

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na  
stanovení kyseliny chikorové a dalších derivátů kyseliny  
kávové pomocí LC/MS**

**Bakalářská práce**

**Nela Pazderková**

Vedoucí práce: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2021

Pazderková, N., 2021: Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení kyseliny chikorové a dalších derivátů kyseliny kávové pomocí LC/MS. [Development, optimization and validation of an analytical method for determination of chicoric acid and other caffeic acid derivatives using LC/MS. Bc. Thesis, in Czech.] – 67 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

This thesis deals with the development, optimization, and validation of an analytical method for the determination of chicoric acid and other caffeic acid derivatives using LC/MS. First, the development and optimization of the analytical method was conducted. The following parameters were selected for the optimization: mobile phase composition and flow rate injection volume capillary temperature, voltage S-lens and F-lens voltage, ion injection time, product ion selection, and collision energy. Then, the analytical method was successfully validated and tested for quantitative analysis in a range of Echinacea food matrixes – tea, tablet, and tincture.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 14. 4. 2021

.....

### **Klíčová slova**

Kyselina chikorová, kyselina kávová, kyselina kaftarová, kyselina chlorogenová, cynarin, echinakosid, antioxidanty, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie, optimalizace, validace.

### **Key words**

Chicoric acid, caffeic acid, caftaric acid, chlorogenic acid, cynarin, echinacosid, antioxidants, mass spectrometry, liquid chromatography, optimization, validation.

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady, ochotu kdykoliv pomoci a motivaci v průběhu celé práce.

Dále bych také chtěla poděkovat své rodině a přátelům za velkou podporu a pomoc.

## OBSAH

1	CÍLE PRÁCE .....	1
2	ÚVOD .....	2
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	3
3.1	<i>Echinacea</i> a její využití .....	3
3.1.1	Distribuce fenolických sloučenin v <i>Echinacea</i> .....	4
3.1.2	Charakteristika významných fenolických sloučenin v <i>Echinacea</i> .....	5
3.1.2.1	Kyselina kávová .....	6
3.1.2.2	Deriváty kyseliny kávové .....	6
3.2	Kvantitativní analýza fenolických sloučenin v rostlinných matricích.....	9
4	MATERIÁL A METODY .....	12
4.1	Použité chemikálie a činidla .....	12
4.2	Instrumentální vybavení a spotřební materiál.....	12
4.3	Příprava roztoků standardů a reálných vzorků .....	13
4.3.1	Příprava mobilních fází .....	13
4.3.2	Příprava zásobních roztoků standardů a vnitřního standardu.....	13
4.3.3	Příprava směsných pracovních roztoků standardů .....	14
4.3.4	Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu .....	15
4.3.5	Příprava kalibračních roztoků.....	15
4.3.6	Příprava kontrolních roztoků .....	16
4.3.7	Příprava reálných vzorků.....	16
4.3.7.1	Čaj .....	16
4.3.7.2	Tinktura .....	18
4.3.7.3	Tableta .....	19
5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	20
5.1	Přímá infuze a testovací LC-MS/MS analýza .....	20
5.2	Optimalizace podmínek chromatografické separace .....	21
5.2.1	Složení mobilní fáze .....	21

5.2.2	Gradientový program.....	22
5.2.3	Objem nástřiku .....	23
5.3	Optimalizace hmotnostní detekce.....	23
5.3.1	Vyhřívání elektrosprej .....	24
5.3.2	Iontová optika (S-čochky a F-čochky) .....	24
5.3.3	Kolizní energie .....	24
5.4	Validace analytické metody.....	25
5.4.1	Linearita.....	26
5.4.2	Přesnost a správnost .....	26
5.4.3	Rozsah .....	28
5.4.4	Mez detekce a mez stanovitelnosti .....	28
5.5	Konečné podmínky LC separace a LC detekce.....	29
5.6	Validace metody pro vzorky s přírodní maticí.....	31
5.6.1	Čaj.....	31
5.6.2	Tinktura .....	32
5.6.3	Tableta .....	32
5.7	Analýza reálných vzorků .....	34
6	ZÁVĚR .....	36
7	CITOVANÁ LITERATURA.....	37
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	43
9	PŘÍLOHY .....	45
9.1	Příloha A.....	45
9.2	Příloha B.....	46
9.3	Příloha C .....	47
9.4	Příloha D.....	48
9.5	Příloha E .....	49
9.6	Příloha F .....	50
9.7	Příloha G.....	51

9.8	Příloha H.....	52
9.9	Příloha CH.....	53
9.10	Příloha I.....	54
9.11	Příloha J.....	55
9.12	Příloha K.....	56
9.13	Příloha L.....	58
9.14	Příloha M.....	60
9.15	Příloha N.....	62
9.16	Příloha O.....	64
9.17	Příloha P.....	66

# 1 CÍLE PRÁCE

- Vypracovat literární rešerši na dané téma.
- Vypracovat analytickou metodu na stanovení kyseliny chikorové a dalších derivátů kyseliny kávové pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS) včetně provedení základní optimalizace této analytické metody.
- Provést validaci analytické metody pro použití na analýzu modelových vzorků neobsahující přírodní matrici.
- Provést validaci analytické metody pro použití na analýzu reálných vzorků obsahující vybranou přírodní matrici (např. extrakt, čaj, sirup, tableta, kořen rostliny apod.).



## 2 ÚVOD

V posledních desetiletích dochází k výrazným změnám ve způsobu života i v životosprávě člověka. Tempo života se neustále zrychluje ve všech oblastech jeho činnosti nebo naopak může být silně ovlivněno dlouhotrvajícími protiepidemickými opatřeními, což se často negativně projevuje zvýšenou mírou stresu a současně i zhoršením stravovacích návyků. Za těchto podmínek pak dochází v organismu ke zvýšené tvorbě volných radikálů, které jej postupně poškozují a mohou iniciovat řadu vážných onemocnění. Pro minimalizaci těchto rizik je nezbytné nejen adekvátně upravit životní styl, ale i podpořit obranné funkce organismu kvalitnější stravou a vhodnými doplňky stravy obsahující dostatečné množství sloučenin s antioxidační aktivitou.

Jednou ze skupin sloučenin s významnými antioxidačními účinky jsou fenolické kyseliny, které se přirozeně vyskytují v rostlinách. Mezi nejznámější zástupce patří různé druhy rostlin rodu *Echinacea* obsahující poměrně vysoká množství kyseliny chikorové a dalších derivátů kyseliny kávové např. kyselinu chlorogenovou, echinakosid, cynarin aj. Tyto a další podobné rostlinné zdroje pak člověk využívá většinou ve formě čajů, tinktur, tablet nebo pastilek pro podporu svého imunitního systému, ať už jako prevenci, nebo za účelem rychlejší rekonvalescence po prodělaném onemocnění. V naprosté většině případů se ale jedná o potraviny nebo doplňky stravy, takže u nich nemohou být garantovány léčebné nebo preventivní vlastnosti, neprochází posuzováním a schvalováním Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL), v jehož rámci jsou důkladně a objektivně hodnoceny mj. i jakost a složení. Vzhledem k poměrně vysoké ceně potravních doplňků a nákladnějším potravin pak častěji dochází k jejich nejrůznějšímu falšování nebo k používání ekonomicky výhodnějších technologií, které však mohou negativně ovlivňovat jakost výrobku. Z těchto důvodů je žádoucí disponovat vhodnými analytickými metodami, které jsou schopny spolehlivě prokázat obsah vybraných důležitých sloučenin nebo složek i v těch nejsložitějších maticích. Analytické metody mohou být rovněž využity k vývoji a optimalizaci technologií používaných při zpracování výchozích surovin a následné výrobě konečných produktů.

Mezi nejvhodnější analytické techniky pro kvalitativní i kvantitativní stanovení organických sloučenin patří kapalinová chromatografie, která v kombinaci s hmotnostní detekcí patří k nejefektivnějším nástrojům. Cílená kvantitativní analýza je sice doménou zejména trojitých kvadrupólů, ale v některých případech může být zajímavých analytických parametrů dosaženo i duální lineární iontovou pastí, což bylo zvoleno jako téma této bakalářské práce.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 *Echinacea* a její využití

*Echinacea* je latinský název populární léčivé byliny z rodu *Echinacea*, která pochází ze Severní Ameriky a je také známá pod názvem třapatkovka. Rod *Echinacea* byl oddělen od rodu *Rudbeckia* a nějaký čas se oba rody nazývaly stejným českým jménem třapatka. Tato známá bylina patří do čeledi hvězdnicovité (*Asteraceae*, též *Compositae*), která se řadí mezi čeled' vyšších dvouděložných rostlin z řádu hvězdnicotvaré.

Doposud bylo popsáno devět druhů této rostliny. V bylinných přípravcích se vyskytují pouze tři: *Echinacea purpurea* (Obr. 1), *Echinacea angustifolia*, a *Echinacea pallida*. Dalšími méně známými druhy, které léčivé účinky nemají jsou: *E. atrorubens*, *E. laevigata*, *E. paradoxa*, *E. sanguinea*, *E. simulate* a *E. tennesseensis* [1,2].



Obr. 1: *Echinacea purpurea* [3].

*Echinacea* byla poprvé zpracovávána a využívána domorodými obyvateli Severní Ameriky k léčbě různých nemocí. Ve 20. letech 20. století byla zkoumána v Německu a od té doby se stala populární rostlinou užívanou především k léčbě respiračních infekcí [4,5]. Mnohé studie však imunomodulační účinky této rostliny nepotvrdily. Ve většině případů nebyl prokázán významný vliv na průběh nachlazení, došlo pouze ke zmírnění závažnosti a zkrácení doby trvání běžného nachlazení [4,6].

Imunomodulační účinky jsou způsobené aktivací fagocytózy, stimulací fibroblastů, zvýšením respirační aktivity a zvýšením pohyblivosti leukocytů [7]. Kromě těchto účinků mají extrakty z *Echinacea* také antioxidační, antibakteriální, antivirové a antifungální účinky. Tyto vlastnosti jsou připisovány nejaktivnějším sloučeninám rostliny, především fenolovým

kyselinám. Fenolové kyseliny obsažené v rostlině jsou zejména deriváty kyseliny kávové: kyselina chikorová, kyselina kaftarová, kyselina chlorogenová, cynarin a echinakosid. Dále se v rostlině vyskytují alkyl amidy (alkamidy), polysacharidy, flavonoidy, polyacetyleny, glykoproteiny a éterické oleje [7,8,9].

*Echinacea* je dlouhá léta využívána např. při bolesti dásní, zubů, hlavy, respiračních a močových problémech, střevních potížích nebo je také využívána při hadím nebo komářími kousnutí. V poslední době se díky svým farmakologickým účinkům stala potenciálním kandidátem na léčbu nemoci COVID-19 [2,9].

V dnešní době je mnoho přípravků obsahující *Echinacea* využíváno pro prevenci a léčbu příznaků nachlazení, chřipky a zánětlivých stavů spojených s infekcemi. Tyto přípravky se konzumují převážně orálně ve formě vodných nebo ethanolových extraktů a tinktur – tablet, kapiček, mastiček nebo čajů [10]. Například užíváním 90 kapek/den vodně-etanolické tinktury z kořenů *E. purpurea* a *E. pallida* došlo u bakteriálních a virových infekcí ke zkrácení doby jejich trvání o 3,2–3,9 dne [11,12].

### 3.1.1 Distribuce fenolických sloučenin v *Echinacea*

V různých částech rostlin je přítomno různé množství bioaktivních látek vykazující značnou variabilitu na základě mnoha faktorů, včetně genotypu, druhu, počasí a podnebí, části rostliny využitých při extrakci, extrakčního způsobu a roli hraje také doba sklizně, zpracování a podmínky skladování [2]. Přehled významných fenolických sloučenin, které jsou přítomny v různém množství a různých částech rostlin je uveden v Tab. 1.

Tab. 1: Orientační přehled množství [mg/100 g] vybraných fenolických látek v *Echinacea purpurea*.

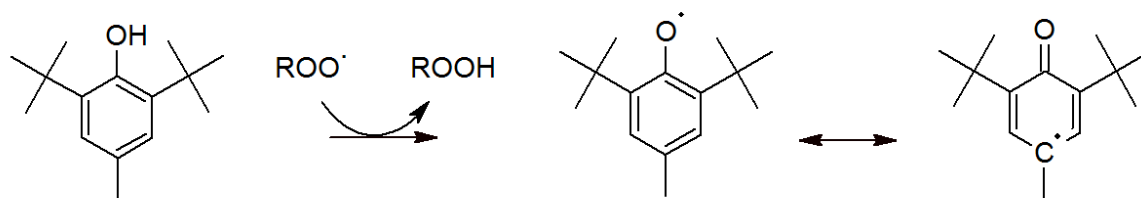
Sloučeniny	Kořen	Stonek	List	Květ	Celá rostlina	Zdroj
[mg/100 g]						
Kyselina kávová	0,1	-	-	-	-	[12]
Kyselina chikorová	254,56	92,56	390,68	159,62	242,28	[13]
Kyselina kaftarová	4,69	4,71	-	9,84	4,48	[13]

Například *E. purpurea* má podobné složení kyseliny chikorové, kyseliny kaftarové a kyseliny chlorogenové v kořenech a nadzemních částech, zatímco cynarin a echinakosid jsou v *E. purpurea* přítomny jen velmi málo nebo zcela chybí. Kořeny *E. angustifolia* vykazují nízké množství kyseliny chikorové a cynarinu, zatímco kořeny *E. pallida* obsahují jak

kyselinu chikorovou, tak cynarin, přičemž echinakosid je hlavní složkou obou druhů [11]. V léčitelství a farmacii se především využívají kořeny obsahující esenciální oleje a květy.

### 3.1.2 Charakteristika významných fenolických sloučenin v Echinacea

Vlastnosti kyseliny kávové a jejích derivátů jsou dány jejich specifickou strukturou obsahující karboxylové a hydroxylové skupiny, které zvyšují rozpustnost ve vodě a alkoholu a jsou také zodpovědné za řadu biologických a farmakologických účinků, z nichž jsou pro člověka nejvýznamnější antioxidační účinky. Volné fenolové hydroxyly (*o*-dihydroxylové), stejně jako jejich počet a poloha na fenylovém kruhu, snižují entalpii disociace vazby hydroxylové skupiny a zvyšují rychlost přenosu atomů vodíku pro peroxidové radikály. Antioxidační účinek je také podpořen přítomností dvojné vazby v nenasyceném uhlíkovém řetězci, zvyšující stabilitu fenolického radikálu [14]. Tyto chemické faktory jsou připisovány primárním antioxidantům (terminátory), které mají schopnost eliminovat volné radikály propagující řetězové reakce, jako peroxy-, alkoxy- a hydroxylové radikály. Mechanismus působení těchto antioxidantů funguje na principu poskytnutí atomu vodíku radikálům a jejich následném převedení na stabilní molekuly (alkohol a vodu). Během tohoto procesu vznikají z antioxidantů relativně stabilní radikály nebo oxidované produkty reakce. Mechanismus eliminace peroxidových radikálů je uveden na Obr. 2 [15,16].

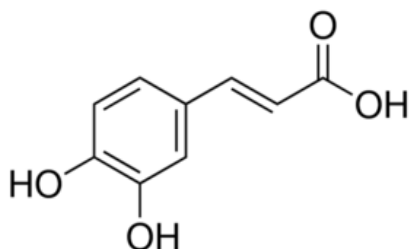


Obr.2: Mechanismus radikálové reakce. Obrázek převzat z publikace [16].

Fenolové antioxidanty se rozdělují do dvou skupin podle počtu uhlíků v řetězci dané kyseliny. V případě, že se sloučenina skládá z C<sub>6</sub> – C<sub>1</sub>, tak se jedná o kyselinu benzoovou a její deriváty. Do druhé skupiny patří kyseliny, které mají řetězce s C<sub>5</sub> – C<sub>3</sub>, tyto řetězce jsou typické pro kyselinu skořicovou a její deriváty [15], mezi něž patří i kyselina kávová a další sloučeniny studované v rámci této práce.

### 3.1.2.1 Kyselina kávová

Kyselina kávová, resp. kyselina 3,4-dihydroxyskořicová (Obr. 3), se přirozeně vyskytuje v mnoha potravinách rostlinného původu např. v kávě, olivách, vínu a čaji. Významným zdrojem jsou i některé byliny např. Šalvěj červenokořená (*Salvia miltiorrhiza*), nebo právě Třapatkovka nachová (*Echinacea purpurea*). Bohatým přírodním zdrojem je také propolis [14,17].



Obr. 3: Struktura kyseliny kávové.

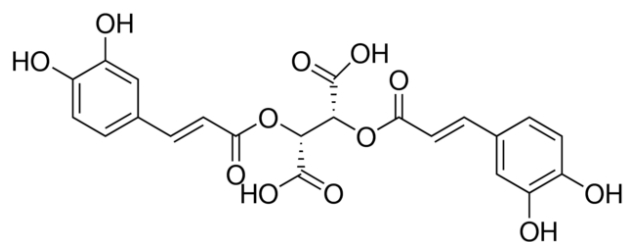
### 3.1.2.2 Deriváty kyseliny kávové

Kyselina kávová se v přírodě vyskytuje nejen ve své původní formě, ale i ve formě různých derivátů, mezi které se řadí kyselina kaftarová, kyselina chikorová (čekanová), kyselina chlorogenová a dále pak cynarin, což je ester vzniklý z kyseliny chinové a dvou molekul kyseliny kávové a echinakosid, přírodní glykosid kyseliny kávové. Tyto sloučeniny se běžně vyskytují v zelenině, ovoci, obilovinách a především v *E. purpurea* [18].

**Kyselina chikorová** (Obr. 4), známá také jako kyselina čekanová, cichorová nebo kyselina dikaffeoylvinná je v *E. purpurea* nejrozšířenějším derivátem kyseliny kávové. Její molekula se skládá z esteru kyseliny vinné se dvěma kyselinami kávovými [19].

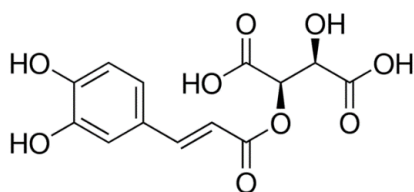
Poprvé byla identifikována v roce 1958. Populární se však stala až o několik let později, když byly prokázány její vlastnosti prospěšné pro lidské zdraví způsobené konzumací potravin a doplňků stravy obsahujících tuto sloučeninu [19].

Sloučeniny kyseliny chikorové byly dosud nalezeny v nejméně 13 řádech, 25 čeledích a 63 druzích rostlin. Její výskyt se nejčastěji uvádí v čeledi *Asteraceae* a *Drypteridaceae*. Byla ale také prokázána např. v mořských řasách, přesličkách, kapradinách, salátu a v bazalce. [19,20]. Kyselina chikorová pomáhá rostlinám chránit se před různými onemocněními způsobenými viry, houbami, bakteriemi, hlísticemi a také chrání rostlinu před hmyzem [19].



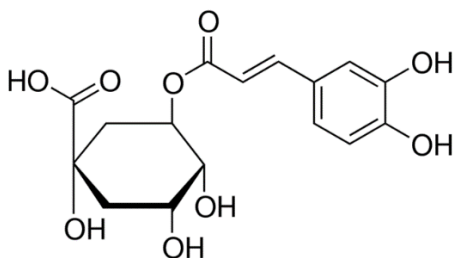
Obr. 4: Struktura kyseliny chikorové.

**Kyselina kaftarová** (Obr. 5) neboli kyselina kofeoylvinná je jedna z mnoha fenolických látek identifikovaných v bílém víně. Kyselina kaftarová je hlavním substrátem oxidace v hroznovém moštu, džusu a víně. Oxidací se snadno převádí na reaktivnější elektrofilní druhy *o*-chinony, které mohou dále reagovat s nukleofilními sloučeninami, které vedou k tvorbě polymerních sloučenin se sirnými nukleofily [21].



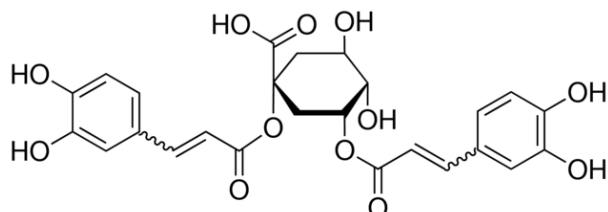
Obr. 5: Struktura kyseliny kaftarové.

**Kyselina chlorogenová** (Obr. 6), přítomna zejména v kávových zrnech a čaji, je považována za sloučeninu, která se podílí na odolnosti vůči hmyzu a patogenům a má příznivé účinky na lidské zdraví. Jejím působením dochází pravděpodobně ke snížení trávení škrobu a potlačení aktivity trávicích enzymů. Tento proces je způsoben inhibicí aktivity  $\alpha$ -amylázy změnou její sekundární struktury, nebo vytvářením komplexů nekovalentními silami [22,23].



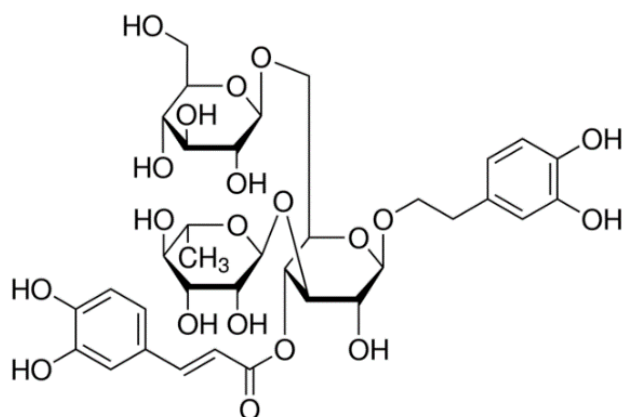
Obr. 6: Struktura kyseliny chlorogenové.

**Cynarin**, (Obr.7) nazývaný také kyselina 1,3-o-dikaffeoylchionová, je považován za fyto-sloučeninu z rostlin rodu *Cynary*, do které patří známá plodina artyčok, což je malý rod pocházející ze středomořské oblasti. Je známý pro své farmakologické účinky, jako jsou antioxidační, antibakteriální, anticholinergní, antisklerotické a schopnost snižovat hladinu cholesterolu v krvi [18,24].



Obr. 7: Struktura cynarinu.

