

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Fakulta přírodovědecká**

**Katedra fyzikální chemie**

**ANALÝZA DERIVÁTŮ KYSELINY KÁVOVÉ  
V ROSTLINNÉM MATERIÁLU PLYNOVOU  
CHROMATOGRafiÍ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor práce:

Studijní program:

Studijní obor:

Forma studia:

Vedoucí bakalářské práce:

Jana Nádvorníková

Chemie

Aplikovaná chemie

Prezenční

doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

**Olomouc 2017**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci použila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

V Olomouci dne .....

.....

Podpis

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce, panu doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky, čas a ochotu, kterou mi během mé práce věnoval.

Poděkovat bych chtěla rovněž své rodině za pochopení a podporu během celé doby mého studia.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Jana Nádvorníková
Název práce:	Analýza derivátů kyseliny kávové v rostlinném materiálu plynovou chromatografií
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2017
Abstrakt:	<p>Teoretická část bakalářské práce se zabývá popisem dvou rostlin a to Třapatky nachové a Čekanky obecné. Dále jsou popsány chemicky aktivní látky rostlin. Teoretická část je rovněž věnována extrakčním technikám, prováděným za vysokých teplot a tlaků a také metodám úpravy vzorků před analýzou na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí. Experimentální část je zaměřena na popis přípravy extraktů třemi různými technikami, kterými jsou macerace, akcelerovaná extrakce a extrakce subkritickou vodou. U všech těchto technik byly vzorky před analýzou na plynovém chromatografu derivatizovány silylačním činidlem. Na základě dosažených výsledků pak byla pro reálné vzorky rostlin použita akcelerovaná extrakce. Ke kvantitativnímu stanovení derivátů kyseliny kávové v jednotlivých částech rostlin byla použita metoda vnitřního standardu.</p>
Klíčová slova:	třapatka, čekanka, kyselina kávová, extrakce, plynová chromatografie
Počet stran:	38
Jazyk:	Český

**Bibliographic identification:**

Author's first name and surname: Jana Nádvorníková

Title: Analysis of caffeic acid derivatives in plant material by gas chromatography

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of physical chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.

The year of presentation: 2017

Abstract: Theoretical part of bachelor thesis deals with a description of two plants – Purple coneflower and Chicory. Further there is a description of the active compounds. Theoretical part is also dedicated to the extraction techniques carried out under high temperatures and pressures as well to methods of sample preparation before an analysis on a gas chromatograph with mass spectrometer. Experimental part is focused on the preparation of extracts by three different techniques which are maceration, accelerated solvent extraction and subcritical water extraction. All samples were derivatizationed with a silylating reagent before an analysis by gas chromatography. Based on gained results was chosen accelerated solvent extraction for real plant samples. To quantitative analysis was used internal standard method.

Keywords: coneflower, chicory, caffeic acid, extraction, gas chromatography

Number of pages: 38

Language: Czech

# OBSAH

1 Úvod .....	1
2 Teoretická část .....	2
2.1 Charakteristika rostlin .....	2
2.1.1 Třapatka nachová.....	2
2.1.2 Čekanka obecná.....	2
2.2 Chemicky aktivní látky.....	3
2.3 Fenyylpropanoidy .....	3
2.3.1 Deriváty kyseliny kávové .....	4
2.4 Alkylamidy .....	7
2.5 Polysacharidy .....	8
2.6 Metody extrakce účinných látek.....	8
2.6.1 Vysokotlaká extrakce .....	9
2.6.2 Extrakce subkritickou vodou .....	10
2.7 Derivatizace .....	12
2.7.1 Alkylace.....	12
2.7.2 Acylace .....	13
2.7.3 Silylace .....	13
2.8 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí.....	14
3 Experimentální část .....	17
3.1 Použité chemikálie.....	17
3.2 Přístrojové vybavení .....	17
3.3 Vzorky rostlinného materiálu .....	18
3.4 Příprava extraktů.....	18
3.4.1 Macerace.....	18
3.4.2 Vysokotlaká extrakce .....	18
3.4.3 Extrakce subkritickou vodou .....	19
3.5 Příprava roztoků standardů .....	19
3.6 Příprava extraktů reálných vzorků.....	19
3.7 Úprava vzorků – derivatizace .....	20

4	Výsledky a diskuze.....	21
4.1	Macerace.....	21
4.2	Vysokotlaká extrakce .....	23
4.3	Extrakce subkritickou vodou .....	25
4.4	Extrakce reálných vzorků .....	28
4.5	Standardy kyselin .....	31
5	Závěr.....	33
6	Summary.....	34
7	Seznam použité literatury .....	35

# 1 Úvod

Třapatka nachová je velice známou rostlinou pocházející ze Severní Ameriky. Její léčivé účinky byly objeveny již Indiány, nicméně v té době byla tato bylina užívána spíše k bolestem zubů, hlavy nebo při uštknutí hadem. Dnes je třapatka používána zejména k léčbě nachlazení a infekčních onemocnění horních a dolních cest dýchacích. Pro výrobu léčivých přípravků, jakými jsou nejčastěji sirupy, tinktury a čaje, je využíván více kořen rostliny než její nadzemní části. Důvodem je vyšší obsah aktivních látek vyskytujících se právě v kořeni. Toto tvrzení však některé vědecké publikace zpochybňují a věnují se zjišťování aktivních látek v jednotlivých částech rostliny. Do stejné čeledi rostlin jako třapatka patří i čekanka obecná. Známa je hlavně díky svému kořeni, ze kterého se vyrábí náhražky kávy nebo sladidlo určené převážně pro diabetiky.

Na léčivém účinku rostlin se podílí několik skupin látek. Řadíme mezi ně alkylamidy, deriváty kyseliny kávové a polysacharidy. Nejvíce bioaktivních funkcí vykazují deriváty kyseliny kávové. Těmito funkcemi jsou například protivirové a protizánětlivé účinky, ochrana kolagenu před působením volných radikálů nebo inhibice viru HIV-1. Vzhledem k těmto vlastnostem jsou deriváty kyseliny kávové označovány jako ukazatele kvality léčivých přípravků. Každý druh třapatky obsahuje jiné deriváty kyseliny kávové i jiné množství těchto derivátů – v třapatce nachové je například zastoupena nejvíce kyselina čekanková. Díky tomu mohou být deriváty použity pro ověření autentičnosti a kvality extraktů z rostlinných vzorků.

Izolace derivátů kyseliny kávové bývá prováděna extrakčními technikami, ať už klasickými, nebo za zvýšených teplot a tlaků. Jako rozpouštědlo je volen ethanol, methanol, nebo destilovaná voda. Analytickou koncovkou bývá nejčastěji kapalinová chromatografie. Z tohoto důvodu je v práci použita plynová chromatografie, která tak může sloužit jako srovnávací metoda k chromatografii kapalinové.



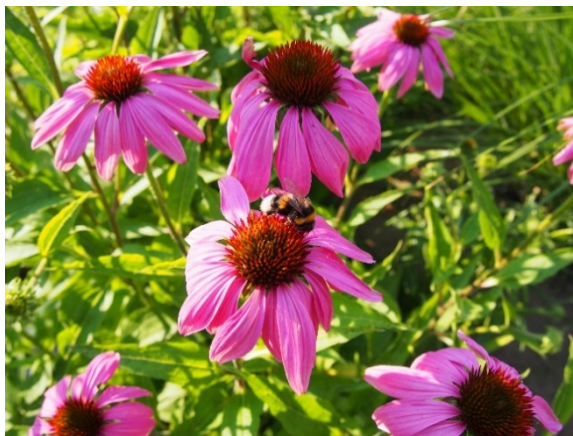
## 2 Teoretická část

### 2.1 Charakteristika rostlin

#### 2.1.1 Třapatka nachová

Třapatka nachová, latinsky *Echinacea purpurea* je z botanického hlediska vytrvalá bylina, spadající do čeledi s názvem *Compositae*, neboli hvězdnicovité. Do této čeledi patří i další rostliny, jakými jsou např. arnika, heřmánek, čekanka, měsíček nebo pampeliška. Společným znakem rostlin, které jsou zařazeny do této čeledi, je květ, jenž připomíná hvězdu a také léčivé vlastnosti mnohých z nich.<sup>1</sup>

