2011.
49. Vallejo et al.: Characterisation of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography–UV diode-array detection–electrospray ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1054, 181, 2004.
50. Cavaliere et al.: Rapid-resolution liquid chromatography/mass spectrometry for determination and quantitation of polyphenols in grape berries, *RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY*, 22, 2089, 2008.
51. Holecker et al.: Simultaneous determination of polyphenolic compounds in red and white grapes grown in Sardinia by high performance liquid chromatography–electron spray ionisation mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216, 3402, 2009.
52. Truchado et al.: Liquid chromatography–tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers, *Journal of Chromatography A*, 1216, 7241, 2009.
53. Robards et al.: Characterisation of Citrus by Chromatographic Analysis of Flavonoids, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 75, 87, 1997.
54. Milbury et al.: Determination of Flavonoids and Phenolics and Their Distribution in Almonds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5027, 2006.
55. Calderon et al.: Screening Antioxidants Using LC-MS: Case Study with Cocoa, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5693, 2009.

56. Chandrasekara et al.: Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MS, *JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS*, 3, 144, 2011.
57. Vitrac et al.: Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection, *Analytica Chimica Acta*, 458, 103, 2002.
58. Chen et al.: Quantitative determination and structural characterization of isoflavones in nutrition supplements by liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1082, 60, 2005.
59. Clarke et al.: Determination of Phytoestrogens in dietary supplements by LC-MS/MS, *Food Additives and Contaminants*, 5, 534, 2008.
60. Klejdus et al.: Hyphenated technique for the extraction and determination of isoflavones in algae: Ultrasoundassisted supercritical fluid extraction followed by fast chromatography with tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217, 7956, 2010.
61. Montoro et al.: Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *Journal of Chromatography A*, 1112, 232, 2006.
62. Macz-Pop et al.: Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *Food Chemistry*, 94, 448, 2006.
63. Papoušková et al.: Advanced liquid chromatography/mass spectrometry profiling of anthocyanins in relation to set of red wine varieties certified in Czech Republic, *Journal of Chromatography A*, 1218, 7581, 2011.
64. Myjavcová et al.: Analysis of anthocyanin pigments in *Lonicera* (*Caerulea*) extracts using chromatographic fractionation followed by microcolumn liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217, 7932, 2010.
65. Perret et al.: Analysis of Oligomeric and Polymeric tannins of grape berries by LC-MS/MS, *Journal of Mass Spectrometry*, 7, 419, 2001.

66. Cai et al.: Phenolic Antioxidants (Hydrolyzable Tannins, Flavonols, and Anthocyanins) Identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from *Rosa chinensis* Flowers, , *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9940, 2005.
67. Jastrebova et al.: Selective and Sensitive LC-MS Determination of Avenanthramides in Oats, *Chromatographia*, 63, 419, 2006.
68. Barbero et al.: Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column, *Food Chemistry*, 107, 1276, 2008.
69. Chiva-Blanch et al.: Determination of resveratrol and piceid in beer matrices by solidphase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1218, 698, 2011.
70. Cuyckens et al.: Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids, *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*, 39, 1, 2004.
71. Vukics et al.: Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage MS, *Mass Spectrometry Reviews*, 29, 1, 2010.
72. Price et al.: Composition and Content of Flavonol Glycosides in Broccoli Florets (*Brassica olearacea*) and their Fate during Cooking, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 468, 1998.
73. Moreno et al.: Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1508, 2006.
74. Chen et al.: Analysis of flavonoid constituents from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms by electrospray tandem MS, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16, 264, 2002.
75. Koh et al.: Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli, *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 637, 2009.
76. Vallejo et al.: Phenolic compound contents in edible parts of broccoli inflorescences after domestic cooking, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1511, 2003.
77. Lopez-Berenguer et al.: Effects of Microwave Cooking Conditions on Bioactive Compounds Present in Broccoli Inflorescences, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10001, 2007.

78. Pellegrini et al.: Effect of Different Cooking Methods on Color, Phytochemical Concentration, and Antioxidant Capacity of Raw and Frozen Brassica Vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4310, 2010.
79. Miglio et al.: Effects of Different Cooking Methods on Nutritional and Physicochemical Characteristics of Selected Vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 139, 2008.
80. Roy et al.: Steam processed broccoli (*Brassica oleracea*) has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems, *Food Chemistry*, 114, 263, 2009.
81. Wachtel-Galor et al.: The effect of cooking on Brassica vegetables, *Food Chemistry*, 110, 706, 2008.
82. Zhang et al.: Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking, *Food Chemistry*, 88, 503, 2004.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ROS	reactive oxygen species
PPh	polyphenolics
LDL	low-density lipoprotein
HPLC	high-performance liquid chromatography
SF	stationary phase
PC	paper chromatography
TLC	thin layer chromatography
NP	normal phase
RP	reverse phase
LC	liquid chromatography
CEC	capillary electrochromatography
U-HPLC	ultrahigh pressure liquid chromatography
GC-MS	gas chromatography - mass spectrometry
q-TOF	quadrupole-time of flight
SPE	solid phase extraction
M ⁺	kation radikál
MH ⁺	molekulový ion
EI	electron ionization
CI	chemical ionization
ESI	electrospray ionization
API	atmospheric pressure ionization
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
APPI	atmospheric pressure photo ionization
TSP	thermospray
MALDI	matrix assisted laser desorption / ionization
FAB	fast atom bombardment
FIB	fast ion bombardment
m/z	mass to charge ratio
TOF	time of flight
ICR	ion cyclotron resonance

DAD	diode array detector
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Power
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
MRM	multiple reaction monitoring
SPE	solid-phase extraction