**Echinakosid**, (Obr. 8) je fenylethanoidový glykosid rostlinné říše. Tento derivát kyseliny kávové chrání kolagen před degradací způsobenou volnými radikály a vykazuje ochranný účinek proti onemocnění jater [25,26,27]. Údaje o první izolaci z rostlin se značně liší, jedna studie [25] uvádí kořeny *Pinecymose sinensis* a druhá [27] *Penstemon barbatus*. Je také jednou z významných účinných složek *Cistanche* z čeledi *Orobanchaceae* [25].



Obr. 8: Struktura Echinakosidu.

### **3.2 Kvantitativní analýza fenolických sloučenin v rostlinných maticích**

Extrakce přírodních látek může být provedena mnoha způsoby s ohledem na fyzikálně chemické vlastnosti analytu či analytů a charakter vzorku. Níže popsané metody jsou pro přehlednost shrnuty v Tab. 2. Vzájemné porovnání různých analytických technik určených pro stanovení jakékoliv látky je nezbytnou součástí každého výzkumu, protože volba vhodné analytické metody může ušetřit čas, peníze a/nebo poskytnout spolehlivější výsledky analýz.

Při výběru analytické metody je také důležité brát ohled na přípravu vzorku, která bývá velice často největším zdrojem nejistoty výsledků. Nejčastější extrakcí analytu z matrice bývá extrakce do kapaliny nebo extrakce na tuhou fázi. Při extrakci se pro podporu uvolnění analytu z matrice nejčastěji využívá ultrazvuk. Je vhodné volit takové postupy přípravy vzorku, které jsou jednoduché, rychlé a skládají se z co nejméně kroků, aby došlo k minimalizaci možných chyb a zároveň bylo dosaženo co nejnižších mezí stavitelnosti.



Tab. 2: Přehled mezi detekce a mezi stavitelnosti kyseliny chikorové a dalších derivátů kyseliny kávové pro různé analytické techniky.

Analytická technika	Matrice	Navážka	Extrakční technika	Analyt(y)	Kalibrační rozsah	Správnost	Přesnost	Mez detekce	Mez stavitelnosti	Zdroj
-	-	[g]	-	-	[µg/ml]	[%]	[%]	[µg/ml]	[µg/ml]	-
LC-MS/MS	<i>Artemisia argyi</i>	0,1	SPE	K. chlorogenová K. kávová	84-8400 49-4900	97,36 101,5	1,7 2,8	0,0013 0,0051	0,0043 0,0169	[28]
LC-ESI-MS	Zelenina	2	SPE	K. chlorogenová K. kávová	0,005–50 0,005–50	106 71	4,32 6,98	0,008 0,009	- -	[29]
LC-UV	<i>Echinacea purpurea</i>	0,5	-	K. kaftarová K. chlorogenová K. kávová Cynarin Echinakosid K. chikorová	12,89–386,60 15,64–391,00 12,85–358,40 15,99–399,78 19,64–392,80 8,86–354,20	99,49–102,78 98,95–102,82 96,59–103,83 99,78–102,81 98,20–102,35 98,71–102,23	1,31 1,84 2,81 1,22 1,71 1,45	3,14 4,09 3,72 5,28 3,78 1,69	9,51 12,4 11,27 15,99 11,46 5,13	[30]
LC-DAD	Červené víno	-	SPE	K. kaftarová K. kávová	0,55–17,5 0,55–17,5	91,8–104,5 91,8-104,5	0,29 0,23	0,09 0,1	0,1 0,12	[31]
LC-UV	Nadzemní části <i>Echinacea</i>	-	Soxhlet extrakce v metanolu s SPE	Fenolické kyseliny	-	98,5	-	-	-	[32]
LC-MS/MS	<i>Echinacea</i> kořeny a farmakologické produkty	-	UAE metanol:voda (60:40), 30 minut	Deriváty k. kávové	2-100	95,6-101,2	-	0,1	0,2	[32]
LC-DAD	<i>Echinacea purpurea</i>	1	Metanol	K. kávová	-	-	-	0,47	1,58	[33]
LC-UV/DAD	<i>Echinacea pallida</i> (kořen)	600	Metanol + 0,1% HCOOH	K. kaftarová K. kávová Echinakosid K. chikorová	3,07–153,4 2,52–167,82 9,06–906 2,72–136,2	97,9 100,4 101,7 101,3	1,1 0,3 0,1 0,5	0,9 0,75 2,72 0,82	3,07 2,52 9,06 2,72	[34]
LC-PB/EIMS	<i>Echinacea</i>	-	-	K. kaftarová K. chlorogenová K. kávová K. chikorová	0–100 0–100 0–100 0–100	- - - -	8,3 - 8,3 11,0	0,00064 000485 0,00097 0,00194	0,0003 0,00024 0,00005 0,0001	[35]

V práci [30] byly stanoveny všechny stanovované kyseliny v této práci tedy kyselina kávová, kaftarová, chikorová, chlorogenová, cynarin a echinakosid z extraktu kořene *Echinacea purpurea*. Navážka 0,5 g mletých sušených kořenů byla extrahována 10 ml rozpouštědla pomocí magnetického míchadla po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Následně byl vzorek 10 minut centrifugován a poté přefiltrován. Poté byla provedena i druhá extrakce a konečný objem činil 25 ml. Extrakt byl zfiltrován přes PTEF filtr do HPLC vialky. Chromatografická separace byla provedena na koloně C18, jako MFA byl použit 0,1% vodný roztok kyseliny fosforečné a jako MFB acetonitril. Rychlost průtoku byla nastavena na 1,5 ml/min, teplota kolony na 26 °C a objem vzorku byl nastaven na 5 µl.

Nejnižší hodnoty meze detekce bylo dosaženo v práci [35], kde bylo využito kapalinové chromatografie ve spojení s PB/EIMS. Druhé nejnižší detekce bylo dosaženo v práci [28], v níž bylo při přípravě vzorku k analýze použito SPE extrakce za podpory ultrazvuku a jako analytická technika byla využita metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem využívající principu trojitého kvadrupólu s ionizací elektrosprejem.

Naopak nejvyšších hodnot meze detekce metody bylo dosaženo v publikaci [30], v níž byla využita metoda kapalinové chromatografie s UV detektorem, při které byly stanovoveny všechny kyseliny stanovované v této bakalářské práci. V každé práci bylo využito různého množství vzorku. S největším množstvím vzorku bylo pracováno v práci [34] - 600 g kořene *Echinacea*.

Nejnižšího množství bylo použito v práci [28], kde se použilo pouze 0,1 g vzorku *Artemisia argyi*. LC-UV metoda [30] má ve srovnání s LC-MS metodou [29] poskytuje dle očekávání přibližně 1000x vyšší meze detekce i stavitelnosti. Nejnižší hodnoty meze stavitelnosti bylo dosaženo taktéž v práci [28], [29] a [35].

Hodnoty správnosti jsou ve všech pracích srovnatelné (71–106 %), kdežto hodnoty přesnosti se v závislosti na rozsahu koncentrace liší. Nejnižší přesnosti (0,23-0,29 %) je dosaženo v práci [31] a naopak nejvyšší hodnoty (8,3-11,0 %) v práci [35]. Nejširšího kalibračního rozsahu (12,85–358,40 µg/ml) bylo dosaženo v práci [30].

Záměrem této bakalářské práce bylo nalezení takových podmínek, aby bylo dosaženo co nejnižších mezí stavitelnosti při přijatelné přesnosti a správnosti. Na základě výše uvedeného přehledu i obecných skutečností lze konstatovat, že zamýšlená LC-MS/MS technika svými možnostmi tomuto záměru odpovídá nejvíce.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Použité chemikálie a činidla

- Tab. 3: Standardy a vnitřní standard.

Sloučenina	Kategorie	CAS číslo	Mr [g/mol]	Čistota [%]
Kyselina kávová	Standard	331-39-5	180,16	98
Kyselina chikorová	Standard	6537-80-0	474,37	95
Kyselina kaftarová	Standard	67879-58-7	312,23	98
Kyselina chlorogenová	Standard	327-97-9	354,31	95
Cynarin	Standard	30964-13-7	515,45	98
Echinakosid	Standard	82854-37-3	786,73	98
n-Butylester kyseliny 4-hydroxybenzoové	Vnitřní Standard	-	194,23	100

- Acetonitril – čistota pro LC-MS  $\geq 99,9$  % (Merck)
- Metanol – čistota pro LC-MS  $\geq 99,9$  % (Sigma-Aldrich)
- Kyselina mravenčí – čistota pro LC-MS  $\approx 98$  % (Sigma-Aldrich)
- Helium – čistota 99,99 % obj. (Linde)
- Dusík – čistota 99,99 % obj. (Linde)
- Dusík generovaný přístrojem Genius 1022 – čistota  $\geq 99,5$  % (Peak Scientific)
- Deionizovaná voda vyrobená přístrojem Water purification systém Smart2Pure (Thermo)

### 4.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál

- Kapalinový chromatograf: UltiMate 3000 (Thermo)
- Chromatografická kolona: Kinetex EVO C18 (150x3.0 mm; 2,6  $\mu$ m) (Phemonenex)
- Chromatografická předkolona: Kinetex EVO C18 (3.0 mm) (Phemonenex)
- Hmotnostní spektrometr: VelosPro vybavený vyhřívaným elektrosprejem (Thermo)
- Analytické váhy: MS105DU (Mettler Toledo)
- Generátor dusíku: Genius 1022 (Peak Scientific)
- Výrobník deionizované vody: Water purification systém Smart2Pure (Thermo)
- Ultrazvuková vodní lázeň USC600THD (VWR)
- Analogový vortexový mixér 945304 (VWR)

- Magnetická míchačka: BIG SQUID (IKA)
- Odstředivka: 3-30 K (Sigma)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette Plus o objemu 100-1000  $\mu$ l (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette Plus o objemu 10-100  $\mu$ l (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta BioPette Plus o objemu 20-200  $\mu$ l (Labnet)
- Automatická dávkovací pipeta Transferpette®S o objemu 1–10 ml (Brand)
- Skleněné dávkovací stříkačky o objemu 5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500  $\mu$ l (Hamilton)
- Skleněná nedělená pipeta o objemu 100 ml s přesností  $\pm$  0,08 ml (Qualicolor)
- Odměrné sklo, třída přesnosti A (Fisherbrand)
- Spotřební materiál: plastové špičky, krimpovací vialky z čirého skla s hliníkovým uzávěrem a septem pryž/teflon, hliníková fólie
- Třecí miska s tloučkem
- Plastové centrifugační nesterilní zkumavky o objemu 15 ml
- Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft) a EffiValidation 4.0 (EffiChem).

### **4.3 Příprava roztoků standardů a reálných vzorků**

#### **4.3.1 Příprava mobilních fází**

Mobilní fáze A (MF-A) byla připravena odpipetováním 250  $\mu$ l kyseliny mravenčí automatickou pipetou (100-1000  $\mu$ l) do 250 ml odměrné baňky a doplněním deionizovanou vodou po rysku. Mobilní fáze A byla pro každé měření připravována vždy čerstvá.

Mobilní fáze B (MF-B) byla připravena odpipetováním 250  $\mu$ l kyseliny mravenčí automatickou pipetou (100-1000  $\mu$ l) do 250 ml odměrné baňky a doplněním acetonitrilem po rysku. Mobilní fáze B byla uchovávána při laboratorní teplotě po dobu max. 7 dní.

#### **4.3.2 Příprava zásobních roztoků standardů a vnitřního standardu**

Zásobní roztok každého standardu o koncentraci přesně asi 200 mg/l (ST-A) byl připraven navážením přesně asi 5 mg dané sloučeniny, navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky (25 ml) a rozpuštěna v 70 % vodném roztoku methanolu. Roztok byl poté rozpipetován po 0,6 ml do skleněných šroubovacích HPLC vialek (1,8 ml), vialky byly uzavřeny a uskladněny v hlubokomrazicím boxu při teplotě -75 °C až -80 °C po dobu max. 2 roky.

Zásobní roztok vnitřního standardu o koncentraci přesně asi 1000 mg/l (VS-A) byl připraven navážením asi 10 mg dané sloučeniny, navážka byla kvantitativně převedena do odměrné baňky (10 ml) a rozpuštěna v 70 % vodném roztoku methanolu. Roztok byl poté uskladněn v chladničce při teplotě +7 °C po dobu max. 1 týden.

### 4.3.3 Příprava směsných pracovních roztoků standardů

Směsný pracovní roztok 4 standardů o koncentraci 4000 µg/l (ST-B) byl připraven odpipetováním roztoků ST-A podle Tab. 4. Roztok ST-B byl připravován vždy čerstvý a nebyl uchováván déle než 24 hodin.

Tab. 4: Příprava roztoku ST-B.

Sloučenina	Objem ST-A [µl]	Celk. obj. [ml]	Rozpouštědlo	Konc. [µg/l]
K. chlorogenová	91,4	5	voda	4000
K. kávová	104,6			
Echinakosid	112,9			
Cynarin	101,6			

Směsný pracovní roztok 6 standardů o koncentracích 40 µg/l a 10 000 µg/l (ST-C) byl připraven obdobným způsobem jako roztok ST-B dle Tab. 5. Roztok ST-C byl připravován vždy čerstvý a nebyl uchováván déle než 24 hodin.

Tab. 5: Příprava roztoku ST-C.

Sloučenina	Objem ST-A [µl]	Objem ST-B [µl]	Celk. obj. [ml]	Rozpouštědlo	Konc. [µg/l]
K. kaftarová	255,1	-	5	voda	10 000
K. chikorová	261,6	-			10 000
Roztok ST-B	-	50			40

### 4.3.4 Příprava pracovního roztoku vnitřního standardu

Pracovní roztok vnitřního standardu o koncentraci 100 mg/l (VS-B) byl připraven odpipetováním 1 ml roztoku VS-A do odměrné baňky (10 ml) a doplněn deionizovanou vodou po rysku. Roztok VS-B byl připravován vždy čerstvý a nebyl uchováván déle než 24 hodin.

### 4.3.5 Příprava kalibračních roztoků

Příprava kalibračních roztoků je shrnuta v Tab. 6. Celkem bylo připraveno 7 koncentračních úrovní, každá úroveň ve 3 opakováních. Do HPLC vialek (1,8 ml) byla odpipetována automatickou pipetou (100-1000 µl) voda, poté byl pod hladinu přidán skleněnou stříkačkou Hamilton (5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µl) roztok ST-C a nakonec bylo nad hladinu přidáno automatickou pipetou (1-100 µl) 100 µl roztoku VS-B.

Tab. 6: Příprava kalibračních roztoků.

Konc. úroveň	Ozn. roztoku	Konc. Skup. 1 <sup>a</sup> [µg/l]	Konc. Skup. 2 <sup>b</sup> [µg/l]	Konc. VS [µg/l]	Objem ST-C [µl]	Objem VS-B [µl]	Objem vody [µl]	Objem celk. [µl]
1	K1a	0,200	50	10 000	5	100	895	1000
	K1b							
	K1c							
2	K2a	0,400	100	10 000	10	100	890	1000
	K2b							
	K2c							
3	K3a	1,000	250	10 000	25	100	875	1000
	K3b							
	K3c							
4	K4a	2,000	500	10 000	50	100	850	1000
	K4b							
	K4c							
5	K5a	4,000	1000	10 000	100	100	800	1000
	K5b							
	K5c							
6	K6a	10,000	2500	10 000	250	100	650	1000
	K6b							
	K6c							
7	K7a	20,000	5000	10 000	500	100	400	1000
	K7b							
	K7c							

<sup>a</sup> Skupina 1: kyselina chlorogenová, kyselina kávová, echinakosid a cynarin.

<sup>b</sup> Skupina 2: kyselina kaftarová a kyselina chikorová.

### 4.3.6 Příprava kontrolních roztoků

Pro provedení kontroly přístroje, mobilní fáze, roztoků standardů i vnitřního standardu a vzorků kvůli případné kontaminaci, která by mohla nastat při přípravě a/nebo při měření, byly připraveny tři roztoky, jejichž příprava je shrnuta v Tab. 7.

Tab. 7: Příprava kontrolních roztoků.

Označení roztoku	Objem ST-C [μl]	Objem VS-B [μl]	Objem vody [μl]	Objem celk. [μl]
MF	0	0	1000	1000
ST	0	100	900	1000
VS	100	0	900	1000

### 4.3.7 Příprava reálných vzorků

#### 4.3.7.1 Čaj

Příprava nálevu čaje (název: Chřipka a nachlazení; výrobce: MEDIMATE, s.r.o.) k analýze byla provedena podle ČSN ISO 3103. Do suché a čisté kádinky (250 ml) byly naváženy přesně asi 2 g čaje a navážka byla zalita 100 ml vroucí deionizované vody. Kádinka byla zakryta hliníkovou fólií a po dobu 6 min byla míchána pomocí magnetické míchačky. Poté bylo do plastové centrifugační zkumavky (15 ml) přelito 10 ml nálevu a zkumavka byla centrifugována 10 min při odstředivé síle 10 000 x g. Pro účely chemické analýzy byla provedena příprava různě koncentrovaných roztoků nálevu čaje (včetně slepého pokusu), která je shrnuta v Tab. 8.

Příprava jednotlivých ředění byla provedena následujícím způsobem:

- Roztok Č-I: odstředěný vzorek
- Roztok Č-II: 1 ml odstředěného vzorku do 10 ml odměrné baňky; ředící roztok – voda
- Roztok Č-III: 1 ml roztoku Č-II do 10 ml odměrné baňky; ředící roztok – voda

Tab. 8: Shrnutí přípravy různě koncentrovaných roztoků nálevu čaje.

Konc. úroveň	Označení roztoku	Odebráno z	Objem vzorku [μl]	Objem VS-B [μl]	Objem ST-C [μl]	Objem vody [μl]	Objem celkový [μl]
NŘ	Č1a Č1b Č1c Č1d	Č-I	800	100	-	100	1000
NŘ + spike	Č1e Č1f Č1g Č1h	Č-I	800	100	100	-	1000
10x	Č2a Č2b Č2c Č2d	Č-I	100	100	-	800	1000
10x + spike	Č3e Č3f Č3g Č4h	Č-I	100	100	100	700	1000
100x	Č4a Č4b Č4c Č4d	Č-II	100	100	-	800	1000
100x + spike	Č5e Č5f Č5g Č5h	Č-II	100	100	100	700	1000
1000x	Č6a Č6b Č6c Č6d	Č-III	100	100	-	800	1000
1000x + spike	Č6e Č6f Č6g Č6h	Č-III	100	100	100	700	1000
Sl. pokus	Č-0	Č-SP	800	100	-	100	1000



### 4.3.7.2 Tinktura

Příprava vzorku tinktury z *Echinacea* (název: Echinaceové kapky, výrobce: Dr. Max Pharma s.r.o.) k analýze byla provedena ředěním. Do odměrné baňky (10 ml) byl odpipetován 1 ml vzorku tinktury a zředěn vodou. Poté bylo do plastové centrifugační zkumavky (15 ml) přelito 10 ml extraktu a zkumavka byla centrifugována 10 min při odstředivé síle 10 000 x g. Pro účely chemické analýzy byla provedena příprava různě koncentrovaných roztoků extraktu (včetně slepého pokusu), která je shrnuta v Tab. 9.

Příprava jednotlivých ředění byla provedena následujícím způsobem:

- Roztok Tin-I: odstředěný vzorek
- Roztok Tin-II: 1 ml roztoku Tin-I do 10 ml odměrné baňky; ředící roztok – voda
- Roztok Tin-III: 1 ml roztoku Tin-II do 10 ml odměrné baňky; ředící roztok – voda

Tab. 9: Shrnutí přípravy různě koncentrovaných roztoků tinktury.

Konc. úroveň	Označení roztoku	Odebráno z	Objem vzorku [μl]	Objem VS-B [μl]	Objem ST-C [μl]	Objem vody [μl]	Celkový objem [μl]
NŘ	Tin1a Tin1b Tin1c Tin1d	Tin-I	100	100	-	800	1000
NŘ + spike	Tin1e Tin1f Tin1g Tin1h	Tin-I	100	100	100	700	1000
10x	Tin2a Tin2b Tin2c Tin2d	Tin-II	100	100	-	800	1000
10x + spike	Tin3e Tin3f Tin3g Tin4h	Tin-II	100	100	100	700	1000
100x	Tin4a Tin4b Tin4c Tin4d	Tin-III	100	100	-	800	1000
100x + spike	Tin5e Tin5f Tin5g Tin5h	Tin-III	100	100	100	700	1000
Sl. pokus	Tin-0	Tin-SP	800	100	-	100	1000

### 4.3.7.3 Tableta

Příprava vzorku tablety (název: Echinacea, výrobce MedPharma, spol. s r.o.) k analýze byla provedena jejím nadrcením tloučkem v třecí misce do naprostého prášku. Bylo naváženo přesně asi 0,50 g prášku z tablety, který byl následně kvantitativně převeden do odměrné baňky (50 ml) a rozpuštěn ve vodě. Pro podporu extrakce analytů do rozpouštědla byla odměrná baňka se vzorkem vložena na 5 minut do ultrazvukové lázně. Poté bylo do plastové centrifugační zkumavky (15 ml) přelito 10 ml extraktu a zkumavka byla centrifugována 10 min při odstředivé síle 10 000 x g. Pro účely chemické analýzy byla provedena příprava různě koncentrovaných roztoků extraktu (včetně slepého pokusu), která je shrnuta v Tab. 10.

Příprava jednotlivých ředění byla provedena následujícím způsobem:

- Roztok T-I: odstředěný vzorek
- Roztok T-II: 1 ml odstředěného vzorku do 10 ml odměrné baňky; ředící roztok – voda

Tab. 10: Shrnutí přípravy různě koncentrovaných roztoků tablety.