Původem je třapatka ze Severní Ameriky, kde byly její léčivé účinky objeveny již původními obyvateli – Indiány, kteří užívali rostlinu např. při uštknutí hadem, bodnutí žihadlem, na bolesti hlavy, zubů, žaludku či na léčbu infekčních onemocnění. Existuje přibližně devět druhů rodu třapatky, např. třapatka úzkolistá, třapatka zvláštní, třapatka bledá, třapatka nachová aj. Všechny druhy mají podobné účinky, liší se však složením účinných látek, a proto jsou k lékařským účelům využívány zejména tyto tři druhy – třapatka úzkolistá (*Echinacea angustifolia*), třapatka bledá (*Echinacea pallida*) a třapatka nachová.<sup>1</sup>



*Obr. 1 Třapatka nachová (foto autorka)*

#### 2.1.2 Čekanka obecná

*Cichorium intybus*, česky též čekanka obecná je obdobně jako třapatka vytrvalá bylina s mnohými léčivými vlastnostmi a rovněž spadá do čeledi hvězdnicovitých. Nalézt ji můžeme téměř po celém světě, samozřejmě s výjimkou míst, kde je obecně málo vegetace kvůli nepříznivým podmínkám pro její růst – např. Grónsko či Antarktida. Listy rostliny jsou hojně využívány pro přípravu pokrmů, zejména salátů. Kořen rostliny se po upražení používá

k výrobě náhražek kávy, nejznámější z nich je cikorka.<sup>2</sup> Použit může být ovšem i jako sladilo, neboť většina rostlin pocházejících z rodu *Asteraceae* obsahuje namísto škrobu, jakožto zásobní látky, polysacharid inulin. Jeho sladivost je v porovnání se sacharosou asi desetkrát menší a potraviny obsahující tento polysacharid mají nízkou energetickou hodnotu. Toho je využíváno především u osob s diabetem, pro které nejsou vhodné potraviny obsahující jednoduché cukry.<sup>3</sup> Z chemického pohledu obsahuje čekanka nejrůznější látky jakými jsou fenolické kyseliny, flavonoidy, alkaloidy, vitamíny, taniny a saponiny, jež jsou odpovědné za léčivé vlastnosti rostliny. Těmi jsou na mysli antimikrobiální, protizánětlivé nebo antihyperglykemické účinky. Silná antioxidační aktivita je dána díky výskytu flavonoidů – quercetinu, kaempferolu a kyseliny kávové a jejích derivátů.<sup>4</sup>



*Obr. 2 Čekanka obecná<sup>5</sup>*

## **2.2 Chemicky aktivní látky**

Třapatka nachová obsahuje mnoho nejrůznějších chemických látek. Jedná se o flavonoidy, deriváty kyseliny kávové, polysacharidy, glykoproteiny, polyacetyleny, alkylamidy a éterické oleje neboli silice. Na léčivém účinku rostliny se nepodílí jediná látka, ale celý komplex látek. V případě třapatky se jedná o deriváty kyseliny kávové, alkylamidy a polysacharidy, jejichž vlastnosti budou popsány dále.<sup>6</sup>

## **2.3 Fenylpropanoidy**

Fenolické látky, obsažené v rostlinách, jsou charakterizovány jako aromatické sekundární metabolity, v jejichž struktuře je na fenylovou část molekuly navázán jeden či více hydroxylů, které mají charakteristické kyselé vlastnosti.<sup>7</sup> Rozdělit fenolické látky lze na základě počtu uhlíků. Sloučeniny s nejmenším počtem uhlíků – 6 jsou jednoduché fenoly a

benzochinony, dále jsou to fenolické kyseliny se 7 uhlíky a značením C<sub>6</sub>–C<sub>1</sub>. Fenylypropanoidy spolu s benzopyrany jsou tvořeny z 9 uhlíků a hlavní řetězec bývá označován C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub>. Takovýmto způsobem jsou fenolické látky rozděleny až po sloučeniny s nedefinovaným počtem uhlíků, neboli n počtem uhlíků, což jsou kondenzované taniny, ligniny a katecholmelaniny.<sup>7</sup>

Fenylypropanoidy jsou přírodní látky organického původu, které vznikají z aminokyseliny fenylyalaninu přes šikimátovou dráhu. Působením enzymu fenylyalanin amoniak lyasy vzniká deaminací fenylyalaninu první meziproduct biosyntézy - kyselina skořicová. Z té pak může vznikat kyselina benzoová, která je prekurzorem syntézy kyseliny salicylové, nebo kyselina hydroxyskořicová. Deriváty kyseliny hydroxyskořicové slouží k syntéze mnoha dalších látek, jakými mohou být např. ligniny, stilbeny, flavony a flavonoly. Významným derivátem kyseliny hydroxyskořicové je kyselina kávová a od ní odvozené deriváty, které budou v této práci dále podrobněji popsány.<sup>8</sup>

### 2.3.1 Deriváty kyseliny kávové

Mezi deriváty kyseliny kávové řadíme tyto sloučeniny:

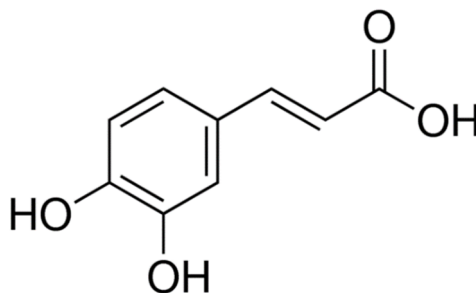
- kyselina kávová
- kyselina chlorogenová
- kyselina rozmarýnová
- kyselina kaftarová
- kyselina čekanková

Jak již bylo zmíněno výše, léčivý účinek třapatky je přisuzován třem skupinám látek, ovšem deriváty kyseliny kávové jsou považovány za nejvíce biologicky aktivní a plní řadu funkcí. Chrání například kolagen před degradací volnými radikály, mají protivirový a protinádorový účinek a rovněž stimulují fagocytózu. Díky těmto vlastnostem a různému zastoupení v jednotlivých druzích třapatky mohou sloužit deriváty kyseliny kávové jako ukazatele kvality léčivých přípravků vyrobených z třapatky.<sup>9</sup>

#### *Kyselina kávová*

Kyselina kávová (Obr. 3) je fenolická kyselina s katecholovým uspořádáním hydroxy skupin na aromatickém jádře.<sup>10</sup> Spolu s kyselinami hydroxybenzoovými, hydroxyskořicovými a stilbeny ji rovněž řadíme mezi nonflavonoidy.<sup>11</sup> Běžně se vyskytuje v bylinách, koření (např.

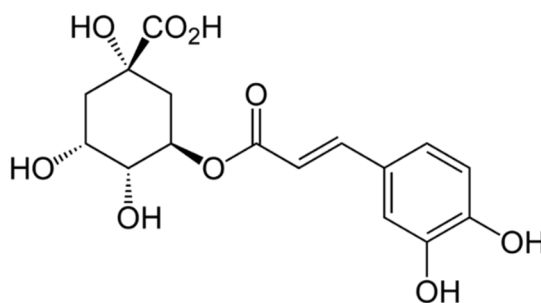
skořice), ovoci. Nalézt ji můžeme také v čaji a kávě. Má vysokou antioxidační kapacitu a je schopna vychytávat volné radikály a chelatovat některé ionty kovů. Tyto vlastnosti mohou být způsobeny již zmiňovaným katecholovým uspořádáním na aromatickém jádře a dvojnou vazbou, vyskytující se v postranním řetězci. Kromě toho vykazuje řadu farmakologických aktivit, jako jsou protinádorové a protizánětlivé účinky, či inhibice enzymové aktivity a replikace viru HIV.<sup>10</sup>



*Obr. 3 Kyselina kávová<sup>12</sup>*

### ***Kyselina chlorogenová***

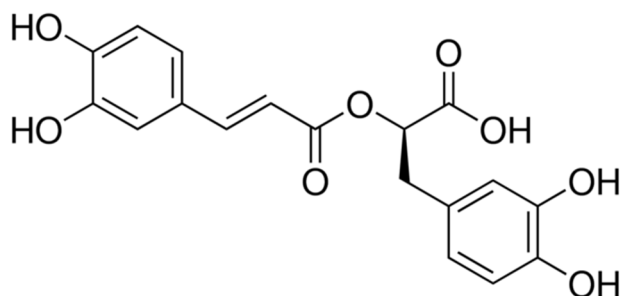
Kyselina chlorogenová (Obr. 4) je ester kyseliny kávové a chinové. Jde rovněž o fenolickou kyselinu hojně se vyskytující v kávě, ovoci a zelenině. Velkým zdrojem kyseliny chlorogenové jsou také extrakty připravené z rostlin - zimolez japonský a gumojilm jilmový.<sup>13</sup> Podobně jako kyselina kávová vykazuje vysokou antioxidační kapacitu, má také protizánětlivé, protibakteriální a protinádorové účinky. Mimoto bylo prokázáno, že kyselina chlorogenová účinně chrání před nemocemi jater.<sup>14</sup> Vzhledem k četným léčivým účinkům může být používána v mnohých odvětvích, ať už jako přísada do nejrůznějších nápojů, jídel, kosmetiky, či do léčivých přípravků.<sup>13</sup>