Konc. úroveň	Označení roztoku	Odebráno z	Objem vzorku [μl]	Objem VS-B [μl]	Objem ST-C [μl]	Objem vody [μl]	Objem celkový [μl]
NŘ	T1a T1b T1c T1d	T-I	800	100	-	100	1000
NŘ + spike	T1e T1f T1g T1h	T-I	800	100	100	-	1000
10x	T2a T2b T2c T2d	T-I	100	100	-	800	1000
10x + spike	T3e T3f T3g T4h	T-I	100	100	100	700	1000
100x	T4a T4b T4c T4d	T-II	100	100	-	800	1000
100x + spike	T5e T5f T5g T5h	T-II	100	100	100	700	1000
Sl. pokus	T-0	T-SP	800	100	-	100	1000

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Přímá infuze a testovací LC-MS/MS analýza

Experimentální část byla v první fázi zaměřena na zjištění základních analytických podmínek. Nejprve byla provedena přímá infuze směsného roztoku standardů i vnitřního standardu do hmotnostního spektrometru, aby bylo ověřeno, že studované sloučeniny poskytují vyšší odezvu při negativní ionizaci než při pozitivní ionizaci. V rámci tohoto měření byly současně zjištěny hodnoty specifických hmotností deprotonovaných molekul všech 7 sloučenin. Poté byla provedena fragmentace každého z těchto prekurzorových iontů za použití kolizně indukované disociace o relativní kolizní energii 35 (standardní hodnota doporučená výrobcem). Pro každou sloučeninu bylo získáno hmotnostní MS/MS spektrum a pro každý z těchto prekurzorů byly vybrány 2 nejintenzivnější produktové ionty. Výchozí podmínky chromatografické separace i hmotnostní detekce (Tab. 11) a volba vnitřního standardu byly vybrány s ohledem na některé již publikované výsledky uvedené v kap. 3.2 a na doporučení školitele. Jako kritický analyt byla zvolena kyselina chikorová, protože je z kvalitativního i kvantitativního hlediska nejdůležitějším analytem a zároveň vykazuje (společně s kyselinou kaftarovou) nejnižší odezvu a nejhorší symetrii chromatografického píku.

Výchozí podmínky separace:

- Chromatografická kolona: Kinetex EVO C18 (150x3.0 mm; 2,6  $\mu$ m)
- MF-A: 0,1 % obj. kyseliny mravenčí ve vodě
- MF-B: 0,1 % obj. kyseliny mravenčí v acetonitrilu
- Gradientový program: 0  $\rightarrow$  15 minut (5  $\rightarrow$  95 % MF-B), poté 10 min kondicionace
- Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min
- Koncentrace každé sloučeniny: 50 mg/l
- Objem nástřiku: 1  $\mu$ l
- Teplota kolonového prostoru: 30  $^{\circ}$ C
- Polarita a potenciál HESI kapiláry: -3 kV
- Průtok hlavního, resp. pomocného zmlžujícího plynu: 60 arb. resp. 20 arb.
- Teplota zmlžujícího plynu, resp. transferové trubice: 350  $^{\circ}$ C resp. 350  $^{\circ}$ C
- Potenciál vložený na S-čočky, resp. na F-čočky: 60 % resp. -9 V
- Doba plnění iontové pasti pro MS sken, resp. pro MS/MS sken: 10 ms resp. 50 ms
- Relativní kolizní energie: 35

Tab.11: Základní charakteristiky analytů a vnitřního standardu za výchozích podmínek.

Retenční čas [min]	Sloučenina	Molekulová hmotnost [g/mol]	Prekurzorový iont [m/z]	Produktový iont [m/z]
3,7	Kyselina kaftarová	312,23	311,1	148,9; 178,9
4,0	Kyselina chlorogenová	354,31	353,0	179,0; 191,0
4,4	Echinakosid	786,73	785,3	623,3
4,4	Kyselina kávová	180,16	179,0	134,9
4,6	Cynarin	515,45	515,1	335,1; 353,1
6,1	Kyselina chikorová	474,37	473,1	293,0; 311,1
9,6	Vnitřní standard	194,23	193,1	135,9; 136,9

## 5.2 Optimalizace podmínek chromatografické separace

### 5.2.1 Složení mobilní fáze

Optimalizace složení mobilních fází byla prováděna za účelem co nejlepší chromatografické separace při současné co nejlepší odezvě detektoru. Jedním ze základních parametrů je kapacitní poměr (rov. 1), který charakterizuje míru retence analytu na koloně [36].

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (\text{rov. 1})$$

Kde  $k$  je kapacitní poměr,  $t_R$  je retenční čas sloučeniny,  $t_M$  je mrtvý retenční čas.

Hodnota kapacitního poměru by měla být vyšší než 2, ideálně v rozsahu přibližně 2–6. Nižší kapacitní poměr značí, že retence analytů na koloně není dostatečná a nemohlo proto dojít k dostatečné separaci od oblasti mrtvého objemu. Dále je nutné brát v úvahu i další chromatografické parametry (symetrie píku, rozlišení, doba analýzy) nebo vliv na ionizační procesy v případě hmotnostní detekce. Použité mobilní fáze jsou uvedeny v Tab. 12.

Tab. 12: Optimalizace složení mobilních fází.

Metoda	MF-A		MF-B	
	Aditivum	Rozp.	Aditivum	Rozp.
1	0,1% K. mravenčí	Voda	0,1% K. mravenčí	Acetonitril
2	0,1% K. mravenčí v 5mM mravenčanu amonném	Voda	0,1% K. mravenčí	Acetonitril
3	0,2% K. mravenčí	Voda	0,2% K. mravenčí	Acetonitril

V případě výchozích podmínek (Tab. 12. metoda 1) bylo dosaženo kapacitního poměru 2,8 pro nejméně zadržovaný analyt (k. kaftarová) za současného uspokojivého tvaru chromatografických píků i distribuce jejich retenčních časů v průběhu analýzy. Přídavkem aditiva v podobě 5 mM mravenčanu amonného (Tab. 12, metoda 2) však došlo ke snížení kapacitního poměru na hodnotu 1,8 a zároveň byl patrný negativní vliv iontové suprese (pokles odezvy detektoru) u kyseliny chikorové, kdy došlo ke snížení odezvy detektoru z  $2 \cdot 10^5$  na  $1 \cdot 10^5$ . Poté byla ještě vyzkoušena metoda 3 (Tab. 12, metoda 3), při které opět došlo ke snížení kapacitního poměru na hodnotu 2,5 i k iontové supresi, která se však tentokrát projevila v případě vnitřního standardu – pokles signálu téměř o 1 řád, a to z  $2 \cdot 10^5$  na  $6 \cdot 10^4$ . Za nejvhodnější složení mobilních fází bylo proto zvoleno složení mobilní fáze uvedené u metody 1. Nejvyšší hodnota kapacitního poměru navíc otevírá větší prostor pro použití vyššího obsahu organické složky v mobilní fázi, při němž by mohlo být díky vyšší eluční síle mobilní fáze dosaženo užších a vyšších píků a příznivějších podmínek ionizace. Dalšími výhodami jsou menší náročnost při přípravě mobilní fáze, kdy odpadá relativně časově náročné navažování mravenčanu amonného a nejnižší náklady na analýzu.

### 5.2.2 Gradientový program

Cílem tohoto optimalizačního kroku bylo zkrátit dobu analýzy, chromatograficky rozdělit co nejvíce analytů a zúžit a zvýšit chromatografické píky. Pro dosažení těchto cílů bylo prováděno zvyšování obsahu organické složky v počáteční fázi gradientového programu, zkracování doby trvání úvodní izokratické části a zvyšování strmosti následné gradientové části. Testování bylo provedeno při počátečním obsahu 5 % MF-B a 10 % MF-B, přičemž při každém z obou složení byly testovány 3 doby trvání izokratické části, a to 0 min, 1 min a 3 min. Při hodnocení byly brány v úvahu základní parametry, jako např. doba analýzy, poměr výšky píku analytu k výšce šumu základní linie (S/N) a tlak v kapalinovém chromatografu. Nejlepší separace bylo dosaženo při 10 % MF-B a 3 min doby počáteční izokratické části gradientového programu, kdy bylo dosaženo retenčního času poslední eluované sloučeniny (vnitřní standard) 10,3 min, poměr S/N pro analyty s nejnižší odezvou (k. kaftarová a kyselina chikorová) dosahoval hodnoty 56 resp. 51 a tlak v chromatografu činil 270 bar. Dále byla provedena úprava strmosti gradientového programu (3. → 5. min nárůst 10 → 25 % MF-B a 5. → 9. min nárůst 25 → 100 % MF-B), což se projevilo snížením retenčního času vnitřního standardu na 8,8 min a mírným zvýšením poměru S/N pro k. kaftarovou a kyselinu chikorovou na hodnoty 59 resp. 55. Poslední úpravou bylo testování zvýšení průtoku mobilní fáze

z 0,5 ml/min na 0,75 ml/min (s odpovídajícím přepočtem gradientového programu), po níž došlo k dalšímu snížení retenčního času vnitřního standardu až na hodnotu 6,4 min, přičemž tlak v chromatografu činil ještě akceptovatelných 402 bar z maximálně možných 600 bar, které bylo možno na tuto chromatografickou kolonu aplikovat.

### 5.2.3 Objem nástřiku

Optimalizace objemu nástřiku je prováděna za účelem dosažení co nejnižší meze kvantifikace analytu při současné dostatečné kvalitě chromatografické separace, která je hodnocena faktorem symetrie píku (rov. 2). Ideální hodnota symetrie píku je 1,0 což značí úplnou symetrii píku a akceptovatelné rozmezí činí 0,8–1,5 [37].

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (\text{rov. 2})$$

Kde  $A_s$  je faktor symetrie,  $w_{0,05}$  značí šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky,  $d$  je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky.

Při maximálním možném nástřiku 25  $\mu$ l dosahovaném na daném chromatografu a maximální koncentraci kalibračního standardu byla pro pík vykazující nejhorší symetrii píku (k. chikorová) zjištěna hodnota faktoru symetrie píku 6,5. Při nástřiku téhož roztoku v objemu 1  $\mu$ l však bylo dosaženo hodnoty 6,0. Na základě těchto výsledků, charakteru změny a tvaru píků je však patrné, že asymetrie píku není způsobena přetížením kolony, ale smíšeným interakčním mechanismem, při němž se při separaci uplatňuje dva a/nebo více interakčních mechanismů. Vzhledem k tomu, že ani při maximálním objemu nástřiku 25  $\mu$ l nedošlo k přetížení chromatografické kolony, byla jako optimální zvolena tato hodnota.

### 5.3 Optimalizace hmotnostní detekce

Cílem optimalizace hmotnostní detekce je nalézt takové podmínky, aby bylo dosaženo stabilního spreje v iontovém zdroji poskytující bohatý a stabilní proud iontů, maximální transmise iontů iontovou optikou, přiměřené fragmentace prekurzorových iontů na produktové ionty atd. Vzhledem k tomu, že specifické hmotnosti analytů nejsou výrazně odlišné (všechny  $< 800$  m/z), byla provedena tato část optimalizace (kromě energie pro kolizně indukovanou disociaci) pouze pro kyselinu chikorovou a jako výchozí podmínky byly zvoleny hodnoty doporučené v dokumentaci výrobce přístroje.

### 5.3.1 Vyhřívání elektrospreje

Optimalizace podmínek vyhřívání elektrospreje (HESI) se provádí za účelem získání co nejvyšší a co nejstabilnější odezvy detektoru vhodnou kombinací podmínek HESI kapiláry (polarita napětí, hodnota napětí, teplota a průtoky zmlžujících plynů) a transferové trubice (teplota). Nejlepších výsledků, hodnocených na základě příloh A a B, bylo dosaženo v případě použití teploty 350 °C a napětí -3,0 kV. Rozsah optimalizace těchto parametrů je uveden v Tab. 13.

Tab. 13: Optimalizace podmínek HESI.

Parametr	Hodnota	Příloha
Teplota zmlžujících plynů [°C]	300 <b>350</b> 400	A
Napětí na HESI kapiláře [kV]	-2,0 -2,5 <b>-3,0</b> -3,5 -4,0	B

Dále byla provedena optimalizace průtoku zmlžujících plynů při průtoku mobilní fáze 0,75 ml/min. Jako výchozí byly zvoleny podmínky vycházející z doporučení výrobce - maximální průtok hlavního zmlžujícího plynu (70 arb) a maximální průtok vedlejšího zmlžujícího plynu (20 arb). Poté byl snížen průtok hlavního zmlžujícího plynu (60 arb). Při sníženém průtoku hlavního zmlžujícího plynu však začal sprej mírně kondenzovat, proto musely být použity výchozí podmínky (tj. 70/20), při kterých bylo dosaženo akceptovatelné hodnoty stability spreje (< 15 %), která činila 5,86 % (Příloha C).

### 5.3.2 Iontová optika (S-čočky a F-čočky)

Cílem optimalizace parametrů iontové optiky je dosažení co největší efektivity při transferu iontů z iontové optiky do iontové pasti. Pro tyto účely byly vybrány dva základní parametry, a to napětí na S-čočkách v rozmezí 0 až 70 V a napětí na F-čočkách v rozmezí 0 až -30 V. Na základě provedených experimentů bylo zjištěno (Příloha D a E), že nejvyšší odezva detektoru na ion deprotonované molekuly kyseliny chikorové byla naměřena u S-čoček při 60 V a u F-čoček při -7,25 V, které byly následně zvoleny jako optimální.

### 5.3.3 Kolizní energie

Cílem optimalizace kolizní energie je nalezení vhodné hodnoty energie kolizně indukované disociace k optimální fragmentaci iontu prekursoru na jeho produktové ionty.

Kolizní energie je v případě tohoto hmotnostního spektrometru uváděna v relativních jednotkách % jako tzv. normalizovaná kolizní energie [38]. Produktové ionty všech analytů i vnitřního standardu byly zvoleny na základě nejvyšší intenzity odezvy detektoru po aplikaci standardní hodnoty 35 % (Přílohy F-J). Optimální hodnota normalizované kolizní energie pro každý vybraný produktový ion každého prekursoru (Tab. 14) byla získána na základě aplikace této energie v rozsahu 0–100 %.

Tab. 14: Výsledky optimalizace kolizní energie.

Sloučenina	Normalizovaná kolizní energie [%]	MRM přechod [m/z]
Kyselina kaftarová	40	311,1 → 148,9
	26	311,1 → 178,9
Kyselina chlorogenová	22	353,0 → 178,2
	34	353,0 → 191,0
Echinakosid	30	785,3 → 623,3
Kyselina kávová	26	179,0 → 134,9
Cynarin	32	515,1 → 335,0
	26	515,1 → 353,0
Kyselina chikorová	19	473,1 → 293,0
	21	473,1 → 311,1
Vnitřní standard	30	193,1 → 135,9
	34	193,1 → 136,9

Při fragmentaci poskytl pouze 1 produktový iont echinakosid a kyselina kávová. Nejvyšší kolizní energii (40 %) vykazoval přechod 311,1 → 148,9 kyseliny kaftarové, naopak nejnižší kolizní energii (19 %) vykazoval přechod 473,1 → 293,0 kyseliny chikorové.

#### 5.4 Validace analytické metody

Validace analytické metody slouží k objektivnímu posouzení její spolehlivosti a vhodnosti pro zamýšlený účel. Je prováděna vždy až po provedení kompletní optimalizace chromatografické separace i použité detekce, kdy jsou všechny podmínky analýzy zhodnoceny, uzavřeny a dále není předpoklad, že by měly být měněny. Validace musí být provedena v adekvátním rozsahu, a to nejen pro vzorky čistých analytů v čistém rozpouštědle, ale i pro vzorky obsahující přírodní matrici (např. čaj, tableta a tinktura), aby bylo prokázáno, že matrice vzorku významně neovlivňuje spolehlivost výsledků analýzy.



### 5.4.1 Linearita

Linearita vyjadřuje přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru na daný analyt a množstvím analytu. Ke kvantitativní analýze slouží v naprosté většině případů metod využívajících techniku hmotnostní detekce rovnice kalibrační křivky ve tvaru  $y = k \cdot x + q$ , kde  $y$  je poměr plochy píku analytu ku ploše píku vnitřního standardu,  $k$  je směrnice kalibrační přímky,  $x$  je poměr množství analytu ku množství vnitřního standardu a  $q$  je úsek na ose  $y$  rovnice kalibrační křivky v bodě  $x = 0$ . Linearita kalibrační křivky může být hodnocena několika způsoby. V tomto případě byla hodnocena na základě splnění 2 kritérií přijatelnosti – koeficient determinace  $> 0,9900$  a QC koeficient  $< 5,00 \%$  [37]. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Effvalidation 4.0 a výsledky jsou zobrazeny (Příloha K–P). Na základě vyhodnocení bylo zjištěno, že všechna kritéria byla splněna a že všechny kalibrační křivky vykazují v daných koncentračních rozsazích dostatečnou linearitu.

Tab. 15: Výsledky hodnocení linearity kalibračních křivek.

Analyt	Konc. rozsah [ $\mu\text{g/l}$ ]	Korelační koeficient [%]	QC koeficient [%]
Echinakosid	0,2–20	0,9993	4,81
Cynarin	0,2–20	0,9993	4,60
Kyselina kávová	0,5–20	0,9992	4,53
Kyselina chlorogenová	0,5–20	0,9998	2,30
Kyselina kaftarová	100–5000	0,9996	3,27
Kyselina chikorová	100–5000	0,9998	2,14

### 5.4.2 Přesnost a správnost

Dalšími nezbytnými charakteristikami hodnocenými v rámci procesu validace jsou správnost a přesnost. Správnost byla vyjádřena jako výtěžnost, která představuje těsnost shody mezi experimentálními a referenčními výsledky koncentrace analytu. Přesnost byla vyjádřena jako opakovatelnost, která představuje těsnost výsledků koncentrace analytu z několika nezávislých analýz. Kritéria přijatelnosti pro hodnocení těchto charakteristik byla převzata z [37,39]. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu Microsoft Excel.

Na základě výsledků uvedených v Tab. 16 a 17 je zřejmé, že dané správnosti a přesnosti všech analytů v každé koncentrační úrovni jsou akceptovatelné, avšak kyselina chikorová je v koncentraci 100 a 250  $\mu\text{g/l}$  na hranici akceptovatelnosti 110 %. K hranici přijatelnosti správnosti se také blíží kyselina kaftarová v koncentraci 100  $\mu\text{g/l}$  (109 %) a echinakosid

v koncentraci 0,2 µg/l (118 %). Výsledky přesnosti by měly v ideálním případě limitovat k hodnotě 0 %, ale obecně je dostatečné, pokud na dané koncentrační úrovni nepřesáhnou kritérium přijatelnosti, což bylo v tomto případě dodrženo. Nejhorší přesnosti bylo dosaženo u cynarinu při koncentraci 0,5 µg/l resp. 0,2 µg/l (30 % resp. 26 %) a u zbývajících 3 analytů při koncentraci 0,5 µg/l (17–22 %). V případě kyseliny kaftarové a kyseliny chikorové se přesnost pohybovala ve všech případech v rozsahu 0,7–6,0 %.

Tab. 16: Výsledky hodnocení správnosti.

Konc. úroveň [µg/l]	Kritérium přijatelnosti	Správnost [%]					
		Echinakosid	Cynarin	Kyselina kávová	Kyselina chlorogenová	Kyselina kaftarová	Kyselina chikorová
0,2	40–120	118	69,1	-	-	-	-
0,5		94,8	87,4	101	94,5	-	-
2,0		101	109	99,5	101	-	-
5,0		93,9	97,6	102	100	-	-
10	60–115	98,6	99,4	97,7	98,8	-	-
20		100	100	100	100	-	-
100	80–110	-	-	-	-	109	110
250		-	-	-	-	92,5	110
500		-	-	-	-	95,4	100
1000	80–110	-	-	-	-	100	97,9
2500		-	-	-	-	102	98,1
5000		-	-	-	-	99,5	101

Tab. 17: Výsledky hodnocení přesnosti.

Konc. úroveň [µg/l]	Kritérium přijatelnosti	Přesnost [%]					
		Echinakosid	Cynarin	Kyselina kávová	Kyselina chlorogenová	Kyselina kaftarová	Kyselina chikorová
0,2	30	8,3	26	-	-	-	-
0,5		22	30	17	21	-	-
1,0		8,2	1,7	8,8	1,6	-	-
2,0		1,7	3,7	2,3	2,7	-	-
5,0		3,3	4,6	2,5	1,5	-	-
10	21	4,0	3,6	5,3	2,5	-	-
20		2,7	3,0	2,7	1,3	-	-
100	15	-	-	-	-	3,3	1,1
250		-	-	-	-	6,0	3,1
500		-	-	-	-	1,9	5,1
1000	11	-	-	-	-	1,4	3,0
2500		-	-	-	-	1,8	1,1
5000		-	-	-	-	2,2	0,7

### 5.4.3 Rozsah

Rozsah analytické metody představuje interval mezi nejvyšší a nejnižší koncentrací analytu, pro který bylo dosaženo akceptovatelné linearit, správnosti i přesnosti. Z výsledků uvedených v Tab. 16 a 17 je zřejmé, že rozsah pro echinakosid a cynarin je akceptovatelný v rozmezí 0,2–20 µg/l. Pro kyselinu kávovou a chlorogenovou v rozmezí 0,5–20 µg/l Pro kyselinu kaftarovou a kyselinu chikorovou je akceptovatelný v rozmezí 100–5000 µg/l.

V porovnání s publikací [29], v níž bylo použito rovněž MS detekce s ESI ionizací, bylo v této bakalářské práci sice dosaženo užšího koncentračního rozsahu, ale na druhou stranu lze kyselinu chlorogenovou a kyselinu kávovou kvantifikovat již od koncentrační úrovně 0,5 µg/l což je 10x nižší koncentrace než v uvedené publikaci.

V tisíckrát vyšších koncentračních úrovních, než v této práci bylo v případě echinakosidu, cynarinu, kyseliny kávové a kyseliny chlorogenové pracováno v publikaci [32], kde byla provedena extrakce kořenů *Echinacea* a farmakologických produktů.

Z žádné uvedené publikace v kapitole 3.2.2 nebylo pracováno ve stejných koncentračních úrovních jako v této bakalářské práci. V této práci se oproti zmíněným publikacím pracovalo v nižších koncentračních úrovních, ale téměř vždy v užších rozsazích.

### 5.4.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Na závěr validace analytické metody byly hodnoceny 2 základní zbývající parametry, a to mez detekce (DL) a mez stanovitelnosti (QL). Obě meze byly určeny měřením odezvy detektoru na daný analyt a odezvy šumu detektoru za postupného snižování koncentrace analytu v roztoku až do okamžiku, kdy bylo dosaženo přiměřeného poměru signálu k šumu (S/N) v rozsahu přibližně 5–20. Za přijatelný odhad DL a QL je považován poměr signálu k šumu odpovídající hodnotě 3 pro DL a hodnotě 10 pro QL [40]. Vzhledem ke skutečnosti, že použitými roztoky analytů byly roztoky standardů v čistém rozpouštědle bez jakýchkoliv úprav (ředění, zakoncentrování apod.) a bez vlivu matrice reálného vzorku, tak se v tomto případě jedná o instrumentální mez detekce (IDL) a instrumentální mez kvantifikace (IQL). Výsledky těchto parametrů jsou uvedené v Tab. 18.

Tab. 18: Hodnoty pro výpočet IDL a IQL.

<b>Analyt</b>	<b>Koncentrace [µg/l]</b>	<b>S/N [1]</b>	<b>IDL [µg/l]</b>	<b>IQL [µg/l]</b>
K. kaftarová	50	12	13	42
K. chlorogenová	0,50	19	0,078	0,26
K. kávová	0,50	14	0,011	0,36
Echinakosid	0,20	27	0,022	0,074
Cynarin	0,20	20	0,034	0,10
K. chikorová	50	16	11	32

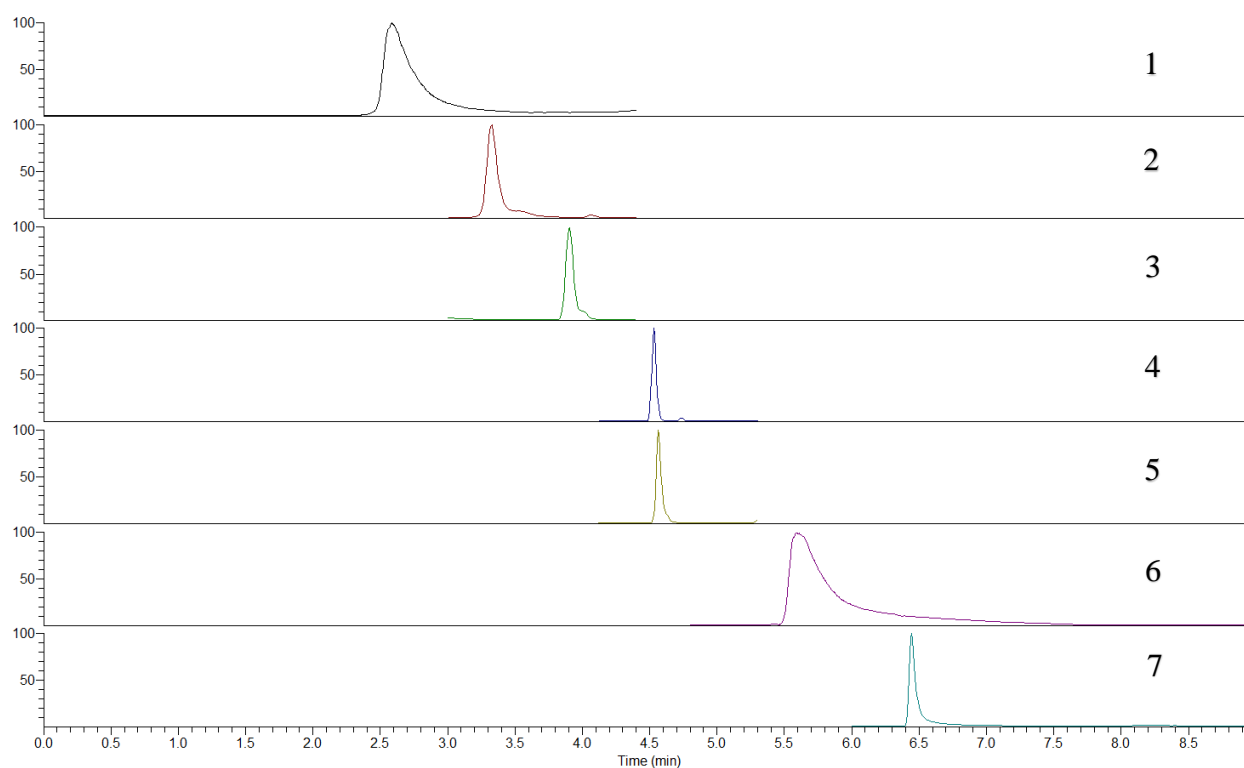
V případě implementace jakéhokoliv postupu přípravy vzorku před analýzou je pak nutné zohlednit nejen vliv těchto operací, ale i vliv dané matrice vzorku, množství vzorku k analýze a po zohlednění všech těchto vlivů se pak jedná o mez detekce metody (MDL) a mez kvantifikace metody (MQL). Tyto meze jsou uvedeny dále v kapitolách věnovaných hodnocení metody pro různé matrice.

## 5.5 Konečné podmínky LC separace a LC detekce

- Chromatografická kolona: Kinetex EVO C18 (150x3.0 mm; 2,6 µm)
- MF-A: 0,1 % obj. kyseliny mravenčí ve vodě
- MF-B: 0,1 % obj. kyseliny mravenčí v acetonitrilu
- Gradientový program: 0–2,25. min (10 % MF-B), 2,25–3,75 min (10 → 25 % MF-B), 3,75–6,75 min (25 → 100 % MFB), doba kondicionace 4 min.
- Průtok mobilní fáze: 0,75 ml/min
- Koncentrace analytů: echinakosid a cynarin v rozsahu 0,2–20,0 µg/l, kyselina kávová a kyselina chlorogenová v rozsahu 0,5–20 µg/l. Kyselina kaftarová a kyselina chikorová v rozsahu 100–5000 µg/l.
- Objem nástřiku: 25 µl
- Teplota kolonového prostoru: 30 °C
- Polarita a potenciál HESI kapiláry: -3 kV
- Průtok hlavního, resp. pomocného zmlžujícího plynu: 70 arb. resp. 20 arb.
- Teplota zmlžujícího plynu: 350 °C
- Potenciál vložený na S-čočky, resp. na F-čočky: 60 V resp. -7,25 V
- Doba plnění iontové pasti pro MS sken, resp. pro MS/MS sken: 10 ms resp. 50 ms
- Optimální kolizní energie: viz. Tab. 19

Tab. 19: Optimální kolizní energie.

Sloučenina	Optimální kolizní energie [%]
Kyselina kaftarová	40
Kyselina chlorogenová	35
Echinakosid	30
Kyselina kávová	26
Cynarin	24
Kyselina chikorová	20
Vnitřní standard	34



Obr. 9: Chromatogram standardů při použití finálních podmínek. (1 – kyselina kaftarová, 2 – kyselina chlorogenová, 3 – kyselina kávová, 4 – echinakosid, 5 – cynarin, 6 – kyselina chikorová, 7 – vnitřní standard)

## 5.6 Validace metody pro vzorky s přírodní matricí

Vzorky obsahující přírodní matrici často vyžadují nějakou úpravu před vlastní chromatografickou analýzou. V rámci tohoto kroku se nejčastěji provádí extrakční postupy, přečišťování, zakoncentrování nebo naopak ředění vzorku aj., což téměř vždy má větší či menší negativní efekt na výsledek analýzy. Matrice vzorku totiž často obsahuje velké množství organických i anorganických doprovodných sloučenin, které mohou mít významný vliv na extrakci analytů, chromatografickou separaci, detekci nebo procesy při ionizaci či fragmentaci. Aby byla prokázána spolehlivost analytické metody pro danou matrici, musí být na této matrici provedeno minimálně hodnocení přesnosti a správnosti změřením vzorku před přidáním známého objemu standardu o známé koncentraci a po tomto přidání. V této práci byla metoda hodnocena pro použití na analýzu čaje, tinktury a tablety. Kyselina kaftarová a kyselina chikorová byly hodnoceny po obohacení vzorku o 1000 µg/l s kritérii přijatelnosti správnosti 80–110 % a přesnosti < 11 %. Kyseliny chlorogenová, kávová, echinakosid a cynarin byly hodnoceny po obohacení vzorku o 4 µg/l s kritérii přijatelnosti správnosti 40–120 % a přesnosti < 30 %.

### 5.6.1 Čaj

Příprava vzorku čaje byla provedena podle kapitoly 4.3.7.1. Hodnoty meze kvantifikace metody (MQL), správnosti a přesnosti jsou uvedeny v Tab. 20.

Tab. 20: Hodnoty meze kvantifikace, správnosti a přesnosti – vzorek čaj.

Analyt	Mez kvantifikace [µg/l]	Správnost [%]	Přesnost [%]
K. kaftarová	63	109	2,3
K. chlorogenová	0,63	84,0	3,6
K. kávová	0,63	97,4	3,0
Echinakosid	0,25	106	3,5
Cynarin	0,25	93,8	2,8
K. chikorová	63	98,7	3,3

V případě matrice čaje bylo dosaženo všech kritérií přijatelnosti pro všechny analyty. Nejlepší správnosti bylo dosaženo u kyseliny chikorové (98,7 %) a nejlepší přesnosti bylo dosaženo u kyseliny kaftarové (2,3 %). Naopak nejhorší správnosti bylo dosaženo u kyseliny kaftarové (109 %) a nejhorší přesnosti u kyseliny chlorogenové (3,6 %). Metoda je tedy způsobilá pro kvantitativní analýzu všech studovaných analytů v čaji.

## 5.6.2 Tinktura

Příprava vzorku tinktury byla provedena podle kapitoly 4.3.7.2. Hodnoty meze kvantifikace metody (MQL), správnosti a přesnosti jsou uvedeny v Tab. 21.

Tab. 21: Hodnoty meze kvantifikace, správnosti a přesnosti – vzorek tinktura.

<b>Analyt</b>	<b>Mez kvantifikace [µg/l]</b>	<b>Správnost [%]</b>	<b>Přesnost [%]</b>
K. kaftarová	5000	104	3,0
K. chlorogenová	50	99,6	5,0
K. kávová	50	88,0	2,9
Echinakosid	20	110	2,9
Cynarin	20	192	2,4
K. chikorová	5000	94,4	1,5

V případě matrice tinktury už bohužel došlo k nesplnění jednoho kritéria přijatelnosti u jednoho analytu, kdy výsledek správnosti 192 % pro cynarin byl mimo povolené rozmezí 40-120 %. Hodnoty přesnosti jsou však pro všechny koncentrační úrovně v akceptačním limitu < 11 %, resp. < 30 %. Metoda je způsobilá pouze pro kvantitativní analýzu kyseliny kaftarové, kyseliny chlorogenové, kyseliny kávové, echinakosidu a kyseliny chikorové v tinktuře.

## 5.6.3 Tableta

Příprava vzorku tablety byla provedena podle kapitoly 4.3.7.3. Hodnoty meze kvantifikace metody (MQL), správnosti a přesnosti jsou uvedeny v Tab. 22.

Tab. 22: Hodnoty meze kvantifikace, správnosti a přesnosti – vzorek tableta.

<b>Analyt</b>	<b>Mez kvantifikace [µg/g]</b>	<b>Správnost [%]</b>	<b>Přesnost [%]</b>
K. kaftarová	6,3	155	2,7
K. chlorogenová	0,063	98,0	4,8
K. kávová	0,063	103	1,4
Echinakosid	0,025	118	2,3
Cynarin	0,025	191	2,4
K. chikorová	6,3	82,9	1,8

V případě analýzy tablety bylo u 4 standardů (kyseliny chlorogenové, kávové, echinakosidu a kyseliny chikorové) dosaženo akceptovatelných hodnot správnosti i přesnosti. V případě kyseliny kaftarové a cynarinu byla překročena hodnota správnosti (155 % a 191 %). Pro kyselinu kaftarovou činí povolený rozsah správnosti 40–120 % a pro cynarin 80–110 %. Metoda je způsobilá pouze pro kvantitativní analýzu kyseliny chlorogenové, kyseliny kávové, echinakosidu a kyseliny chikorové v tabletě.

Stanovení 29 analytů (mj. i kyseliny chlorogenové a kávové) pomocí LC/MS/MS v tabletě obsahující 6 bylin (*Lonicera japonica*, *Cyrtomium fortunei*, *Melicope pteleifolia*, *Vitex negundo* var. *cannabifolia*, *Tadehagi triquetrum*, and *Mussaenda pubescens* var. *alba*) je popsáno v publikaci [41]. Vzorky tablet byly skladovány při 4 °C a před analýzou rozemlety na jemný prášek. Navážka 0,20 g byla extrahována 100 ml 70 % metanolu ve vodě v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Extrahovaný roztok byl centrifugován při 150 000 ot./min po dobu 10 minut a poté odebrán supernatant. K roztoku vzorku (500 µl) byl přidán roztok vnitřního standardu (500 µl), vše bylo promícháno pomocí vortexu, zfiltrováno přes mikroporézní membránu (0,22 µm) a analyzováno pomocí UPLC-MS/MS systému pracujícího na principu trojitého kvadrupólu. Mez kvantifikace vyjádřená jako IQL pro kyselinu chlorogenovou činí 1,49 µg/l a pro kyselinu kávovou činí 8,71 µg/l, což po zohlednění přípravy vzorku představuje mez kvantifikace vyjádřenou jako MQL pro kyselinu chlorogenovou 2,98 µg/g a pro kyselinu kávovou 17,4 µg/g. Při hodnocení správnosti a přesnosti bylo provedeno obohacení vzorku vždy na třech koncentračních úrovních na úrovni desítek až stovek µg. V případě kyseliny chlorogenové bylo dosaženo správnosti 99,79–100,50 % a přesnosti 2,14–3,40 % a v případě kyseliny kávové bylo dosaženo správnosti 96,86–102,69 % a přesnosti 2,86–3,66 %. Při vzájemném porovnání obou metod vyplývá, že v rámci této bakalářské práce bylo dosaženo zhruba o 2-3 řády nižší meze stanovitelnosti při srovnatelné přesnosti, ale za cenu horší správnosti, přičemž u 2 analytů dokonce nebylo dosaženo akceptovatelného rozmezí. Jedním z možných vysvětlení neúspěchu může být snaha o aplikaci této metody ve výrazně nižší oblasti koncentrací a významný vliv matrice z důvodu použití vyšší navážky a nižšího množství extrakčního činidla.



## 5.7 Analýza reálných vzorků

Pro vzájemné porovnání významnosti zdrojů sledovaných analytů ve výživě člověka (Tab. 23) byly provedeny příslušné analýzy, ale vždy byly hodnoceny pouze ty analyty v těch matricích, při nichž bylo dosaženo požadovaných kritérií přijatelnosti. Poté byly výsledky přepočteny na běžné dávky, které jsou člověkem obvykle denně konzumovány – 250 ml čaje, 2,3 ml tinktury (2x20 kapek) popř. 1 tableta (0,87201 g) (Tab. 24).

Tab. 23: Množství\* daných analytů v hodnocených vzorcích.

Analyt	Čaj [μg/l]	Tinktura [μg/l]	Tableta [μg/kg]
K. kaftarová	42 200 ± 5 400	646 000 ± 39 000	nelze hodnotit
K. chlorogenová	2 710 ± 130	2 190 ± 220	1 550 ± 250
K. kávová	1 760 ± 250	29 400 ± 2 900	3 880 ± 540
Echinakosid	8,9 ± 1,0	69,5 ± 9,0	< 25
Cynarin	6,54 ± 0,27	nelze hodnotit	nelze hodnotit
K. chikorová	47 400 ± 1 600	392 000 ± 89 000	113 000 ± 2 200

\* Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 4 opakování ± dvojnásobek výběrové směrodatné odchylky.

Z kapalných forem je nejbohatším zdrojem téměř výhradně podle očekávání tinktura, která obsahuje přibližně 10x vyšší koncentrace sledovaných sloučenin než čaj. Jedinou výjimkou je kyselina chlorogenová, která je v obou těchto matricích přítomna v přibližně stejné koncentraci (2 710 ± 130 μg/l v čaji, resp. 2 190 ± 220 μg/l v tinktuře). Ve všech třech vzorcích jsou vždy dominantní kyselina chikorová a kyselina kaftarová, a to v širokém rozpětí o 1–5 řádů více než zbývající analyty. Nejnižší obsah byl zjištěn v případě cynarinu v čaji (6,54 ± 0,27 μg/l). Ve zbývajících 2 matricích však nemohla být tato sloučenina kvantifikována z důvodu nevyhovujících výsledků správnosti při validaci metody. Druhou nejméně zastoupenou sloučeninou byl echinakosid, který byl obsažen v množství 8,9 ± 1,0 μg/l v čaji, 69,5 ± 9,0 μg/l v tinktuře a v tabletě byl dokonce jeho obsah pod mezí stanovitelnosti (< 25 μg/kg).

Velice zajímavé informace však nabízí porovnání obsahu sledovaných sloučenin v obvyklých množstvích konzumovaných člověkem (Tab. 24), které přináší mnohem praktičtější a realističtější pohled na míru bohatosti zdroje. V této perspektivě je ve všech případech nejbohatším zdrojem poměrně překvapivě čaj, a to dokonce o 1–3 řády, než v případě tinktury nebo tablety. Je ovšem samozřejmě nutné brát v úvahu skutečnost, že

složení různých čajů, tinktur a tablet se může mezi výrobci značně lišit a že se jedná ohodnocení vždy jen jednoho zástupce pro každou matici, takže výše uvedené závěry nelze nijak generalizovat.

Tab. 24: Množství\* daných analytů v obvykle konzumované dávce hodnocených vzorků.

<b>Analyt</b>	<b>Čaj [μg/250 ml]</b>	<b>Tinktura [μg/2,3 ml]</b>	<b>Tableta [μg/ks]</b>
K. kaftarová	10 600 ± 1300	1 486 ± 89	nelze hodnotit
K. chlorogenová	677 ± 32	5,04 ± 0,51	1,35 ± 0,22
K. kávová	441 ± 64	67,6 ± 6,8	3,38 ± 0,47
Echinakosid	2,24 ± 0,26	0,160 ± 0,021	< 0,022
Cynarin	1,634 ± 0,068	nelze hodnotit	nelze hodnotit
K. chikorová	11 9850 ± 390	900 ± 210	98,54 ± 1,92

\* Výsledky jsou uvedeny jako aritmetický průměr ze 4 opakování ± dvojnásobek výběrové směrodatné odchylky.

## 6 ZÁVĚR

Tato bakalářská je zaměřena na vývoj, optimalizaci a validaci analytické metody využívající techniky vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí na kvantitativní stanovení 6 vybraných sloučenin (kyselina kaftarová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, echinakosid, cynarin a kyselina chikorová) obsažených v rostlině rodu *Echinacea* ve formě 3 různých potravních matric – čaj, tinktura a tableta.

V experimentální části práce byla nejdříve provedena základní optimalizace chromatografické separace, která zahrnovala optimalizaci složení mobilní fáze, gradientového programu, průtoku mobilní fáze a objemu nástřiku. Následně byla provedena optimalizace hmotnostní detekce v rámci, níž byly hodnoceny následující parametry: polarita a potenciál HESI kapiláry, průtok i teplota hlavního i pomocného zmlžujícího plynu, napětí částí iontové optiky, doba plnění iontové pasti a optimální hodnota kolizní energie pro každý analyt. V rámci optimalizačních procesů bylo dosaženo hodnot v předpokládaných intervalech.

Následnou validací metody bylo potvrzeno, že metoda poskytuje spolehlivé výsledky v těchto koncentračních rozsazích: 0,2–20 µg/l pro echinakosid a cynarin, 0,5–20 µg/l pro kyselinu chlorogenovou a kyselinu kávovou a 100–5000 µg/l pro kyselinu kaftarovou a kyselinu chikorovou. Poté byla analytická metoda dále validována pro použití na vzorky obsahující reálnou přírodní matici. V případě čaje byla spolehlivost metody prokázána splněním všech požadovaných kritérií přijatelnosti pro všechny analyty. V případě zbývajících 2 matric však nebyla splněna kritéria přijatelnosti pro správnost pro cynarin (tinktura, tableta) a pro kyselinu kaftarovou (tableta). Bohužel vzhledem k časové tísní způsobené nepředvídatelnými a neustále se měnícími protiepidemickými opatřeními nebyl již dostatečný prostor pro další experimentální práci na vysvětlení příčiny a na nalezení takových podmínek, aby byla splněna kritéria přijatelnosti i pro tyto problematické analyty.

Na závěr bylo provedeno hodnocení jednotlivých typů vzorků z hlediska obsahu sledovaných sloučenin. Bylo zjištěno, že tinktura obsahuje přibližně 10x vyšší koncentrace sledovaných sloučenin než čaj, s výjimkou kyseliny chlorogenové, která je v obou těchto maticích přítomna v přibližně stejné koncentraci. Ve všech třech vzorcích jsou vždy dominantní kyselina chikorová a kyselina kaftarová, a naopak nejnižší obsah byl zjištěn v případě cynarinu a echinakosidu. Při porovnání obsahu sledovaných sloučenin v obvyklých množstvích konzumovaných člověkem je však nejbohatším zdrojem poměrně překvapivě čaj (o 1–3 řády), ale zároveň je nutné brát v úvahu, že složení různých potravin či potravních doplňků se může mezi výrobci značně lišit.

## 7 CITOVANÁ LITERATURA

- [1] MOLAVEISI, Mohammad, Mostafa SHAHIDI NOGHABI, Karim PARASTOUEI a Ramezan Ali TAHERI. Fate of nano-phytosomes containing bioactive compounds of Echinacea extract in an acidic food beverage. *Food Structure*. 2021, **27**. ISSN 22133291. Dostupné z: doi:10.1016/j.foostr.2021.100177.
- [2] NAGOOR MEERAN, M.F., Hayate JAVED, Charu SHARMA, Sameer N. GOYAL, Sanjay KUMAR, Niraj Kumar JHA a Shreesh OJHA. Can Echinacea be a potential candidate to target immunity, inflammation, and infection - The trinity of coronavirus disease 2019. *Heliyon* [online]. 2021, **7**(2) [cit. 2021-04-07]. ISSN 24058440. Dostupné z: doi:10.1016/j.heliyon.2021.e05990.
- [3] Zdraví-nemoc.cz [online]. PROMOPRODUKCE CZ, 2019, 6.2. [cit. 2021-03-14]. Dostupné z: <https://zdravi-nemoc.cz/echinacea-trapatka-nachova>.
- [4] BARRETT, Bruce, Roger BROWN, Dave RAKEL, Marlon MUNDT, Kerry BONE, Shari BARLOW a Tola EWERS. Echinacea for Treating the Common Cold. *Annals of Internal Medicine*. 2010, **153**(12). ISSN 0003-4819. Dostupné z: doi:10.7326/0003-4819-153-12-201012210-00003.
- [5] BERKNER, Daniel a Leo SIORIS. Echinacea. TRACY, Timothy S. a Richard L. KINGSTON, ed. *Herbal Products*. Totowa, NJ: Humana Press, 2007, s. 97-109. Forensic Science and Medicine. ISBN 978-1-58829-313-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-59745-383-7\_6.
- [6] KARSCH-VÖLK, Marlies, Bruce BARRETT, David KIEFER, Rudolf BAUER, Karin ARDJOMAND-WOELKART a Klaus LINDE. Echinacea for preventing and treating the common cold. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. ISSN 14651858. Dostupné z: doi:10.1002/14651858.CD000530.pub3.
- [7] THYGESEN, Line, Johanna THULIN, Alan MORTENSEN, Leif H. SKIBSTED a Per MOLGAARD. Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from Echinacea purpurea, alone and in combination. *Food Chemistry*. 2007, **101**(1), 74-81. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.048.
- [8] ONISZCZUK, Tomasz, Anna ONISZCZUK, Ewa GONDEK, et al. Active polyphenolic compounds, nutrient contents and antioxidant capacity of extruded fish feed containing purple coneflower (Echinacea purpurea (L.) Moench.). *Saudi Journal of Biological Sciences* [online]. 2019, **26**(1), 24-30 [cit. 2021-04-07]. ISSN 1319562X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2016.11.013.