*Obr. 4 Kyselina chlorogenová<sup>15</sup>*

### ***Kyselina rozmarýnová***

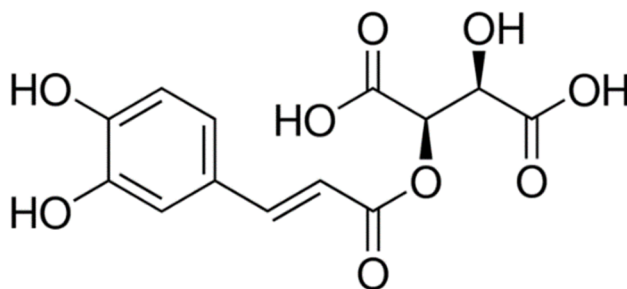
Dimer kyseliny kávové, strukturně ester kyseliny kávové a kyseliny 3-(3,4-dihydroxyfenyl) mléčné se nazývá kyselina rozmarýnová (Obr. 5).<sup>16</sup> Nachází se zejména v rostlinách čeledi hluchavkovitých, jakými jsou rozmarýn, bazalka, meduňka, šalvěj aj., které jsou vysoce aromatické a hojně používané jako koření do pokrmů.<sup>17</sup> Jako většina fenolických sloučenin má i kyselina rozmarýnová antioxidační účinky. Dále pak účinky protizánětlivé, antimutagenní, cytotoxické, antimikrobiální a neuroprotektivní, kterých je využíváno především ve farmaceutickém průmyslu pro výrobu léčivých produktů.<sup>18</sup>



***Obr. 5 Kyselina rozmarýnová***<sup>19</sup>

### ***Kyselina kaftarová***

Mezi deriváty kyseliny kávové spadá i kyselina kaftarová (Obr. 6). Strukturně se jedná o ester kyseliny kávové a vinné. Jedná se o nejvíce rozšířenou nonflavonoidní fenolickou sloučeninu v hroznech a víně. Trans isomer této kyseliny je hlavní fenolickou sloučeninu v listech čekanky obecné a také jedna z bioaktivních sloučenin třapatky nachové.<sup>20</sup>

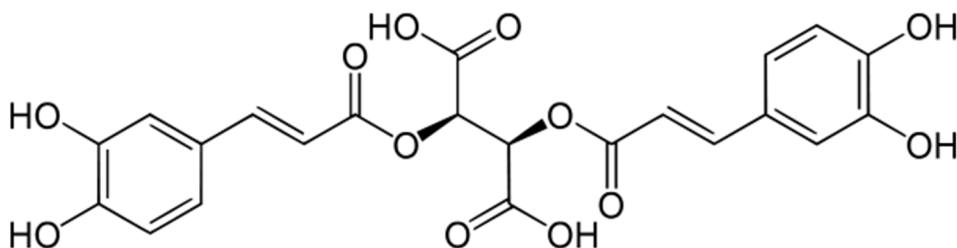


***Obr. 6 Kyselina kaftarová***<sup>21</sup>

## Kyselina čekanková

Kyselina čekanková (Obr. 7) je velice důležitá fenolická sloučenina, která byla v roce 1958 poprvé objevena a následně izolována z listů čekanky obecné. Nevyskytuje se pouze v čekance, ale i v dalších rostlinách, kterými jsou pampeliška, bazalka, třapatka nebo vodní rostliny. Z chemického pohledu se jedná o diester kyseliny kávové a vinné.<sup>22</sup>

Jak již bylo uvedeno, na léčivém účinku produktů, vyráběných z třapatky nachové, se podílí řada chemických sloučenin, nejvíce však kyselina čekanková, která plní řadu bioaktivních funkcí. Mezi tyto funkce lze zahrnout především účinky posilující imunitní systém, ochranu kolagenu před volnými radikály, protivirovou a protizánětlivou aktivitu. Dále pak působení proti enzymu hyaluronidáze, jenž rozkládá kyselinu hyaluronovou a obrana před lidským virem HIV-1.<sup>23</sup> Na rozdíl od kyseliny kávové je mnohem silnějším antioxidantem, důvodem je přítomnost druhé fenolické skupiny. Obecně jsou polyfenoly lepšími antioxidanty než sloučeniny s jednou fenolickou skupinou.<sup>24</sup> Všechny tyto vlastnosti pak dovolují označovat kyselinu čekankovou jako ukazatele kvality léčivých přípravků vyrobených z třapatky.



Obr. 7 Kyselina čekanková<sup>25</sup>

## 2.4 Alkylamidy

Alkylamidy jsou skupinou látek, které se v rostlinné říši vyskytují pouze u tří čeledí a to *Piperaceae*, *Rutaceae* a *Asteraceae*.<sup>24</sup> Z kořenů třapatky nachové a úzkolisté bylo izolováno a identifikováno přes 20 alkylamidů. Jedná se převážně o N-isobutylamidy kyselin s počtem uhlíků větším než 10. Např. N-isobutylamid kyseliny 2-cis-4-trans-dodekadien-8,10-diynové.<sup>26</sup> Bylo prokázáno, že pozitivně působí na endokanabinoidní systém a omezují aktivitu enzymu cyklooxygenázy typu 2 (COX-2).<sup>26</sup> Vzhledem ke struktuře alkylamidů nelze očekávat antioxidantní účinky, neboť neobsahují ani fenolickou skupinu, ani aromatické jádro. Samotné alkylamidy tedy antioxidanty nejsou, ale v lipidové emulzi za přítomnosti kyseliny čekankové dokáží zvýšit její antioxidantní schopnost.<sup>24</sup>

## 2.5 Polysacharidy

Poslední skupinou látek, která se podílí na léčivém účinku třapatky, jsou polysacharidy. Látky jsou to velice významné, zejména pro své imunostimulační účinky. Z nadzemních částí rostliny bylo izolováno několik polysacharidových frakcí. Nejdůležitější jsou z terapeutického hlediska dvě, známé pod zkratkami PS I a PS II. V případě PS I se jedná o polysacharid 4-O-methyl-glukurono-arabinoxylan s molekulovou hmotností 35 kDa. Polysacharid PS II, s molekulovou hmotností okolo 50 kDa je arabino-rhamno-galaktan.<sup>27</sup>

Gelovou filtrací pak byly získány další frakce, v rozpětí molekulových hmotností od 1 do 750 kDa. I tyto frakce, stejně jako dvě předchozí, mají imunostimulační efekt. Aktivizují neutrofile a makrofágy. Takto aktivované makrofágy vlivem polysacharidů získávají významnou extracelulární toxicitu proti nádorovým buňkám.<sup>6</sup>

## 2.6 Metody extrakce účinných látek

Extrakce je separační metoda sloužící k převedení látky z tuhé, či kapalně fáze do fáze kapalně. Principy obou těchto metod jsou popsány v mnoha publikacích (např. Štulík a kol., 2004 nebo Pawliszyn a L. Lord, 2010), a proto bude pouze stručně uvedena extrakce z pevné látky do kapaliny.

Existuje několik typů extrakcí, kterými může být látka z tuhé fáze do kapaliny převedena. První z nich je macerace, při které dochází k louhování do jedné dávky kapaliny při normální teplotě. Při louhování za zvýšené teploty hovoříme o digesci. Dalším typem je perkolace, kdy je prováděno louhování za normální teploty, ale do protékající kapaliny. V průmyslovém provedení pak perkolaci nazýváme kontinuální extrakcí.<sup>6</sup>

Pro extrakci fenolických látek je používán suchý rozemletý materiál a nejčastěji bývá extrakce prováděna methanolem v Soxhletově přístroji.<sup>28</sup> Výhoda této metody spočívá v jednoduchosti instrumentace, neboť Soxhletův extraktor je složen pouze z destilační baňky, extrakčního nástavce a chladiče. Mezi nevýhody patří dlouhá doba extrakce (kolem 24 hodin) a velká spotřeba organických rozpouštědel. Nevýhoda této metody není tedy pouze z finančního hlediska, ale zejména z hlediska ekologického. Proto jsou v dnešní době klasické extrakční techniky, jakou je Soxhletova extrakce, či destilace vodní parou, nahrazovány technikami prováděnými za zvýšených teplot a tlaků. Těmito technikami lze dosáhnout urychlení extrakce a menší spotřeby rozpouštědel.<sup>29</sup>

### 2.6.1 Vysokotlaká extrakce

Mezi extrakční techniky prováděné za zvýšených tlaků řadíme superkritickou fluidní extrakci, extrakci kapalnými organickými rozpouštědly za zvýšeného tlaku nebo tlakovou extrakci horkou vodou. Blíže se seznámíme s posledními dvěma zmiňovanými technikami.

Extrakce stlačenými kapalnými organickými rozpouštědly za teplot nad normálním bodem varu rozpouštědla bývá často pojmenována různými názvy. Lze se setkat s pojmenováními jako fluidní extrakce podporována tlakem (PFE), kapalinová extrakce podporovaná tlakem (PLE), zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE) či zrychlená extrakce podporována tlakem (PSE).<sup>30</sup>

Zrychlená extrakce podporována tlakem je technikou, která byla po roce 1990 vynalezena jako alternativa stávajících extrakčních technik (Soxhletova extrakce, macerace, perkolace aj.). Používána jsou běžná rozpouštědla, která jsou vlivem zvýšeného tlaku udržována v kapalném stavu. Navíc vysoký tlak umožňuje zatlačit rozpouštědlo do pórů matrice, čímž dochází k usnadnění extrakce analytů.<sup>31</sup> Účinnost extrakce rovněž ovlivňuje teplota. Vyšší teplota usnadňuje uvolnění analyzovaných látek z matrice vzorku díky zeslabení interakcí těchto látek s matricí. Všechny tyto efekty tak vedou ke značnému zrychlení extrakce.<sup>30</sup> Při této metodě je extrakční patrona naplněna vzorkem a umístěna do termostatu. Patrona je následně plněna rozpouštědlem a zahřívána. Používány jsou teploty od 50 do 200 °C a tlaky od 5 do 20 MPa. Z tohoto důvodu musí být patrony vyráběny z odolných materiálů, nejčastěji z nerezové oceli. Objem patrony může být v rozmezí od 1 do 100 ml. Na spodní část bývá umístěna fritta s takovou velikostí pórů, při kterých nebude docházet k průchodu částic matrice, ale pouze k průchodu rozpouštědla. Případnému přetlaku v patroně je zabráněno za pomoci statických ventilů, které se automaticky zavírají a otevírají po překročení nastavené hodnoty. Rozpouštědlo, které přitom uniká, je jímáno do sběrné nádoby.<sup>32</sup> Přístrojem pro vysokotlakou extrakci bývá nejčastěji *one* PSE výrobce Applied Separations, který je na obrázku 8.





*Obr. 8 Přístroj one PSE pro vysokotlakou extrakci (foto autorka)*

Extrakce může probíhat ve dvou režimech a to statickém a dynamickém. Většina aplikací využívá statického režimu, při kterém je zvoleným rozpouštědlem naplněna patrona se vzorkem a následně dochází k zahřátí a natlakování patrony na předem nastavené hodnoty. Tyto hodnoty jsou po zvolenou dobu udržovány a probíhá extrakce. Poté dochází k vypuštění extrakčního rozpouštědla do sběrné nádoby, následované proplachem systému malým množstvím rozpouštědla a pročištění dusíkem (1 – 2 min). Tento cyklus nejčastěji trvá 5 – 10 minut a může být pro zvýšení účinnosti extrakce i několikrát opakován. Celková doba extrakce tak závisí na počtu těchto cyklů a na nastavených hodnotách teplot a tlaků. V méně používaném dynamickém režimu protéká rozpouštědlo kontinuálně po určitou dobu přes vzorek.<sup>33</sup>

### **2.6.2 Extrakce subkritickou vodou**

Pro extrakci subkritickou vodou lze v literatuře nalézt mnoho jiných názvů jako extrakce horkou vodou (HWE), tlaková extrakce horkou vodou (PHWE) či vysokoteplotní extrakce vodou (HTWE). Z věcného hlediska se jedná o totéž, tedy o extrakci stlačenou vodou mezi normálním bodem varu (100 °C) a kritickou teplotou (374 °C) pro vodu. Podmínkou pro kapalný stav stlačené vody je tlak vyšší než tlak nasycených par vody za příslušné teploty. Této podmínce vyhovují tlaky v rozmezí zhruba od 1 do 22 MPa.<sup>30</sup>

Vysoké teploty způsobují značné snížení dielektrické konstanty a polarizability vody. V důsledku toho se můžou ve vodě rozpouštět látky střední až nízké polarizability. Se zvyšující se teplotou dochází rovněž ke snížení povrchového napětí a viskozity vody, což má za následek zvýšenou rozpustnost analytů v takovém typu rozpouštědla.<sup>34</sup> Na účinnost extrakce má tedy vliv zejména teplota.

Extrakce je prováděna na zařízeních, která jsou běžně dostupná v laboratořích. Jedná se o přístroje pro superkritickou fluidní extrakci, či pro extrakci stlačenými organickými rozpouštědly, jenž bylo popsáno výše u vysokotlaké extrakce. Samozřejmě s tím rozdílem, kdy je namísto organických rozpouštědel použita destilovaná voda. Celková doba extrakce závisí převážně na teplotě, dále pak na povaze matrice a cílové sloučeniny.<sup>34</sup>

Na rozdíl od ostatních technik nabízí tato metoda řadu výhod – zlepšení kvality extraktů, urychlení extrakční doby nebo snížení množství použitého rozpouštědla, což je spjato s menšími náklady. Kromě toho, voda místo organického rozpouštědla je šetrnější k životnímu prostředí a mohou tak být extrahovány potraviny i farmaceutické přísady zdraví prospěšné.<sup>35</sup> Na počátku 21. století, kdy byla extrakce subkritickou vodou jako možnost přípravy vzorku uvedena, byla její oblast využití poněkud odlišná. Dřívější aplikace zahrnovaly extrakci organických polutantů (především polycyklických aromatických uhlovodíků, polychlorovaných bifenyly, fenolů, pesticidů a herbicidů) z pevných vzorků životního prostředí jako jsou půdy, sedimenty, tuhé aerosoly a jiné. Schopnost vody extrahovat tyto nepolární organické látky je spojena s dielektrickou konstantou vody, která může být značně snížena v důsledku zvýšené teploty. V dnešní době pak byly extrakce týkající se zejména životního prostředí rozšířeny o možnost extrahovat i některé bioaktivní látky a silice z rostlinných materiálů, převážně z léčivých rostlin. Pro ty nejvýznamnější z nich, jako je zázvor, čajovník, rozmarýn aj. lze v literatuře nalézt přesně popsané parametry pro tento způsob extrakce (např.<sup>35</sup>). U biologických materiálů nastává pro tento způsob extrakce jisté omezení a to jak z důvodu teplotní stability cílových látek, tak jejich odolnosti vůči hydrolýze během extrakce.<sup>36</sup>

## 2.7 Derivatizace

Derivatizace je chemický proces, při kterém dochází ke změně chemické struktury sloučeniny za účelem vytvoření nové sloučeniny s lepšími chromatografickými vlastnostmi. Zejména plynová chromatografie často vyžaduje úpravu vzorku před samotnou analýzou. Tato forma úpravy vzorku vede ke zlepšení termální stability některých sloučenin, především těch, které obsahují polární funkční skupiny (např. -COOH, -OH, -NH, -SH). Polární funkční skupiny jsou schopny tvořit vodíkové vazby mezi sloučeninami a to pak vede ke slabé těkavosti a nedostatečné termální stabilitě. Mohou také interagovat s pevnými sloučeninami, které tvoří stacionární fázi kolony. Všechny tyto faktory mají pak za následek nízkou detekovatelnost analyzovaných látek.<sup>37</sup>

Derivatizace je obvykle prováděna nahrazením aktivního vodíkového atomu jinými funkčními skupinami za pomoci derivatizačních činidel. Podle těchto činidel lze pak derivatizaci rozdělit na tři typy.