- [9] KUMAR, K.M a Sudha RAMAIAH. *International Journal of Pharma and Bio Sciences PHARMACOLOGICAL IMPORTANCE OF ECHINACEA PURPUREA*. (Vol 2). ISSN 0975-6299.
- [10] SHARMA, M., R. SCHOOP a J. B. HUDSON. Echinacea as an antiinflammatory agent: the influence of physiologically relevant parameters. *Phytotherapy Research*. 2009, **23**(6), 863-867. ISSN 0951418X. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.2714.
- [11] WAIDYANATHA, Suramya, Jessica PIERFELICE, Tim CRISTY, Esra MUTLU, Brian BURBACK, Cynthia V. RIDER a Kristen RYAN. A strategy for test article selection and phytochemical characterization of Echinacea purpurea extract for safety testing. *Food and Chemical Toxicology*. 2020, **137**. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2020.111125.
- [12] HALL, Clifford. *Echinacea as a functional food ingredient*. Elsevier, 2003, 2003, , 113-173. Advances in Food and Nutrition Research. ISBN 9780120164479. Dostupné z: doi:10.1016/S1043-4526(03)47003-4.
- [13] LEE, Jungmin a Carolyn F. SCAGEL. Chicoric acid levels in commercial basil (*Ocimum basilicum*) and Echinacea purpurea products. *Journal of Functional Foods* [online]. 2010, **2**(1), 77-84 [cit. 2021-04-07]. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2009.11.004.
- [14] ESPÍNDOLA, Kaio Murilo Monteiro, Roseane Guimarães FERREIRA, Luis Eduardo Mosquera NARVAEZ, Amanda Caroline Rocha SILVA ROSARIO, Agnes Hanna Machado DA SILVA, Ana Gabrielle Bispo SILVA, Ana Paula Oliveira VIEIRA a Marta Chagas MONTEIRO. Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Frontiers in Oncology* [online]. 2019, **9** [cit. 2021-04-07]. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2019.00541.
- [15] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 1999. ISBN 80-902391-5-3.
- [16] Polymer Properties Database. CROW org.[online]. CROW © 2015 [cit. 2021-02-21]. Dostupné z: <https://polymerdatabase.com/polymer%20chemistry/Antioxidants.html#Secondary%20AO>.
- [17] PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (USA), National Center for Biotechnology Information; 2004-. Souhrn sloučeniny PubChem pro CID 689043, kyselina kávová; [citováno 2021 duben 7]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeic-acid>.

- [18] ERIKEL, Esra, Deniz YUZBASIOGLU a Fatma UNAL. In vitro genotoxic and antigenotoxic effects of cynarin. *Journal of Ethnopharmacology*. 2019, **237**, 171-181. ISSN 03788741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2019.03.036.
- [19] LEE, Jungmin a Carolyn F. SCAGEL. Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. *Frontiers in Chemistry*. 2013, **1**. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2013.00040.
- [20] LEE, Jungmin a Carolyn F. SCAGEL. Chicoric acid levels in commercial basil (*Ocimum basilicum*) and *Echinacea purpurea* products. *Journal of Functional Foods*. 2010, **2**(1), 77-84. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2009.11.004.
- [21] HAYASAKA, Yoji, Cory A. BLACK, Jeremy HACK a Paul SMITH. Structural characterization of reaction products of caftaric acid and bisulfite present in a commercial wine using high resolution mass spectrometric and nuclear magnetic resonance techniques. *Food Chemistry*. 2017, **230**, 99-107. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.005.
- [22] ZHENG, Yuxue, Xiuxiu YIN, Xiangli KONG, et al. Introduction of chlorogenic acid during extrusion affects the physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of rice flour. *Food Hydrocolloids*. 2021, **116**. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2021.106652.
- [23] ZHANG, Weihao, Linghua PIAO a Xiande LIU. Chlorogenic acid suppresses neutrophil recruitment to tumors by inducing apoptosis and reverse migration. *Journal of Functional Foods*. 2020, **75**. ISSN 17564646. Dostupné z: doi:10.1016/j.jff.2020.104216.
- [24] EL JAOUHARI, Abdelhadi, Yong WANG, Bowen ZHANG, Xiuhua LIU a Jinhua ZHU. Effect of surface properties on the electrochemical response of cynarin by electro-synthesized functionalized-polybithiophene/MWCNT/GNP. *Materials Science and Engineering: C*. 2020, **114**. ISSN 09284931. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2020.111067.
- [25] TAO, Zhi, Lihu ZHANG, Tao WU, Xianying FANG a Linguo ZHAO. Echinacoside ameliorates alcohol-induced oxidative stress and hepatic steatosis by affecting SREBP1c/FASN pathway via PPAR $\alpha$ . *Food and Chemical Toxicology*. 2021, **148**. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2020.111956.

- [26] GAI, Xiangyun, Pengcheng LIN, Yanfeng HE, et al. Echinacoside prevents hypoxic pulmonary hypertension by regulating the pulmonary artery function. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2020, **144**(4), 237-244. ISSN 13478613. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphs.2020.09.002.
- [27] XIE, Jun, Jun DENG, Feng TAN a Jing SU. Separation and purification of echinacoside from *Penstemon barbatus* (Can.) Roth by recycling high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2010, **878**(28), 2665-2668. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2010.07.023.
- [28] XIA, Jia-Xuan, Bin-Bin ZHAO, Jun-Feng ZAN, Ping WANG a Lin-Lin CHEN. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Artemisiae Argyi Folium* by HPLC-MS/MS and discovery of antioxidant ingredients based on relevance analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019, **175**. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2019.06.031.
- [29] ZHANG, Liuquan, Yi LI, Ying LIANG, et al. Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry*. 2019, **276**, 538-546. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2018.10.074.
- [30] PELLATI, Federica, Giulia ORLANDINI a Stefania BENVENUTI. Simultaneous metabolite fingerprinting of hydrophilic and lipophilic compounds in *Echinacea pallida* by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1242**, 43-58. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.04.025.
- [31] PADILHA, Carla Valéria da Silva, Gabriela Aquino MISKINIS, Marcelo Eduardo Alves Olinda DE SOUZA, Giuliano Elias PEREIRA, Débora DE OLIVEIRA, Marilde Terezinha BORDIGNON-LUIZ a Marcos dos Santos LIMA. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*. 2017, **228**, 106-115. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.137.
- [32] BRUNI, Renato, Virginia BRIGHENTI, Lindsay K. CAESAR, Davide BERTELLI, Nadja B. CECH a Federica PELLATI. Analytical methods for the study of bioactive compounds from medicinally used *Echinacea* species. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018, **160**, 443-477. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2018.07.044.

- [33] ARSLAN BURNAZ, Nesibe, Murat KÜÇÜK a Zeynep AKAR. An on-line HPLC system for detection of antioxidant compounds in some plant extracts by comparing three different methods. *Journal of Chromatography B*. 2017, **1052**, 66-72. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2017.03.003.
- [34] PELLATI, Federica, Giulia ORLANDINI a Stefania BENVENUTI. Simultaneous metabolite fingerprinting of hydrophilic and lipophilic compounds in *Echinacea pallida* by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 2012, **1242**, 43-58. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2012.04.025.
- [35] CASTRO, Joaodimir, M. V. Balarama KRISHNA, John R. CHOINIERE a R. Kenneth MARCUS. Analysis of caffeic acid derivatives in echinacea extracts by liquid chromatography particle beam mass spectrometry (LC–PB/MS) employing electron impact and glow discharge ionization sources. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, **397**(3), 1259-1271. ISSN 1618-2642. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-3612-0.
- [36] KAHOUN, David. Laboratorní cvičení z analytické chemie – úloha č. 5: Stanovení fenolu a  $\alpha$ -naftolu ve vodě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na obrácených fázích se spektrofotometrickou detekcí v ultrafialové oblasti (RP-HPLC-UV). 4. České Budějovice.
- [37] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [38] *Thermo-normalizovaná kolizní energie-brochure* [online]. [cit. 2021-04-13]. Dostupné z: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/PSB104-Normalized-Collision-Energy-Technology-EN.pdf?fbclid=IwAR1ZWxx87tUjuAQ6zAoHDIsfKwmRgUIlibvqI1Lnh4qcX5dd5oZRQlhQSv0Q>.
- [39] *Official methods of analysis of AOAC International*. 16th ed. Arlington: AOAC International, 1995. ISBN 0-935584-54-4.
- [40] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.



- [41] LIN, Yu, Wen XU, Mingqing HUANG, Wei XU, Huang LI, Miao YE, Xun ZHANG a Kedan CHU. Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Acids, Flavonoids and Iridoid Glycosides in Yinhua Kanggan Tablet by UPLC-QqQ-MS/MS. *Molecules*. 2015, **20**(7), 12209-12228. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules200712209.

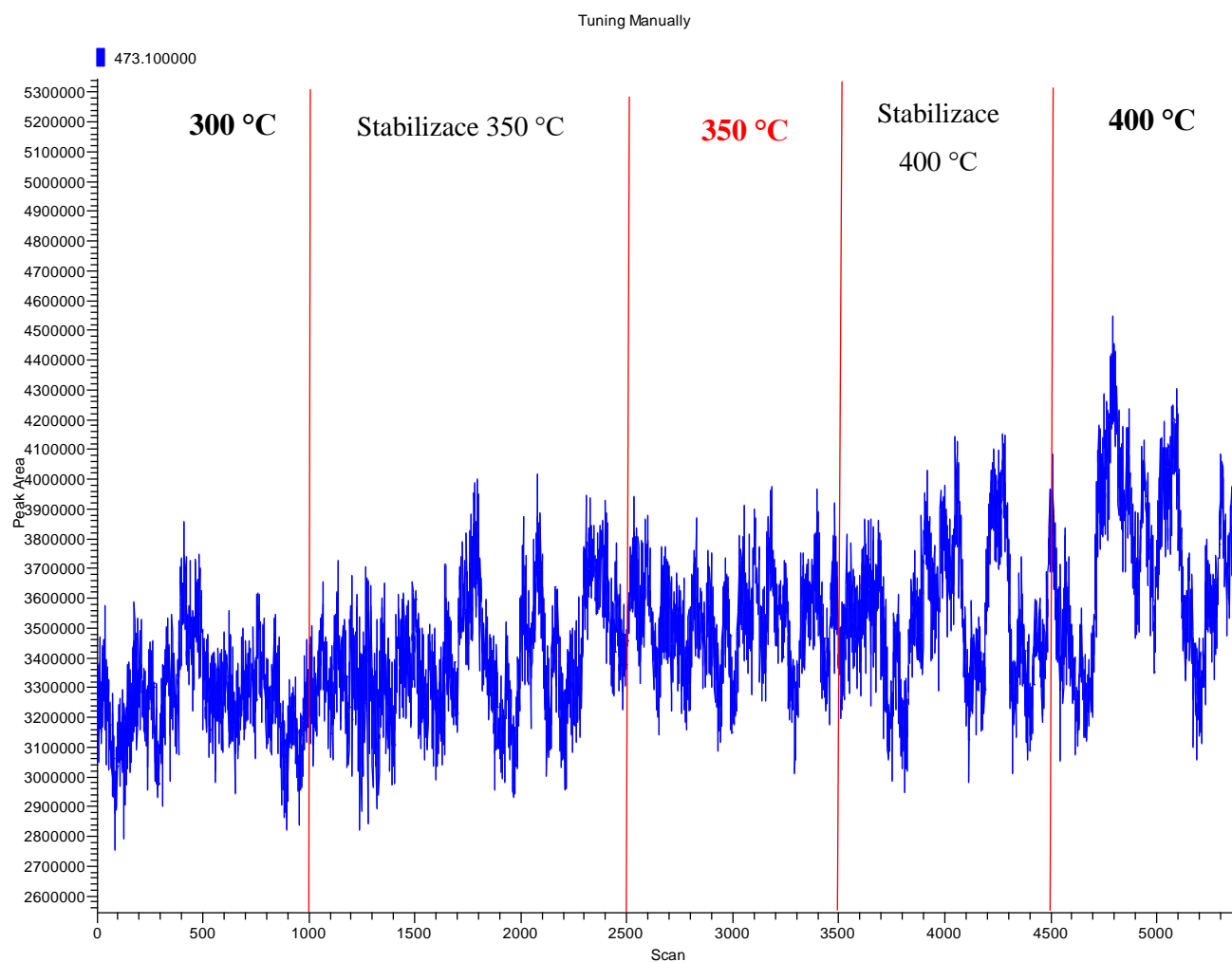
## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

Arb	relativní veličina určená referenčním měřením
CAS	Chemical Abstract Service
Celk.	celkový
DL	mez detekce
<i>E.</i>	<i>Echinacea</i>
ESI	ionizace elektrosprejem
HESI	ionizace vyhřívaným elektrosprejem
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IDL	instrumentální mez detekce
IQL	instrumentální mez kvantifikace
K	kalibrační roztok
Konc.	koncentrace
LC-CAD	spojení kapalinové chromatografie s aerosolovým detektorem
LC-DAD	spojení kapalinové chromatografie s detektorem s diodovým polem
LC-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí
LC-UV	spojení kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti
m/z	poměr hmotnosti a náboje iontu
MDL	mez detekce metody
MF	mobilní fáze
MQL	mez kvantifikace metody
Mr	molární hmotnost
MRM	monitorování více reakcí
ot./min	otáček za minutu
PB/MS	particle beam
PTFE	polytetrafluorethylen
QC	koeficient kvality
QL	mez stanovitelnosti
resp.	respektive
Roztok Č	roztok čaj
Roztok T	roztok tableta
Roztok Tin	roztok tinktura

S/N	poměr signálu k šumu
SI	slepý
SP	slepý pokus
SPE	extrakce na tuhé fázi
ST	standard
SÚKL	státní ústav pro kontrolu léčiv
UPLC-MS/MS	ultraúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
VS	vnitřní standard

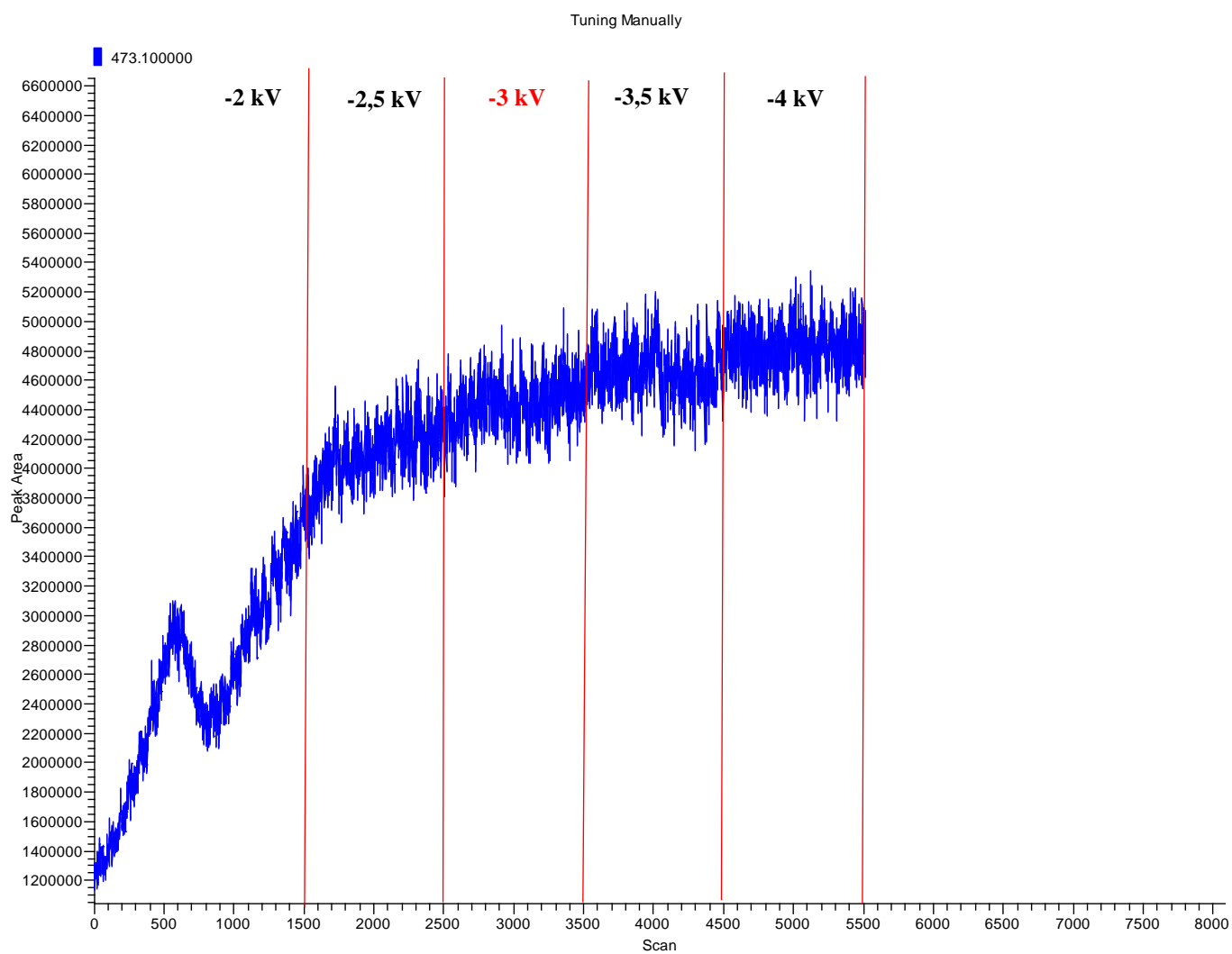
## 9 PŘÍLOHY

### 9.1 Příloha A



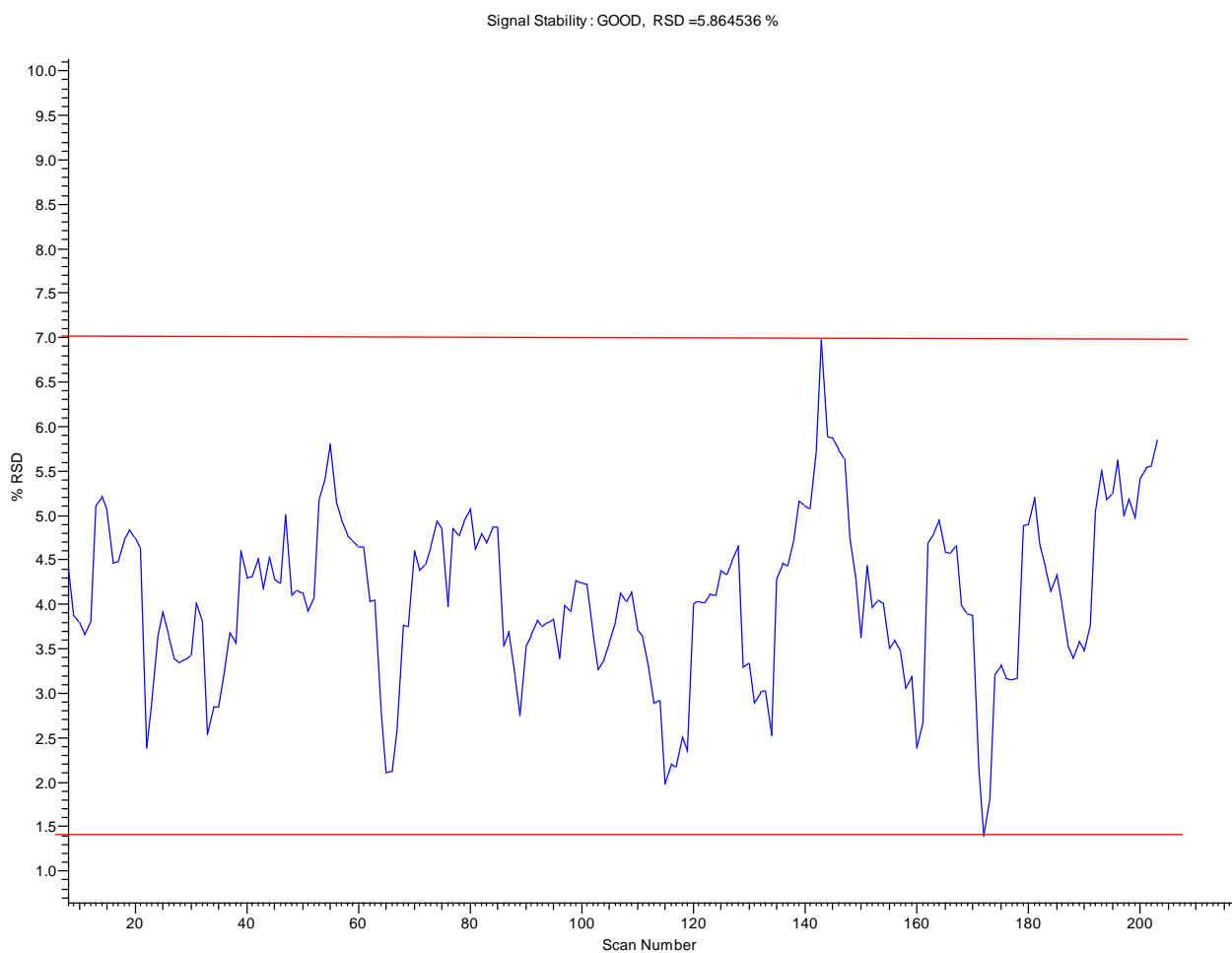
Obr. 10: Graf závislosti odezvy detektoru na teplotě zmlžujících plynů v HESI kapiláře (300, 350 a 400 °C) při kontinuálním přidavku standardu kyseliny chikorové do proudu mobilní fáze.

## 9.2 Příloha B



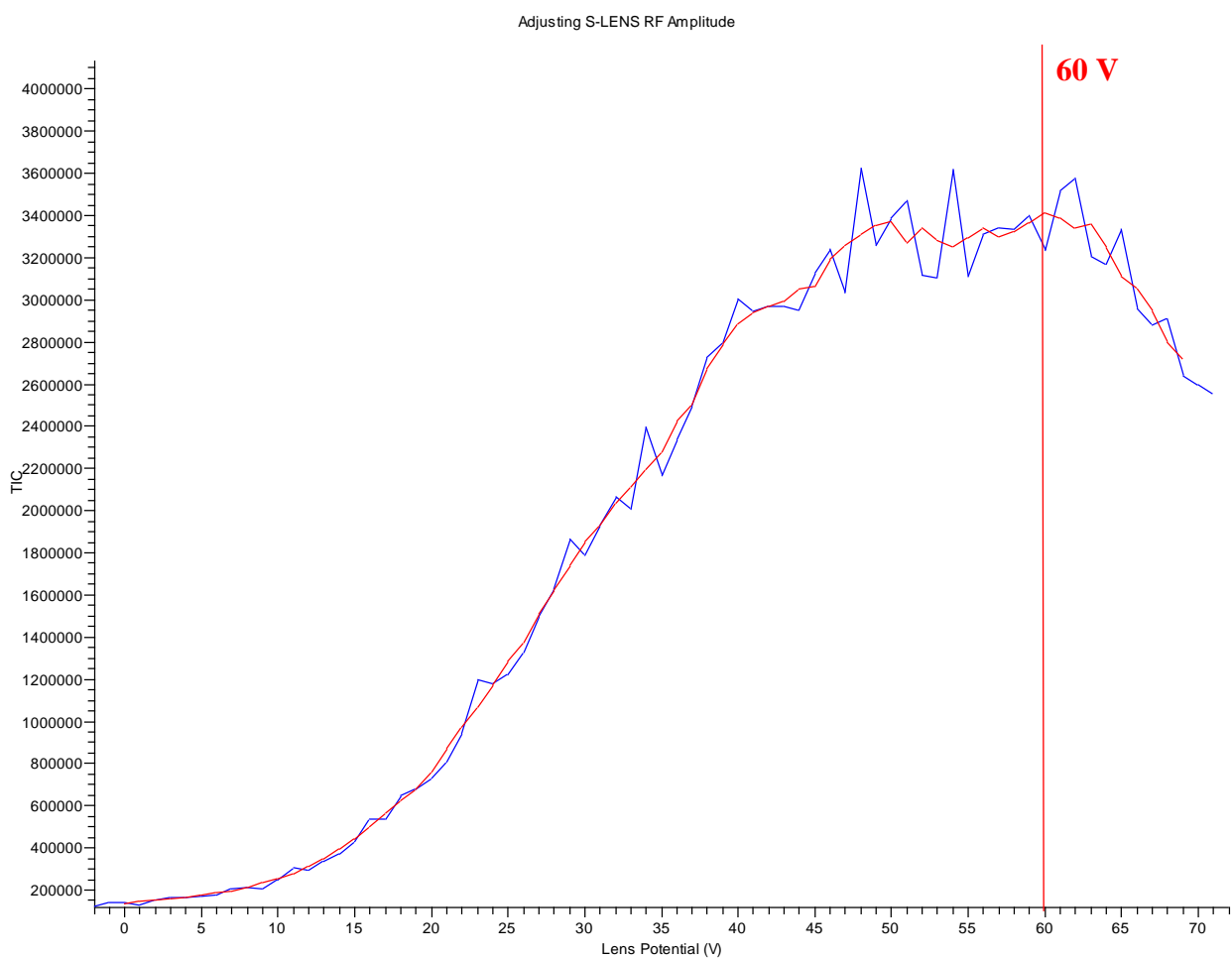
Obr. 11: Graf závislosti odezvy detektoru na napětí HESI kapiláry (-2, -2,5, -3, -3,5 a -4 kV) při kontinuálním přidavku standardu kyseliny chikorové do proudu mobilní fáze.

### 9.3 Příloha C



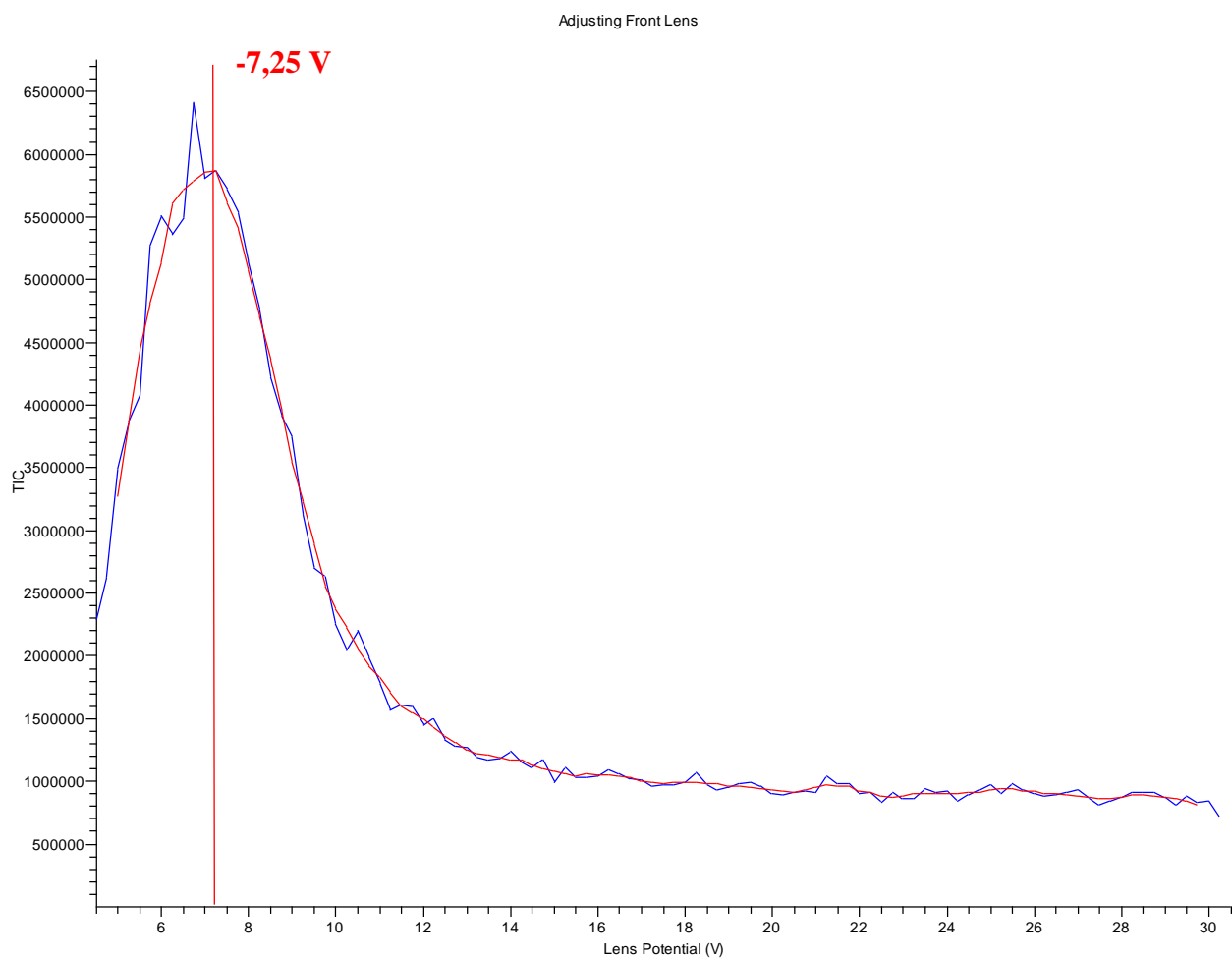
Obr. 12: Graf závislosti odezvy detektoru na čase při konstantních podmínkách při kontinuálním přidavku standardu kyseliny chikorové do proudu mobilní fáze. Stabilita iontového zdroje se pohybuje v přijatelném rozsahu 1,4–7,0 %.

## 9.4 Příloha D



Obr. 13: Graf závislost odezvy detektoru na potenciálu S-čoček (0–70 V) při kontinuálním přidavku standardu kyseliny chikorové do proudu mobilní fáze.

## 9.5 Příloha E

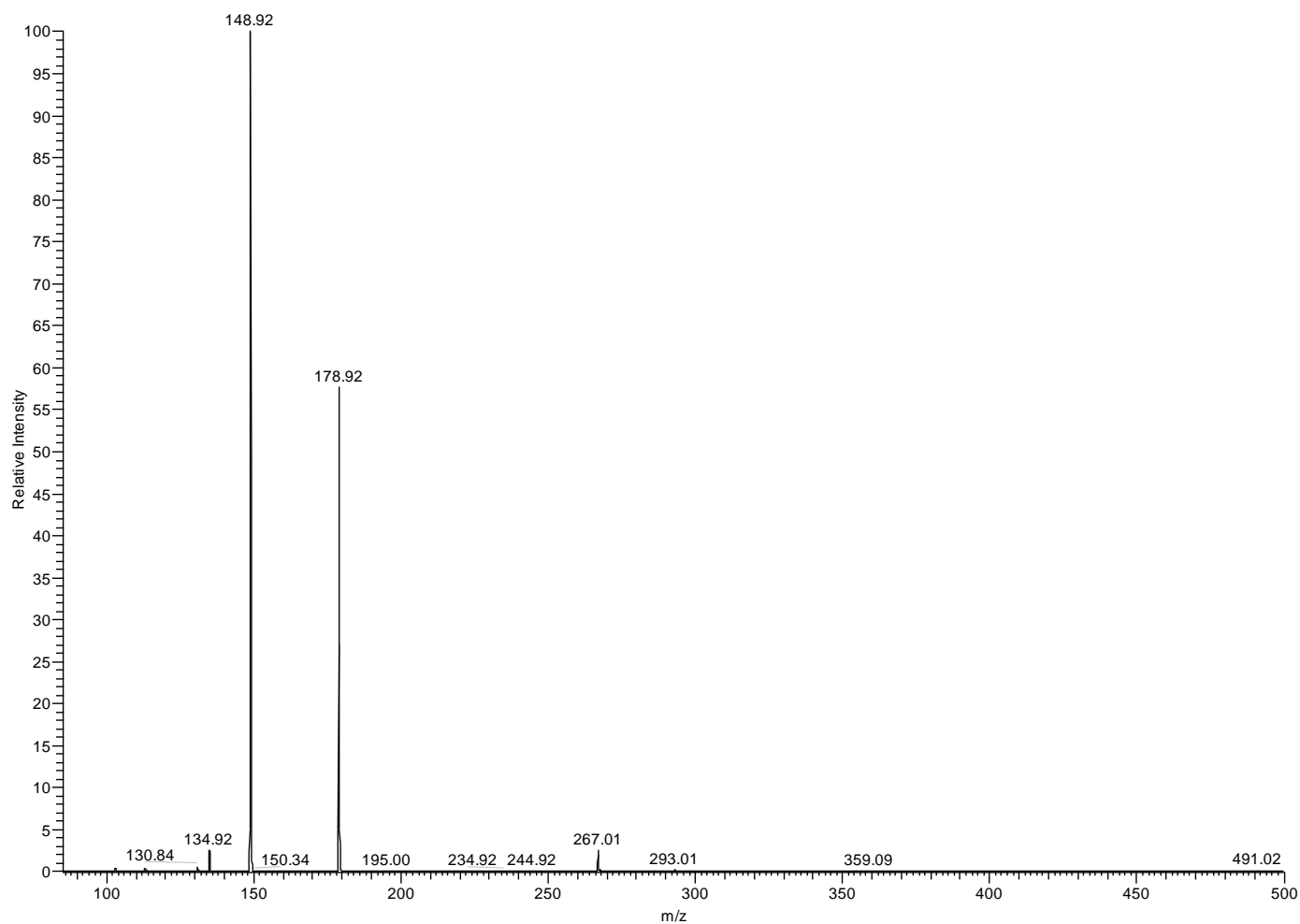


Obr. 14: Graf závislosti odezvy detektoru na potenciálu F-čoček (5–30 V) při kontinuálním přidavku standardu kyseliny chikorové do proudu mobilní fáze.



## 9.6 Příloha F

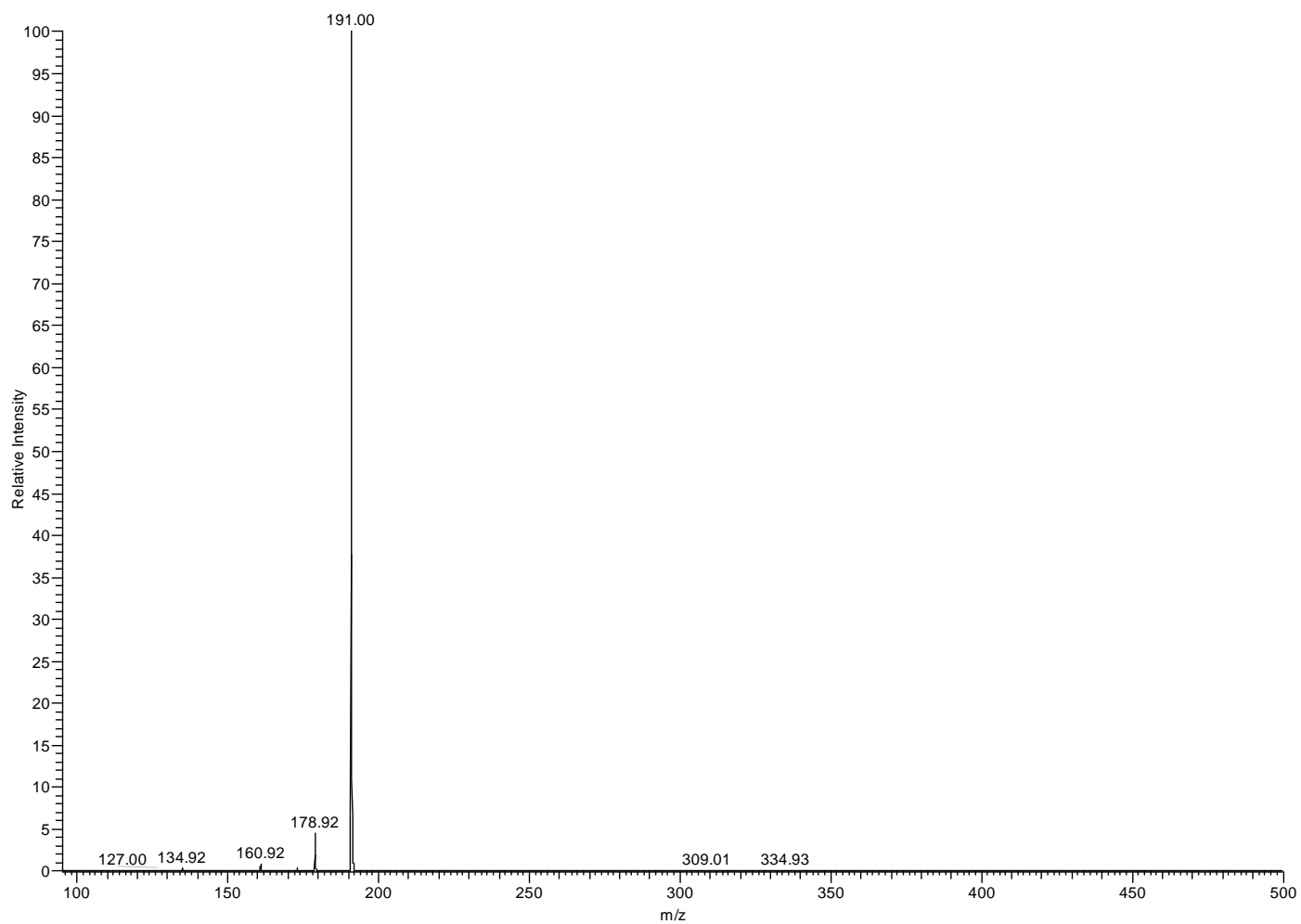
#18408 IT: 0.109 ST: 0.12 uS: 1 CS: 1 AMW: 149.93 NL: 1.07E7  
F: ITMS - p HESI Full ms2 311.10@cid35.00 [85.00-500.00]



Obr. 15: MS/MS spektrum kyseliny kaftarové.

## 9.7 Příloha G

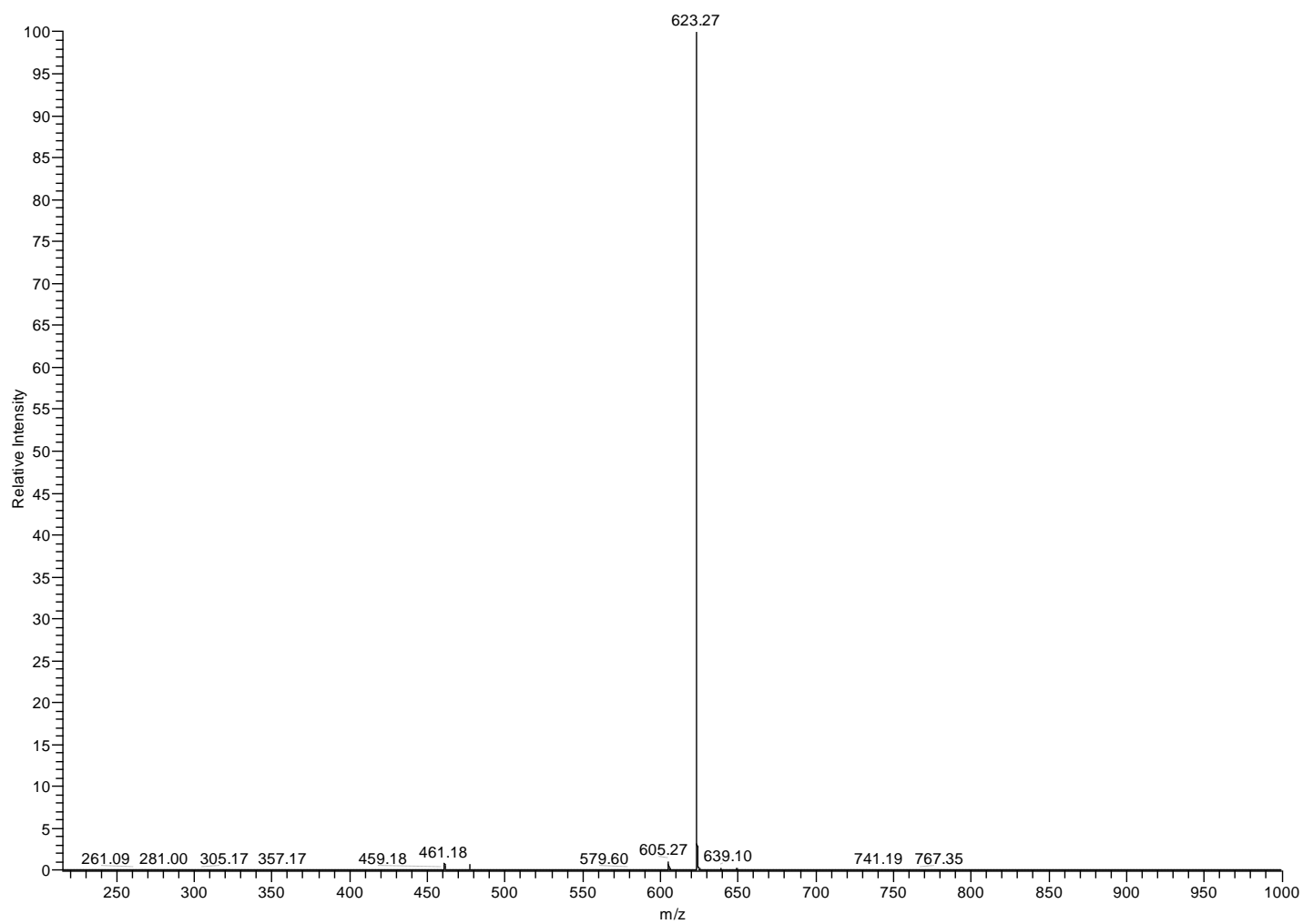
#27057 IT: 0.204 ST: 0.12 uS: 1 CS: 1 AMW: 192.01 NL: 4.80E6  
F: ITMS - p HESI Full ms2 353.10@cid35.00 [95.00-500.00]



Obr. 16: MS/MS spektrum kyseliny chlorogenové.