### 2.7.1 Alkylace

Prvním ze tří nejčastějších způsobů derivatizace je metoda nazývaná alkylace. U této metody je nahrazován aktivní vodíkový atom u vybraných sloučenin alkylovou, případně arylovou skupinou. Následující sloučeniny mohou podléhat alkylaci: karboxylové a sulfonové kyseliny, alkoholy, fenoly, thioly, primární a sekundární aminy, amidy, sulfonamidy a N – substituované amidy. V případě kyselin se reakce nazývá esterifikace. Většina alkylačních reakcí probíhá za přítomnosti katalyzátoru, jehož volba závisí na aktivitě nahrazovaného atomu vodíku. Například alkylace slabě kyselých skupin (hydroxylová skupina u alkoholů nebo thiolová skupina) vyžaduje kyselý katalyzátor, naopak u kyslejších hydroxylových skupin (fenoly a karboxylové kyseliny) probíhá alkylace často za přítomnosti bazického katalyzátoru. Navrženo bylo mnoho činidel pro přípravu alkylderivátů. Patří mezi ně alkylbromidy, případně alkyljodidy, benzylbromid a jeho substituované nebo fluorované analogy jako např. pentafluorobenzyl bromid. Při esterifikaci karboxylových kyselin je pak jako alkylační činidlo často používán diazomethan.<sup>38</sup>

Oblastí, ve kterých může být alkylace využita, je mnoho. Avšak nejčastěji se s ní lze setkat v klinických laboratořích při analýzách biologických vzorků. Jedná se o metodu použitelnou pro identifikaci, profilování a kvantifikaci různých organických kyselin (volné

mastné kyseliny, organické kyseliny obsažené v moči a krevní plazmě, nebo organické kyseliny obsahující další hydroxylové či amino skupiny) při analýze GC/MS.<sup>38</sup>

### 2.7.2 Acylace

Acylace probíhá u téměř všech sloučenin obsahujících hydroxylovou skupinu (primární, sekundární i terciární alkoholy, karbonylové sloučeniny schopné keto enol tautomerie, fenoly), nebo amino skupinu (primární a sekundární aminy), občas také u sloučenin obsahujících amidovou či thiolovou skupinu. Výsledkem je produkt, ve kterém je aktivní vodíkový atom nahrazen acylovou skupinou. Reakci nepodléhají kyseliny karboxylové, sulfonové, fosforečné a fosforité. Acylačními činidly jsou převážně deriváty karboxylových kyselin s nižším počtem uhlíků, neboť vyšší karboxylové kyseliny mají menší těkavost a hůře se tím pádem odpařují. Mezi běžně používaná činidla patří anhydridy karboxylových kyselin a acylhalogenidy. Reakce jsou prováděny v prostředí tetrahydrofuranu nebo chloroformu za přítomnosti bazických katalyzátorů, jako je pyridin, nižší terciární aminy, hydroxid sodný nebo octan sodný. Tyto látky jsou schopny zachytit halogenvodíkové nebo karboxylové kyseliny vznikající v průběhu acylace.<sup>39</sup>

Deriváty vzniklé acylací jsou úspěšně využívány pro identifikaci, určování struktury a kvantitativní stanovení různých cizorodých látek přítomných v biologickém materiálu (tekutiny, tkáně) či environmentálních matricích. Pro některé sloučeniny může být acylace upřednostňována před jinými derivatizačními metodami. Jednou takovou skupinou látek jsou například aminy, které acylací poskytují acylamidy, které jsou mnohem stabilnějšími sloučeninami než N-silyl deriváty, které vznikají jako produkty jiného způsobu derivatizace a to silylace (viz dále v textu). Další skupinou látek, která využívá derivatizace před analýzou GC/MS jsou sacharidy. Jednou z důležitých aplikací je profilování monomerů sacharidů v bakteriálních buněčných polysacharidech. Monomery jsou považovány za jakési chemické značky, které identifikují specifické druhy a umožňují detekci dané bakterie, nebo jejích složek v různých objektech.<sup>39</sup>

### 2.7.3 Silylace

Poslední ze třech hlavních možností derivatizace je metoda zvaná silylace. Náhrada aktivního vodíkového atomu za silylovou skupinu probíhá u sloučenin obsahujících skupinu OH (alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, oximy aj.), nebo NH skupinu (aminy, amidy, iminy), či skupinu SH (thioly, thiokarboxylové kyseliny). Jedná se o velice jednoduchou,

rychlou a univerzální metodu derivatizace, která je z výše uvedených nejvíce používána. Za velkou výhodu může být považován fakt, že silylace probíhá velmi dobře i u sloučenin obsahujících více funkčních skupin. U derivátů vzniklých silylací je značně snížena dipól – dipólová interakce, mají vyšší těkavost a výborné chromatografické vlastnosti, jakými jsou například symetrické a úzké píky. Rovněž pozitivně ovlivňují chování látky při MS experimentu. Silylová skupina může například podpořit fragmentovou cestu. Tím přispívá k určení celkové struktury látky a charakteristického iontu ve spektru.<sup>40</sup>

Činidla, kterých silylace využívá, obsahují nejčastěji trimethylsilylovou skupinu ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ). Dříve se k získání silylových derivátů užívala činidla jako hexamethyldisilazán (HMDS) nebo trimethylchlorsilan (TMCS). Postupem času byla objevena činidla nová, mnohem více reaktivní než ta předchozí. Mezi ty nejpoužívanější lze zařadit N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid se zkratkou BSTFA, dále N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) nebo trimethylsilylimidazol (TMSIM). Pro dobrý průběh reakce může být požadováno použití rozpouštědel, např. pyridin, acetonitril, dimethylforamid aj., tedy takových, která neobsahují skupinu s labilním vodíkovým atomem. Sloužit mohou přímo k rozpuštění vzorku, nebo jsou přidávána až do finální reakční směsi. Při použití silylačních činidel, která obsahují chlor, může být vyžadováno použití bazických, či kyselých katalyzátorů nebo zahřívání vzorku.<sup>40</sup>

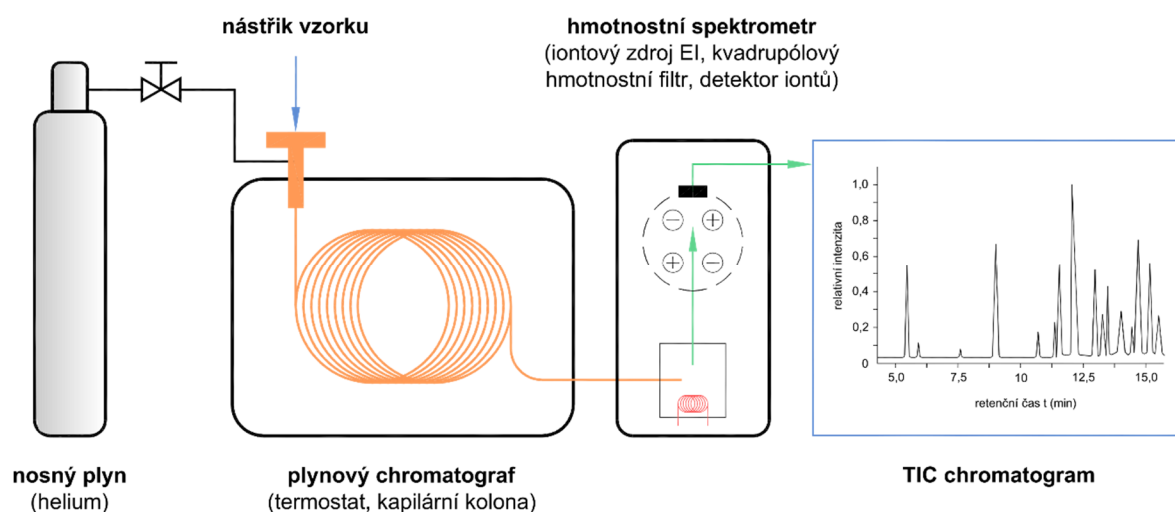
Nejpoužívanější a zároveň univerzální způsob derivatizace, taková je metoda silylace. Své uplatnění nachází v mnoha analytických aplikacích. Využívána bývá při analýzách syntetických směsí, získaných během organických syntéz. Rovněž může být použita při kvalitativní, nebo kvantitativní analýze bioorganických molekul, léčiv, jedů a metabolitů těchto látek. Sloužit může také při dopingových kontrolách, kde jsou analyty přítomny ve velmi malém množství v biologickém materiálu.<sup>40</sup>

## 2.8 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je velice účinnou technikou sloužící k identifikaci mnoha látek. První zmínky o tomto spojení spadají do padesátých let minulého století. Netrvalo mnoho let a v roce 1968 byl vyroben první, komerčně dostupný GC/MS systém.<sup>41</sup>

Instrumentace této techniky se, jak již název napovídá, skládá ze dvou částí a to z plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru – schéma na obrázku 9. První částí je

plynový chromatograf, ve kterém jsou různé složky ve vzorku rozdělovány mezi dvě fáze a to pohyblivou – mobilní a nepohyblivou – stacionární. Mobilní fází je plyn, převážně inertní, kterým bývá nejčastěji helium. Druhá fáze – stacionární bývá umístěna v koloně, která je v případě této metody kapilární. U kapilárních kolon bývá stacionární fáze ve formě tenkého filmu naneseného přímo na vnitřní stranu kolony. Po nástřiku je vzorek unášen do kolony proudem helia a dochází k postupnému oddělování složek ze vzorku. Zde přichází na řadu druhá část – hmotnostní spektrometr, jenž slouží jako detektor plynového chromatografu. Složky vychází z kolony v různých časech tzv. retenčních časech a vstupují do hmotnostního spektrometru, kde dochází k jejich ionizaci a následnému rozštěpení na fragmenty. Poté jsou jednotlivé fragmenty detekovány na základě jejich poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ).<sup>42</sup>



**Obr. 9** Schéma plynového chromatografu s hmotnostní detekcí

Třebaže se spojení obou těchto zařízení může jevit jako jednoduché a snadno proveditelné, nastává zde problém z pohledu tlakové nekompatibility. Výstup plynu z plynového chromatografu probíhá při atmosferickém tlaku, na druhé straně iontové zdroje u hmotnostního spektrometru vyžadují velmi silné vakuum. Nejčastějšími iontovými zdroji v případě GC/MS bývají elektronová, nebo chemická ionizace. Zkoušeno bylo mnoho způsobů, jak zavést vzorky z chromatografu do spektrometru, které užívaly buď separaci vzorků a nosného plynu, nebo byla směs zaváděna do spektrometru bez separace. Za tímto účelem byla zkonstruována zařízení tzv. separátory, která oddělovala měřený vzorek od nosného plynu. S příchodem křemenných kapilárních kolon s vázanou fází a výkonným čerpacím systémem spektrometrů se situace zcela změnila a došlo k velkému zjednodušení. Použití tohoto typu kolon totiž umožňuje přímé spojení kolony s iontovým zdrojem.<sup>43</sup>

Výstup u GC/MS je stejně jako u plynového chromatografu ve formě chromatogramu, jenž podává informace o výsledné separaci daných složek ze vzorku. Jedná se o nespojitý záznam plný bodů, jejichž hustota je dána rychlostí skenování hmotnostního analyzátoru. Rychlost skenování by měla být vhodně volena, a to tak, aby dokázala poskytnout několik spekter během eluce zóny. Této podmínce vyhovují hmotnostní analyzátoři jako průletový analyzátor či magnetický sektorový analyzátor. Na rozdíl od plynové chromatografie existují u GC/MS dva typy chromatogramů. Tím asi nejjednodušším je celkový iontový proud (TIC), definovaný jako závislost sumy iontových proudů všech  $m/z$  ve spektru na čase. Z TIC lze získat záznam určitých iontů, které nás zajímají a takový záznam se poté nazývá rekonstruovaný iontový proud (RIC). Druhým typem záznamu je selektivní monitorování iontů (SIM), při kterém je měřena intenzita pouze jednoho nebo několika vybraných iontů. Dochází tak ke zvýšení selektivity i citlivosti.<sup>29</sup>

Oblastí, ve kterých se tato analytická technika uplatňuje, je nepřehledné množství, neboť jediným významným omezením je nedostatečná těkavost látek. Pro vysokou citlivost detekce hmotnostním spektrometrem nalézá GC/MS uplatnění jak při stopových, tak i ultrastopových analýzách. Výhodné je i její použití pro analýzu komplikovaných směsí látek a pro komplexní vzorky obsahující neznámé složky. V praxi je hojně využívána v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, stejně tak jako v toxikologii k identifikaci a kvantifikaci návykových a dopingových látek.<sup>29</sup>

## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

- Diethylether p. a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Ethylacetát p. a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika
- Hexan p. a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika
- Methylalkohol p. a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- m-Nitrofenol p. a., LOBA-CHEMIE, Vídeň, Rakousko
- Pyridin p. a., PENTA, Chrudim, Česká republika
- Silylační činidlo N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), Sigma - Aldrich, Praha, Česká republika
- Tetrachlormethan p. a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika
- Standardy:
  - kyselina kávová p. a., Sigma - Aldrich, Praha
  - kyselina rozmarýnová p. a., Sigma - Aldrich, Praha
  - kyselina čekanková p. a., Sigma - Aldrich, Praha
  - kyselina chlorogenová p. a., Sigma - Aldrich, Praha

### 3.2 Přístrojové vybavení

- Vysokotlaký extraktor *one* PSE, Applied separations Inc., Allentown, PA, USA
- Centrifuga 5702, Eppendorf
- Ultrazvuková lázeň K – 10LM, Kraintek Czech s.r.o, Hradec Králové, Česká republika
- Plynový chromatograf Agilent 7890A s hmotnostním detektorem 5975 C, Palo Alto, Kalifornie, USA. Nosný plyn – Helium (čistota 99,998%, rychlost průtoku 0,9 ml/min, SIAD, Bergamo, Itálie). Kolona – HP-5MS (parametry 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Agilent, Palo Alto, Kalifornie, USA). Podmínky GC separace (50 °C (2 min) – 10 °C/min – 350 °C (20 min)); nástřik 1 μl (340 °C), dávkovací puls 138 kPa, 12 s. Hmotnostní spektra byla snímána v režimu TIC v intervalu 29 – 950 m/z a v režimu SIM pro selektivní ionty 196, 345 a 396 m/z.



### 3.3 Vzorky rostlinného materiálu

- čekanka obecná (nať), výrobce Rosa Canina, Veverská Bítýška
- třapatka nachová (květ, kořen, stonek, list), stáří cca 4 roky, pěstována v Čechovicích u Olomouce, sběr srpen 2016, sušena v temnější místnosti při pokojové teplotě, část vzorků uskladněna ve skleněných nádobách v temnu, taktéž při pokojové teplotě, druhá část uskladněna v mrazicím boxu
- čekanka obecná (květ, kořen, stonek, list), stáří neznámé, nepěstována (samovolný růst – Vsisko, Olomouc), sběr srpen 2016, sušena v temnější místnosti při pokojové teplotě, část vzorků uskladněna ve skleněných nádobách v temnu, taktéž při pokojové teplotě, druhá část uskladněna v mrazicím boxu

### 3.4 Příprava extraktů

#### 3.4.1 Macerace

Do první zkumavky bylo naváženo 487,5 mg sušeného květu čekanky, do zkumavky druhé bylo naváženo 796,6 mg stonku čekanky. Do obou zkumavek bylo přidáno po 8 ml extrakčního činidla, kterým byl v tomto případě methanol. Extrakce probíhala v uzavřených zkumavkách za temna po dobu jednoho týdne. Po uplynutí extrakční doby byly obě zkumavky vloženy do ultrazvukové lázně na 10 minut. Následně byly vzorky podrobeny centrifugaci, která trvala 4 minuty při nejvyšších otáčkách (4400 ot/min). Poté bylo z obou zkumavek odebráno 200 µl extraktu, který byl dále odpařen proudem dusíku při 80 °C. Před samotnou analýzou plynovým chromatografem s hmotnostní detekcí byla provedena derivatizace.

#### 3.4.2 Vysokotlaká extrakce

Pro vysokotlakou extrakci byl použit přístroj *one* PSE. Do patrony z nerezové oceli o objemu 10 ml byla nejprve vložena fritra, na ní malé množství křemeliny a poté 1,5 g natě čekanky. Patrona se vzorkem byla umístěna do termostatu vysokotlakého extraktoru. Rozpouštědlem byl, tak jako v případě macerace, methanol. Samotná extrakce probíhala při teplotě 150 °C a tlaku 15 MPa po dobu dvakrát 10 minut. Získaný extrakt byl odpařován proudem dusíku při 80 °C a následně kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 10 ml. Dále byl extrakt převeden do zkumavky a centrifugován 5 minut při 4400 ot/min. Následovalo přečištění tetrachlormethanem, kdy byl odebrán 1 ml z extraktu, ke kterému byl přidán 1 ml tetrachlormethanu a 200 µl destilované vody. Po protřepání a centrifugaci (5 min,

4400 ot/min) byl odebrán 1 ml horní fáze do vialky. Derivatizace před analýzou probíhala za podobných podmínek jako při maceraci.