## 9.8 Příloha H

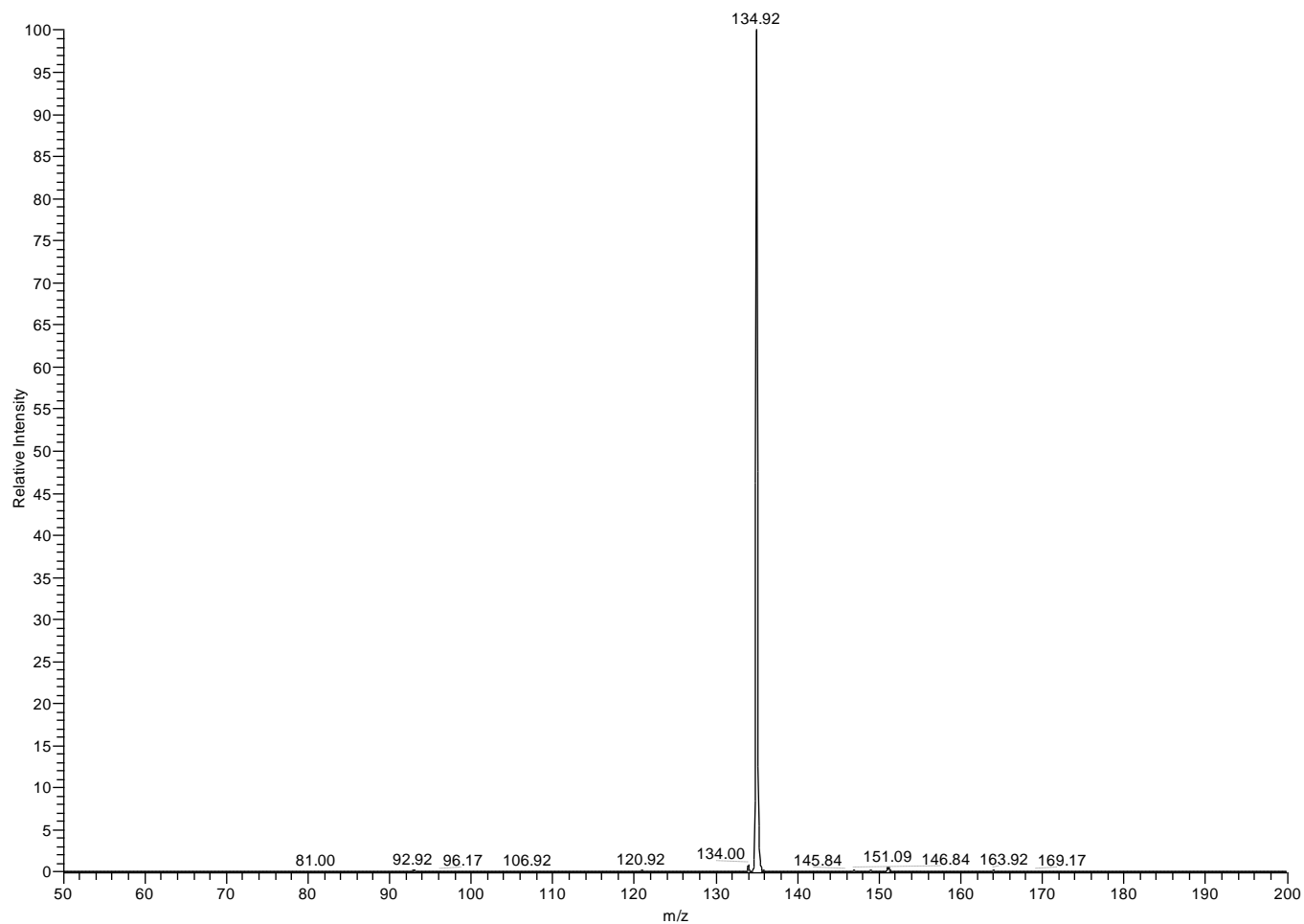
#30422 IT: 10.679 ST: 0.15 uS: 1 CS: 1 AMW: 624.27 NL: 1.78E5  
F: ITMS - p HESI Full ms2 785.30@cid35.00 [215.00-1000.00]



Obr. 17: MS/MS spektrum echinakosidu.

## 9.9 Příloha CH

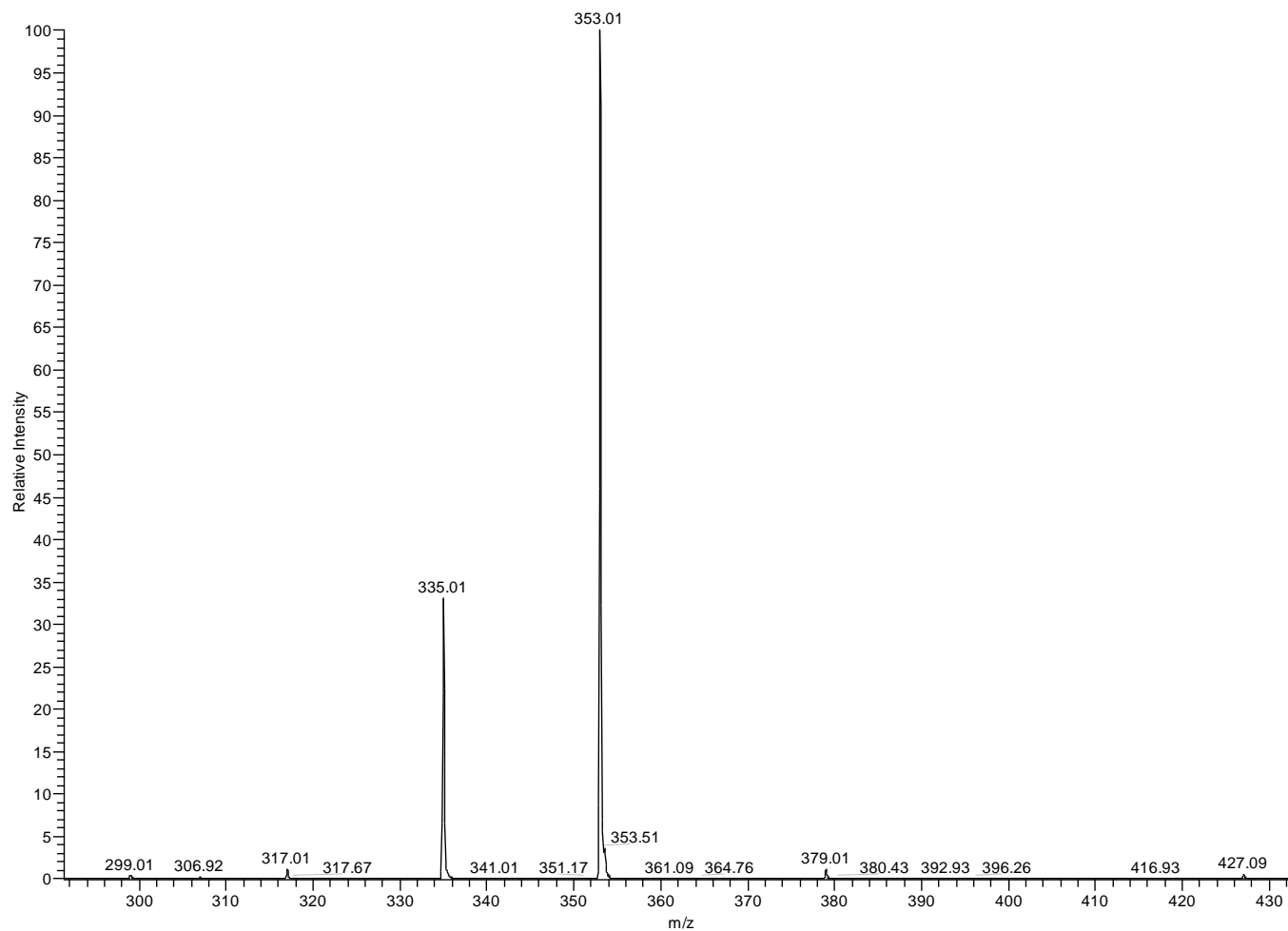
#402971 IT: 100.000 ST: 0.21 uS: 1 CS: 1 AMW: 135.93 NL: 4.48E3  
F: ITMS - p HESI Full ms2 179.00@cid35.00 [50.00-200.00]



Obr. 18: MS/MS spektrum kyseliny kávové.

## 9.10 Příloha I

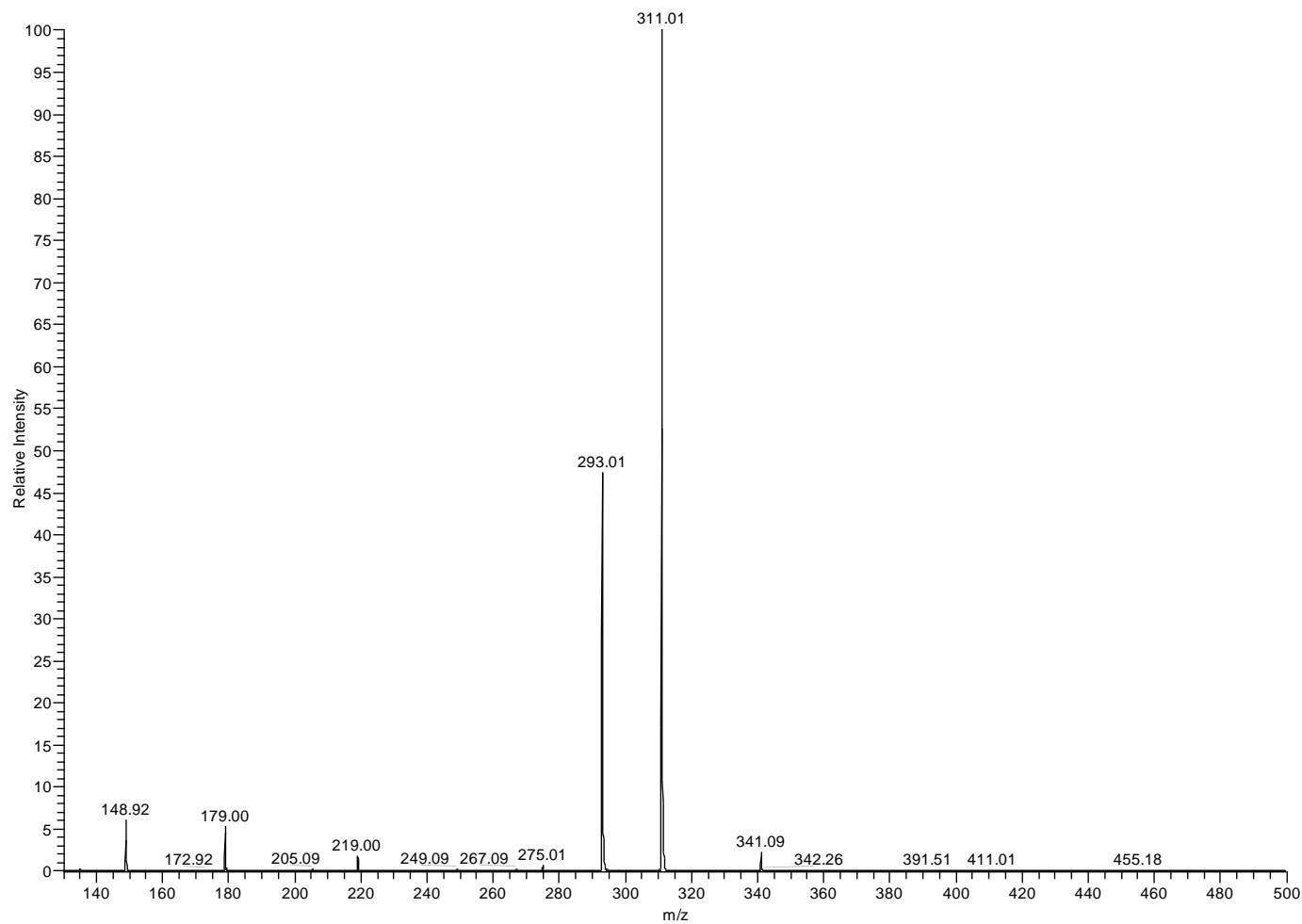
#23915 IT: 0.913 ST: 0.14 uS: 1 NL: 1.78E6  
F: ITMS - p HESI Full ms2 515.10@cid35.00 [140.00-1000.00]



Obr. 19: MS/MS spektrum cynarinu.


## 9.11 Příloha J

#379644 IT: 0.016 ST: 0.12 uS: 1 NL: 4.78E7  
F: ITMS - p HESI Full ms2 473.10@cid35.00 [130.00-500.00]



Obr. 20: MS/MS spektrum kyseliny chikorové.

## 9.12 Příloha K

	<b>Linearita - Korelační a QC koeficient - Echinacea - Caftaric acid</b>	EffiChem s.r.o. Purkyňova 649/127 Brno
---	--	--

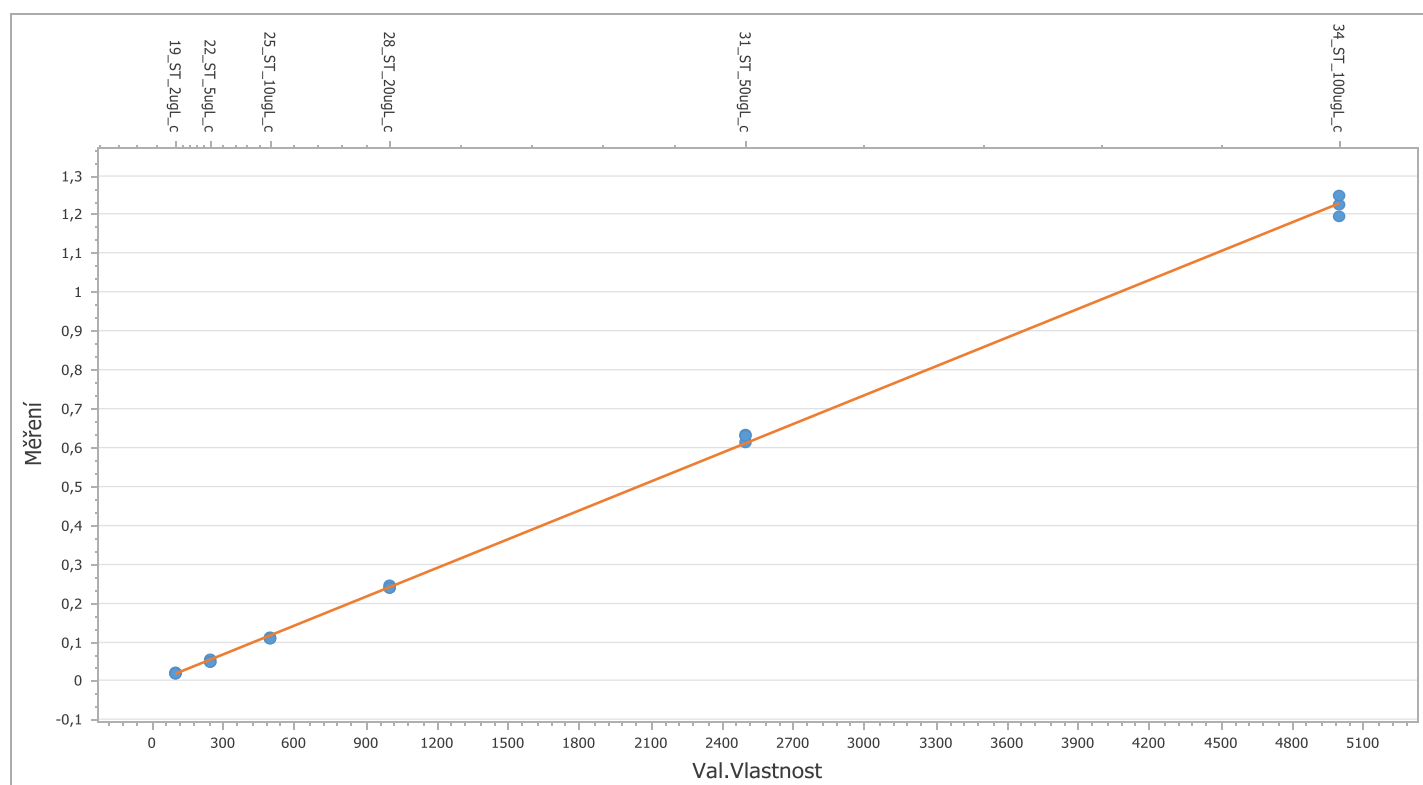
### Vstupní data

Popis	Val. vlastnost [µg/l]	Měření [1]
ST_100ugL_c	100	0,021094402511442
ST_100ugL_c	100	0,01958618846409
ST_100ugL_c	100	0,019516035662174
ST_250ugL_a	250	0,054187390449579
ST_250ugL_b	250	0,048032162004286
ST_250ugL_c	250	0,048392784164253
ST_500ugL_a	500	0,113527124917153
ST_500ugL_b	500	0,109348305684091
ST_500ugL_c	500	0,109868284089547
ST_1000ugL_a	1000	0,244494334119815
ST_1000ugL_b	1000	0,240578987366801
ST_1000ugL_c	1000	0,237744413392871
ST_2500ugL_a	2500	0,61191534236045
ST_2500ugL_b	2500	0,631873746995881
ST_2500ugL_c	2500	0,630175383663184
ST_5000ugL_a	5000	1,22575967090454
ST_5000ugL_b	5000	1,24899158374938
ST_5000ugL_c	5000	1,19515305274094

### Vyhodnocení

Vypočteny R	R k testování	Vypočteny QC	QC k testování	Max. hodnota pro úsek (absolutní)	Vypočtená hodnota úseku	Hypotéza
[1]	[1]	[%]	[%]	[1]	[1]	
0,9996	0,99	3,2666	5	20	-0,007	Přijata

## Graf



Závěr: Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního a QC koeficientu. Vypočtená hodnota úseku pro danou přímku vyhovuje kritériu přijatelnosti pro úsek. Rovnice přímky:  $y = -0,007 + 0,0002 * x$ .

Podpůrná statistika: Úsek (odhad) = -0,006998

Směrnice (odhad) = 0,000247

Směrodatná odchylka úseku (odhad) = 0,004156

Směrodatná odchylka směrnice (odhad) = 2E-06

Interval spolehlivosti pro úsek = (-0,015809) - (0,001813)

Interval spolehlivosti pro směrnici = (0,000244) - (0,000251)

Reziduální rozptyl (odhad) = 0,000162


Směrodatná odchylka reziduí (odhad) = 0,012739

Korelační koeficient = 0,999607

QC Koeficient = 3,26659 %



## 9.13 Příloha L

	<b>Linearita - Korelační a QC koeficient - Echinacea - Chlorogenic acid</b>	EffiChem s.r.o. Purkyňova 649/127 Brno
---	---	--

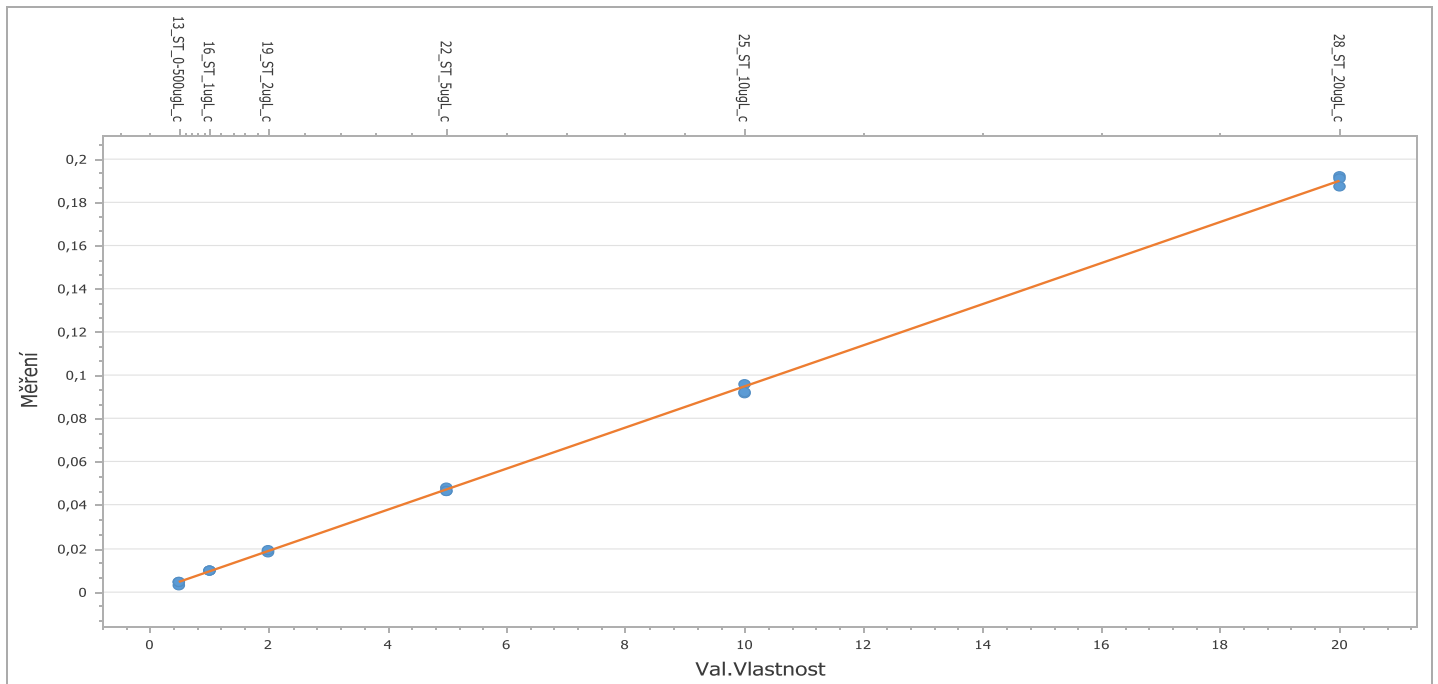
### Vstupní data

Popis	Val. vlastnost [µg/l]	Měření [1]
ST_0,500ugL_a	0,5	0,002999088205254
ST_0,500ugL_b	0,5	0,004707633569198
ST_0,500ugL_c	0,5	0,004601397022537
ST_1ugL_a	1	0,00961493240597
ST_1ugL_b	1	0,009634379436358
ST_1ugL_c	1	0,009899177579342
ST_2ugL_c	2	0,018747164210406
ST_2ugL_c	2	0,018380085920425
ST_2ugL_c	2	0,019409671821675
ST_5ugL_a	5	0,048036136407128
ST_5ugL_b	5	0,046789179906086
ST_5ugL_c	5	0,046735695799981
ST_10ugL_a	10	0,096128762739702
ST_10ugL_b	10	0,091852581128775
ST_10ugL_c	10	0,092284875347426
ST_20ugL_a	20	0,191904359603652
ST_20ugL_b	20	0,191108900452616
ST_20ugL_c	20	0,18735216487604

### Vyhodnocení

Vypočteny R	R k testování	Vypočteny QC	QC k testování	Max. hodnota pro úsek (absolutní)	Vypočtená hodnota úseku	Hypotéza
[1]	[1]	[%]	[%]	[1]	[1]	
0,9998	0,99	2,2976	5	20	-0,0004	Přijata

## Graf



Závěr: Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního a QC koeficientu. Vypočtená hodnota úseku pro danou přímku vyhovuje kritériu přijatelnosti pro úsek. Rovnice přímky:  $y = -0,0004 + 0,0095 * x$ .