### **3.4.3 Extrakce subkritickou vodou**

Extrakce subkritickou vodou probíhala také na přístroji *one* PSE, parametry pro extrakci byly téměř shodné jako u předchozí extrakce. Teplota, tlak, počet cyklů a jejich doba zůstaly nezměněny. Nahrazeno bylo pouze rozpouštědlo a to destilovaná voda místo methanolu. Naváženo bylo 7,16 g natě čekanky, která byla vložena do patrony a umístěna do termostatu přístroje. Ze získaného extraktu byla jedna část podrobena navíc extrakci diethyletherem. Z etherového extraktu byl odebrán 1 ml, odpařen dusíkem a poté k němu byla přidána příslušná derivatizační činidla a hexan v poměru jako u předchozí extrakce. Druhá část extraktu byla extrahována ethylacetátem. U ethylacetátového extraktu bylo provedeno zakoncentrování, kdy byl odebrán 1 ml extraktu, odpařen dusíkem do sucha, aby byl následně přidán znovu 1 ml extraktu a sušen. Postup byl opakován pětkrát a bylo tak tedy zakoncentrováno 5 ml extraktu. Derivatizace byla provedena za stejných podmínek jako v předešlé extrakci.

### **3.5 Příprava roztoků standardů**

Standardní roztoky kyselin - čekankové, chlorogenové, kávové a rozmarýnové o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny rozpuštěním navážky v methanolu. Z takto připravených roztoků standardů kyselin bylo odebráno 50  $\mu$ l, které byly derivatizovány za podmínek jako v případě vysokotlaké extrakce. Standardní roztok m-nitrofenolu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním navážky v methanolu.

### **3.6 Příprava extraktů reálných vzorků**

Pro extrakci reálných vzorků byly použity zmražené části (květ, kořen, stonek a list) dvou rostlin a to třapatky nachové a čekanky obecné. Jednotlivé části rostlin byly naváženy do patrony a extrahovány za stejných podmínek jako při vysokotlaké extrakci. Navážky jsou uvedeny na str. 29 a 30, tabulky III a IV. Získané extrakty byly poté odpařeny, případně doplněny methanolem na objem 25 ml. Z těchto extraktů bylo odebráno po 1 ml do zkumavek, ke kterým bylo přidáno 100  $\mu$ l roztoku m-nitrofenolu, 1 ml tetrachlormethanu a 200  $\mu$ l destilované vody. Po protřepání a centrifugaci (5 min, 4400 ot/min) byl odebrán 1 ml horní fáze a odpařen dusíkem do sucha. Derivatizace byla prováděna opět za stejných podmínek jako u vysokotlaké extrakce. Po vychladnutí byl objem ve vialce doplněn na 1 ml hexanem. Před

koncovou analýzou byly vzorky centrifugovány po dobu 2 minut při 4400 ot/min a následně bylo odebráno 800 µl extraktu do nových vialek.

### **3.7 Úprava vzorků – derivatizace**

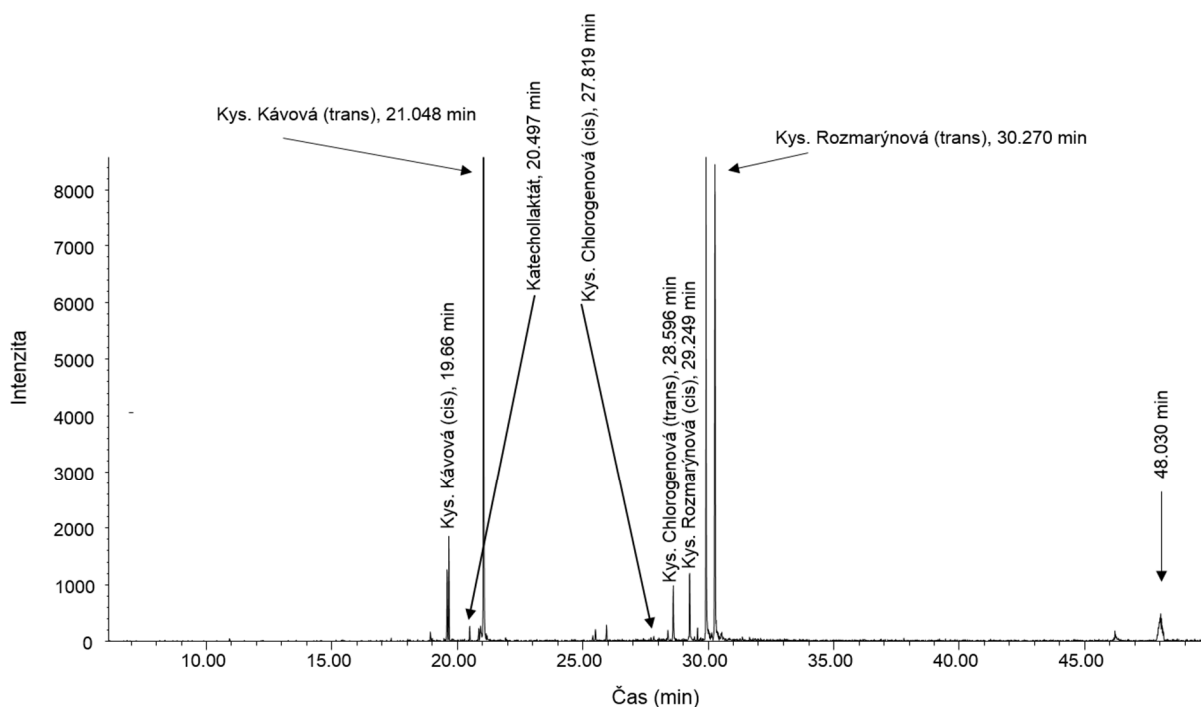
U všech vzorků byla derivatizace prováděna silylačním činidlem N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidem (dále už jen BSTFA) a v prostředí pyridinu. V případě extrakce macerací byl odparek rozpuštěn v 50 µl pyridinu a silanizován 50 µl BSTFA. Směs v uzavřených vialkách byla zahřívána po dobu 20 minut při 90°C. Po vychladnutí bylo ke směsi přidáno 400 µl hexanu. K odparku ve vialce získaného z vysokotlaké extrakce bylo přidáno stejné množství silylačního činidla a pyridinu, doba zahřívání byla prodloužena z 20 na 30 minut při teplotě 80°C. Objem ve vialce byl doplněn na 1 ml hexanem. Za stejných podmínek, jako v případě vysokotlaké extrakce, byla provedena derivatizace i u odparku získaného extrakcí subkritickou vodou.

## 4 Výsledky a diskuze

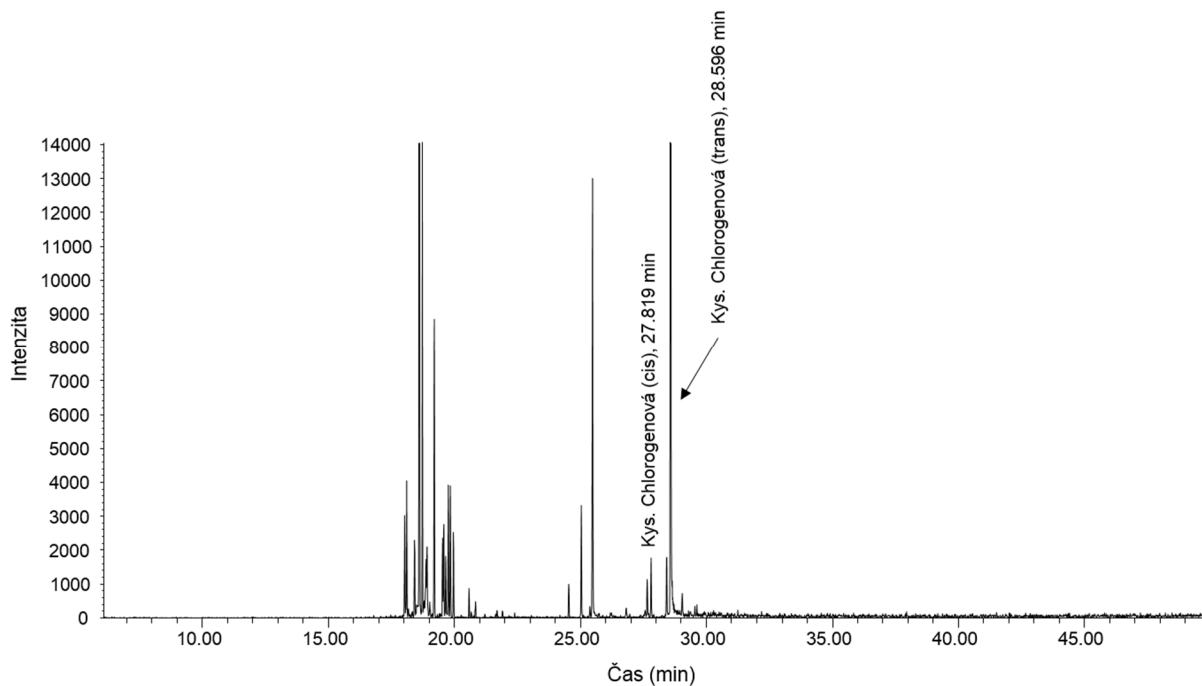
### 4.1 Macerace

Na začátku experimentu byla jako metoda extrakce zvolena macerace, neboť tento typ extrakce je velice hojně využíván pro sušený rostlinný materiál. Po sedmidenní maceraci květu a stonku čekanky a následných úpravách extraktů zahrnujících rovněž derivatizaci byly vzorky analyzovány na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí.