Podpůrná statistika: Úsek (odhad) = -0,000388

Směrnice (odhad) = 0,009499

Směrodatná odchylka úseku (odhad) = 0,000476

Směrodatná odchylka směrnice (odhad) = 4,9E-05

Interval spolehlivosti pro úsek = (-0,001397) - (0,000622)

Interval spolehlivosti pro směrnici = (0,009395) - (0,009604)


Reziduální rozptyl (odhad) = 2E-06

Směrodatná odchylka reziduí (odhad) = 0,001434

Korelační koeficient = 0,999785

QC Koeficient = 2,297617 %

## 9.14 Příloha M

	<b>Linearita - Korelační a QC koeficient - Echinacea - Echinacoside</b>	EffiChem s.r.o. Purkyňova 649/127 Brno
---	---	--

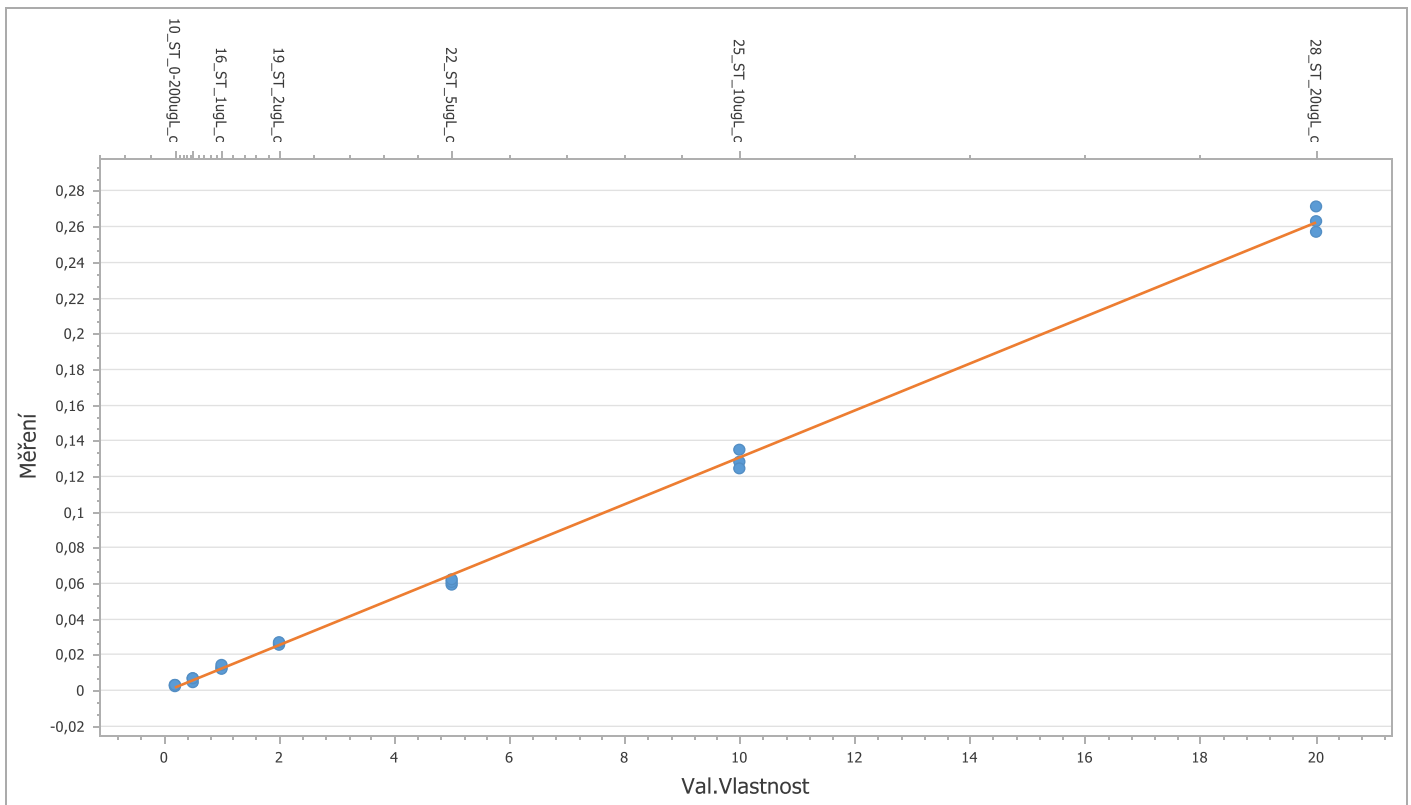
### Vstupní data

Popis	Val. vlastnost [µg/l]	Měření [1]
ST_0,200ugL_a	0,2	0,00292270781039656
ST_0,200ugL_b	0,2	0,00262513104856227
ST_0,200ugL_c	0,2	0,0029855332744115
ST_0,500ugL_a	0,5	0,004394493508203
ST_0,500ugL_b	0,5	0,006803519876493
ST_0,500ugL_c	0,5	0,00666524165417
ST_1ugL_a	1	0,013164219122644
ST_1ugL_b	1	0,012285672810505
ST_1ugL_c	1	0,014511011946214
ST_2ugL_c	2	0,026356464908044
ST_2ugL_c	2	0,025961760806415
ST_2ugL_c	2	0,02688275983955
ST_5ugL_a	5	0,059121832155122
ST_5ugL_b	5	0,0608434643222204
ST_5ugL_c	5	0,062656541214611
ST_10ugL_a	10	0,135093662791152
ST_10ugL_b	10	0,12843386788989
ST_10ugL_c	10	0,1247835103998

### Vyhodnocení

Vypočteny R	R k testování	Vypočteny QC	QC k testování	Max. hodnota pro úsek (absolutní)	Vypočtená hodnota úseku	Hypotéza
[1]	[1]	[%]	[%]	[1]	[1]	
0,9993	0,99	4,8081	5	20	-0,001	Přijata

## Graf



Závěr: Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního a QC koeficientu. Vypočtená hodnota úseku pro danou přímku vyhovuje kritériu přijatelnosti pro úsek. Rovnice přímky:  $y = -0,001 + 0,0132 \cdot x$ .

Podpůrná statistika: Úsek (odhad) = -0,001

Směrnice (odhad) = 0,013169

Směrodatná odchylka úseku (odhad) = 0,001026

Směrodatná odchylka směrnice (odhad) = 0,000115

Interval spolehlivosti pro úsek = (-0,003147) - (0,001146)

Interval spolehlivosti pro směrnici = (0,012929) - (0,01341)


Reziduální rozptyl (odhad) = 1,3E-05

Směrodatná odchylka reziduí (odhad) = 0,003542

Korelační koeficient = 0,999277

QC Koeficient = 4,808082 %

## 9.15 Příloha N

	<b>Linearita - Korelační a QC koeficient - Echinacea - Caffeic acid</b>	EffiChem s.r.o. Purkyňova 649/127 Brno
---	---	--

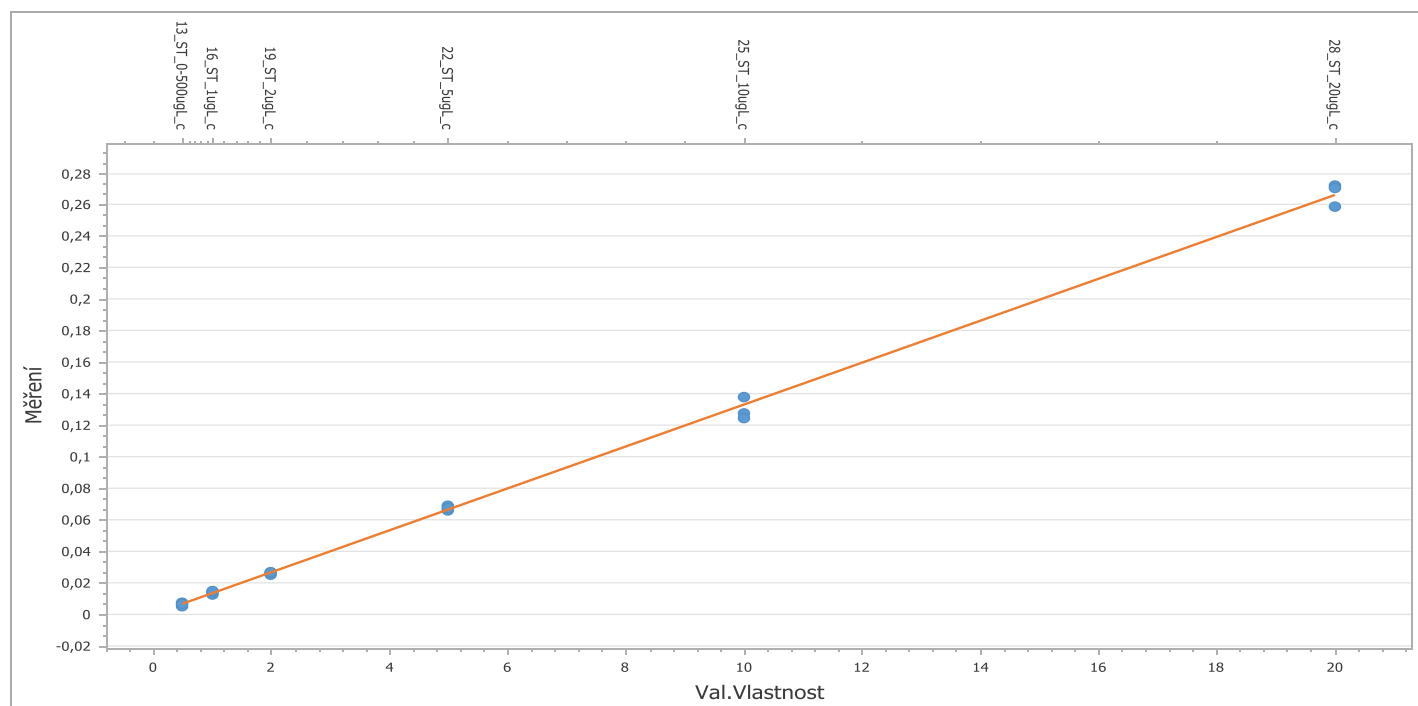
### Vstupní data

Popis	Val. vlastnost [µg/l]	Měření [1]
ST_0,500ugL_a	0,5	0,005215090823263
ST_0,500ugL_b	0,5	0,007415797850703
ST_0,500ugL_c	0,5	0,006968505387567
ST_1ugL_a	1	0,012295735348779
ST_1ugL_b	1	0,014249326646367
ST_1ugL_c	1	0,014558073039874
ST_2ugL_c	2	0,025608445641272
ST_2ugL_c	2	0,02649135986641
ST_2ugL_c	2	0,026751538766015
ST_5ugL_a	5	0,069350526900874
ST_5ugL_b	5	0,065969992855943
ST_5ugL_c	5	0,067762194174714
ST_10ugL_a	10	0,137702580449776
ST_10ugL_b	10	0,127311652066233
ST_10ugL_c	10	0,124604693271883
ST_20ugL_a	20	0,27221361511435
ST_20ugL_b	20	0,270579911859695
ST_20ugL_c	20	0,258825226397711

### Vyhodnocení

Vypočteny R	R k testování	Vypočteny QC	QC k testování	Max. hodnota pro úsek (absolutní)	Vypočtená hodnota úseku	Hypotéza
[1]	[1]	[%]	[%]	[1]	[1]	
0,9992	0,99	4,5258	5	20	-0,0002	Přijata

## Graf



Závěr: Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního a QC koeficientu. Vypočtená hodnota úseku pro danou přímku vyhovuje kritériu přijatelnosti pro úsek. Rovnice přímky:  $y = -0,0002 + 0,0133 \cdot x$ .

Podpůrná statistika: Úsek (odhad) = -0,000204

Směrnice (odhad) = 0,013312

Směrodatná odchylka úseku (odhad) = 0,001319

Směrodatná odchylka směrnice (odhad) = 0,000136

Interval spolehlivosti pro úsek = (-0,003) - (0,002593)

Interval spolehlivosti pro směrnici = (0,013023) - (0,013601)


Reziduální rozptyl (odhad) = 1,6E-05

Směrodatná odchylka reziduí (odhad) = 0,003975

Korelační koeficient = 0,999161

QC Koeficient = 4,525841 %

## 9.16 Příloha O

	<b>Linearita - Korelační a QC koeficient - Echinacea - Cynarin</b>	EffiChem s.r.o. Purkyňova 649/127 Brno
---	--	--

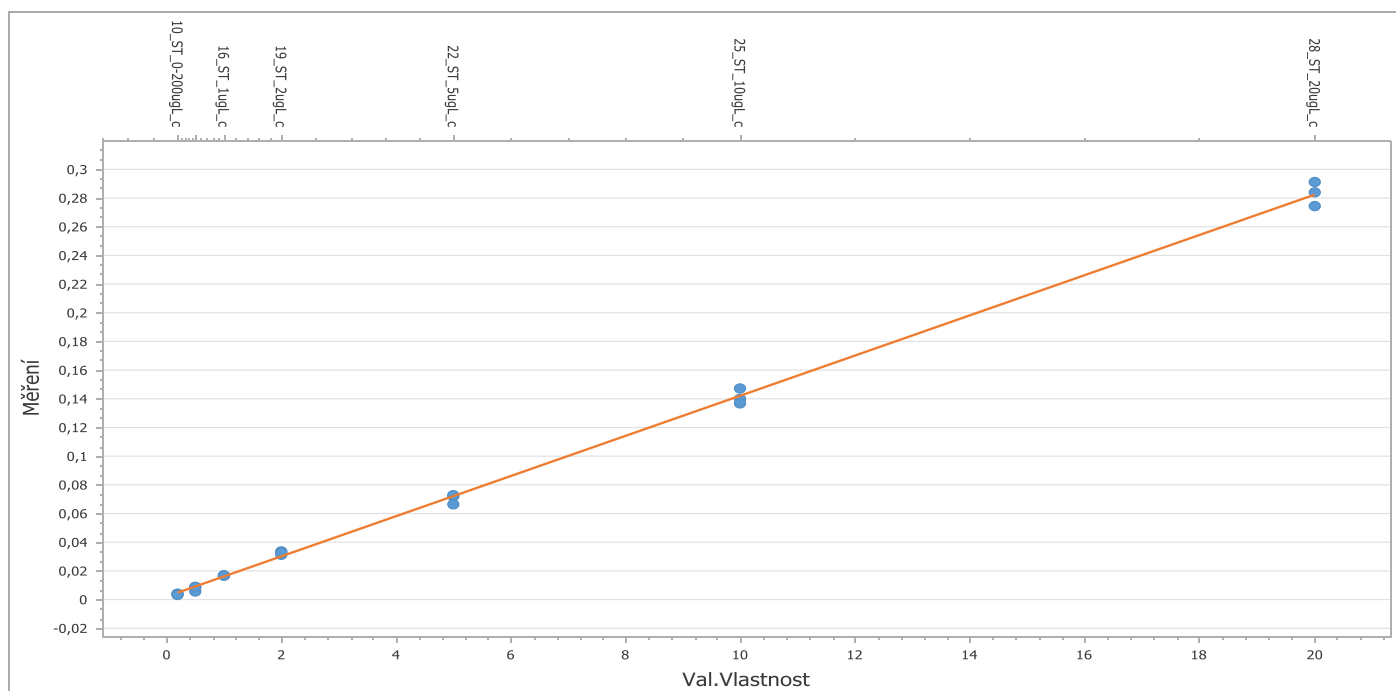
### Vstupní data

Popis	Val. vlastnost [µg/l]	Měření [1]
ST_0,200ugL_a	0,2	0,004189770793714
ST_0,200ugL_b	0,2	0,003825632177335
ST_0,200ugL_c	0,2	0,0031812126498
ST_0,500ugL_a	0,5	0,005788385124752
ST_0,500ugL_b	0,5	0,008843062576092
ST_0,500ugL_c	0,5	0,009131743524901
ST_1ugL_a	1	0,016640038288639
ST_1ugL_b	1	0,016947148776155
ST_1ugL_c	1	0,017139744067423
ST_2ugL_c	2	0,033496242947762
ST_2ugL_c	2	0,031216973126544
ST_2ugL_c	2	0,03257197976348
ST_5ugL_a	5	0,07175645979657
ST_5ugL_b	5	0,066594425829078
ST_5ugL_c	5	0,072322024446682
ST_10ugL_a	10	0,146665161057577
ST_10ugL_b	10	0,140129047732453
ST_10ugL_c	10	0,136800991705747

### Vyhodnocení

Vypočteny R	R k testování	Vypočteny QC	QC k testování	Max. hodnota pro úsek (absolutní)	Vypočtená hodnota úseku	Hypotéza
[1]	[1]	[%]	[%]	[1]	[1]	
0,9993	0,99	4,6015	5	20	0,0018	Přijata

## Graf



Závěr: Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního a QC koeficientu. Vypočtená hodnota úseku pro danou přímku vyhovuje kritériu přijatelnosti pro úsek. Rovnice přímky:  $y=0,0018+0,014*x$ .

Podpůrná statistika: Úsek (odhad)= 0,001794

Směrnice (odhad)= 0,01402

Směrodatná odchylka úseku (odhad)= 0,001084

Směrodatná odchylka směrnice (odhad)= 0,000122

Interval spolehlivosti pro úsek= (-0,000474) - (0,004063)

Interval spolehlivosti pro směrnici= (0,013766) - (0,014275)

Reziduální rozptyl (odhad)= 1,4E-05


Směrodatná odchylka reziduí (odhad)= 0,003744

Korelační koeficient= 0,999287

QC Koeficient= 4,601482 %



## 9.17 Příloha P

	<b>Linearita - Korelační a QC koeficient - Echinacea - Chicoric acid</b>	EffiChem s.r.o. Purkyňova 649/127 Brno
---	--	--

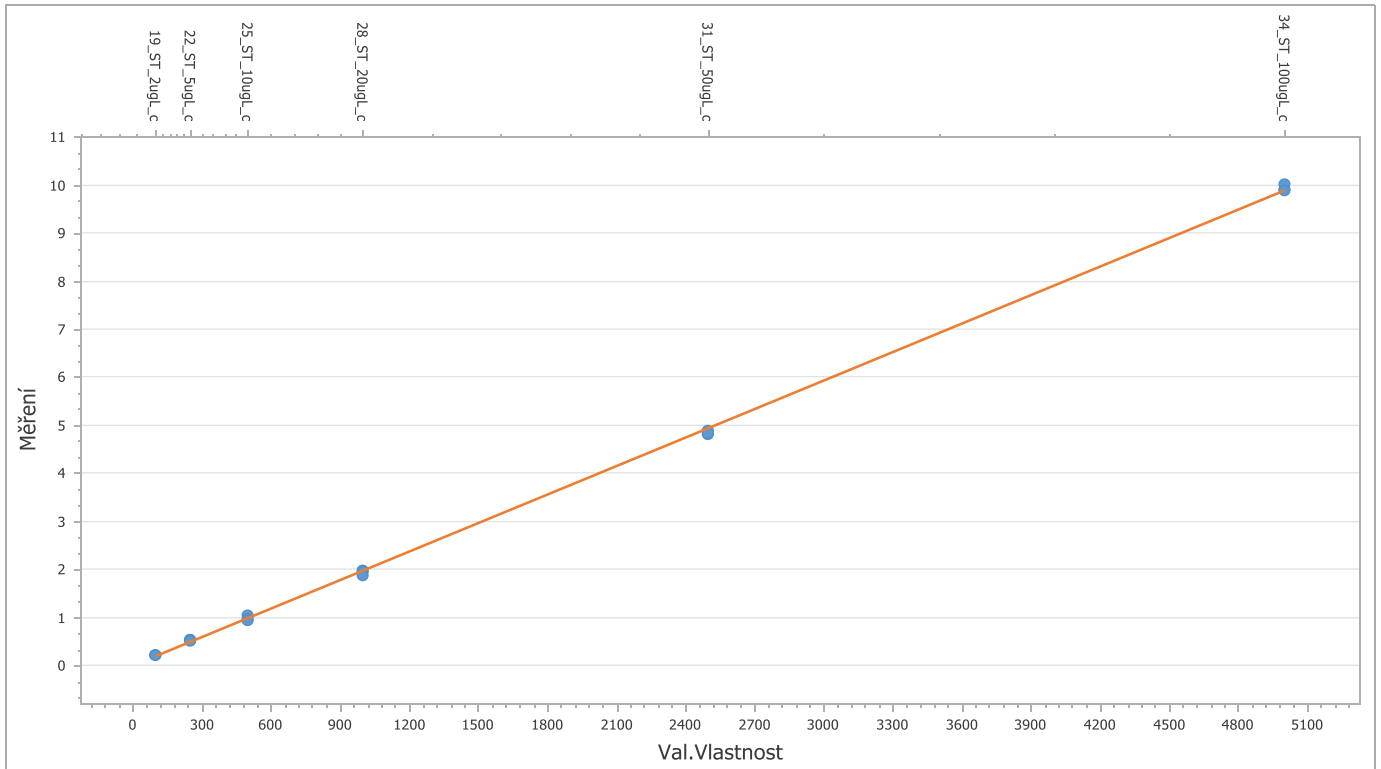
### Vstupní data

Popis	Val. Vlastnost [µg/l]	Měření [1]
ST_100ugL_c	100	0,208581840623511
ST_100ugL_c	100	0,20437537395859
ST_100ugL_c	100	0,204226184522972
ST_250ugL_a	250	0,546639132893527
ST_250ugL_b	250	0,537182104423427
ST_250ugL_c	250	0,513771469584638
ST_500ugL_a	500	1,04195863243105
ST_500ugL_b	500	0,973172408222464
ST_500ugL_c	500	0,941923621105458
ST_1000ugL_a	1000	1,97408355031179
ST_1000ugL_b	1000	1,95714413053784
ST_1000ugL_c	1000	1,86571491975118
ST_2500ugL_a	2500	4,79980131498647
ST_2500ugL_b	2500	4,90157643538865
ST_2500ugL_c	2500	4,84051577749288
ST_5000ugL_a	5000	9,9131710330347
ST_5000ugL_b	5000	10,0247172744445
ST_5000ugL_c	5000	9,89141077495525

### Vyhodnocení

Vypočteny R	R k testování	Vypočteny QC	QC k testování	Max. hodnota pro úsek (absolutní)	Vypočtená hodnota úseku	Hypotéza
[1]	[1]	[%]	[%]	[1]	[1]	
0,9998	0,99	2,1505	5	20	-0,0013	Přijata

## Graf



Závěr: Linearita byla prokázána na základě hodnot korelačního a QC koeficientu. Vypočtená hodnota úseku pro danou přímku vyhovuje kritériu přijatelnosti pro úsek. Rovnice přímky:  $y = -0,013 + 0,002 * x$ .

Podpůrná statistika: Úsek (odhad) = -0,013

Směrnice (odhad) = 0,001981

Směrodatná odchylka úseku (odhad) = 0,022233

Směrodatná odchylka směrnice (odhad) = 9E-06

Interval spolehlivosti pro úsek = (-0,060135) - (0,034135)

Interval spolehlivosti pro směrnici = (0,001962) - (0,002001)

Reziduální rozptyl (odhad) = 0,004644

Směrodatná odchylka reziduí (odhad) = 0,06815

Korelační koeficient = 0,999825

QC Koeficient = 2,150475 %