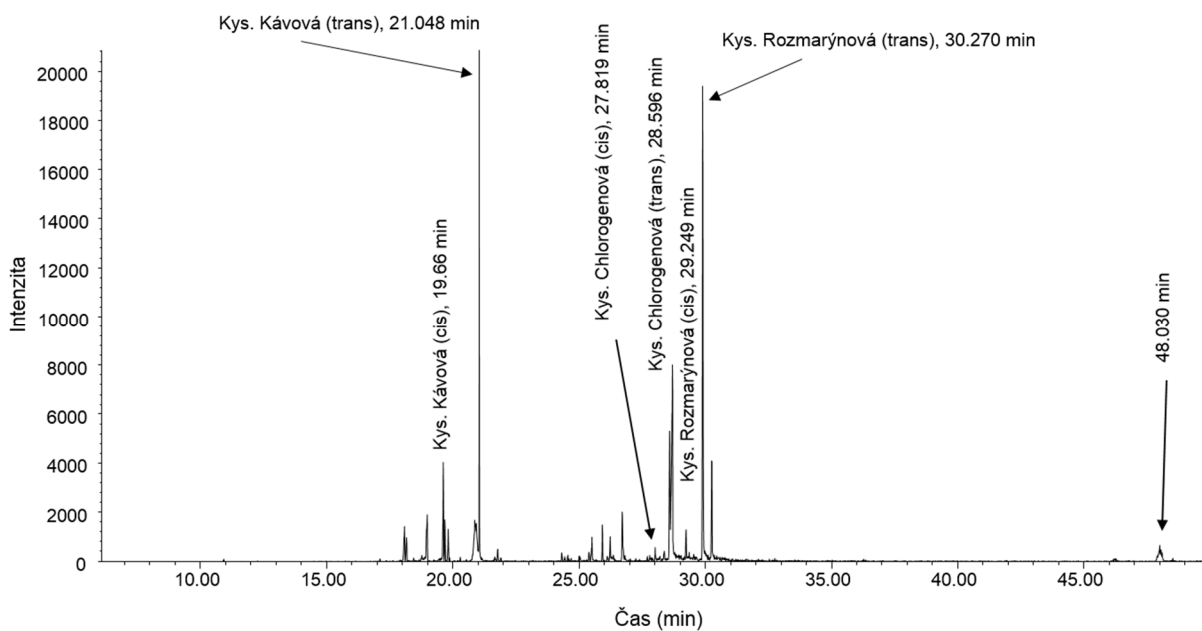
V obou částech rostliny byla na základě porovnání retenčních časů a hmotnostních spekter z knihovny spekter identifikována kyselina kávová a dva deriváty této kyseliny s jejich příslušnými izomery. K selektivní detekci byly použity dva ionty – 396 m/z a 345 m/z, kdy iont 396 odpovídá molekulárnímu iontu kyseliny kávové a iont 345 kyseliny chlorogenové – viz obr. 10 – 12. Na obrázcích 10 a 12 lze vidět pík s retenčním časem 48 minut, jehož intenzita signálu byla velice malá a bylo předpokládáno, že by mohl patřit kyselině čekankové. Jak ovšem ukázala analýza standardu kyseliny čekankové – obr. 23, tento předpoklad byl nesprávný, neboť pík standardu kyseliny čekankové odpovídá retenčnímu času 34,2 minut. Retenční časy, molekulové hmotnosti před a po derivatizaci spolu s ionty k detekci kyselin jsou uvedeny v tabulce I.



*Obr. 10 Chromatogram derivátů kyseliny kávové při maceraci stonku čekanky - iont 396 m/z.*



*Obr. 11 Chromatogram derivátů kyseliny kávové při maceraci stonku čekanky - iont 345 m/z.*



*Obr. 12 Chromatogram derivátů kyseliny kávové při maceraci květu čekanky - iont 396 m/z.*

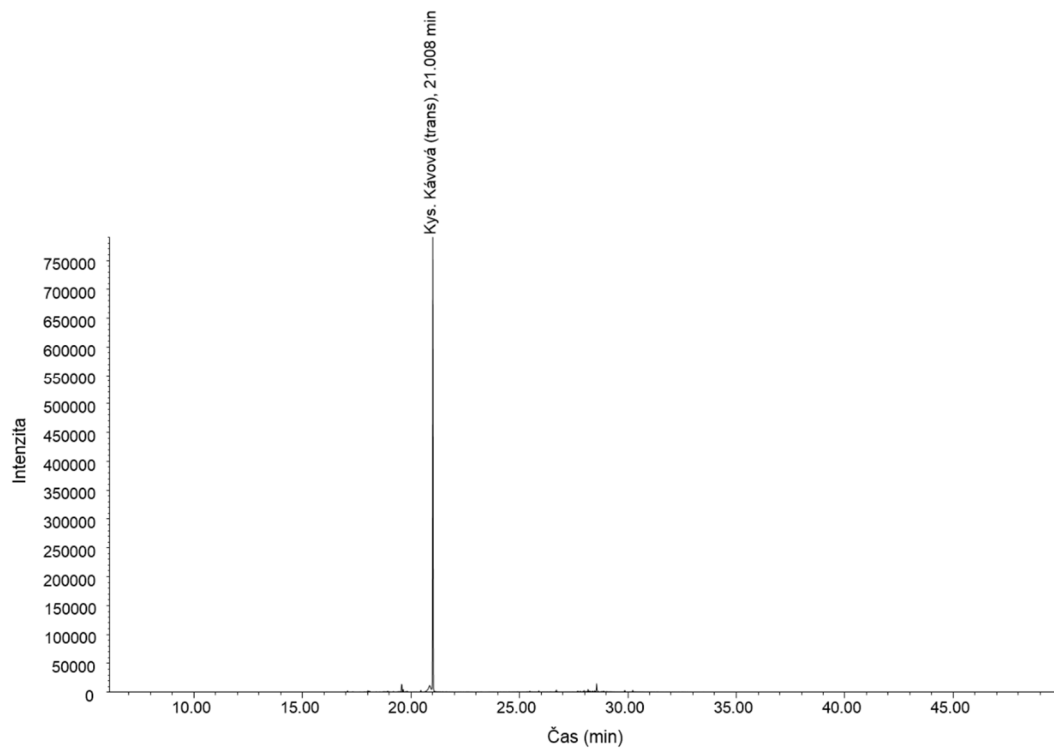
**Tab. I** Retenční časy, molekulové hmotnosti a fragmenty použité k identifikaci derivátů kyseliny kávové

Kyselina	Retenční čas (min)	Molekulová hmotnost (g·mol <sup>-1</sup> )	Molekulová hmotnost po silanizaci (g·mol <sup>-1</sup> )	Iont k detekci (m/z)
<b>Kávová (cis)</b>	19,660	180,159	396,726	396
<b>Kávová (trans)</b>	21,048	180,159	396,726	396
<b>Chlorogenová (cis)</b>	27,819	354,311	787,445	345
<b>Chlorogenová (trans)</b>	28,596	354,311	787,445	345
<b>Rozmarýnová (cis)</b>	29,249	360,318	721,263	396
<b>Rozmarýnová (trans)</b>	30,270	360,318	721,263	396
<b>Čekanková</b>	34,161	474,374	907,508	906

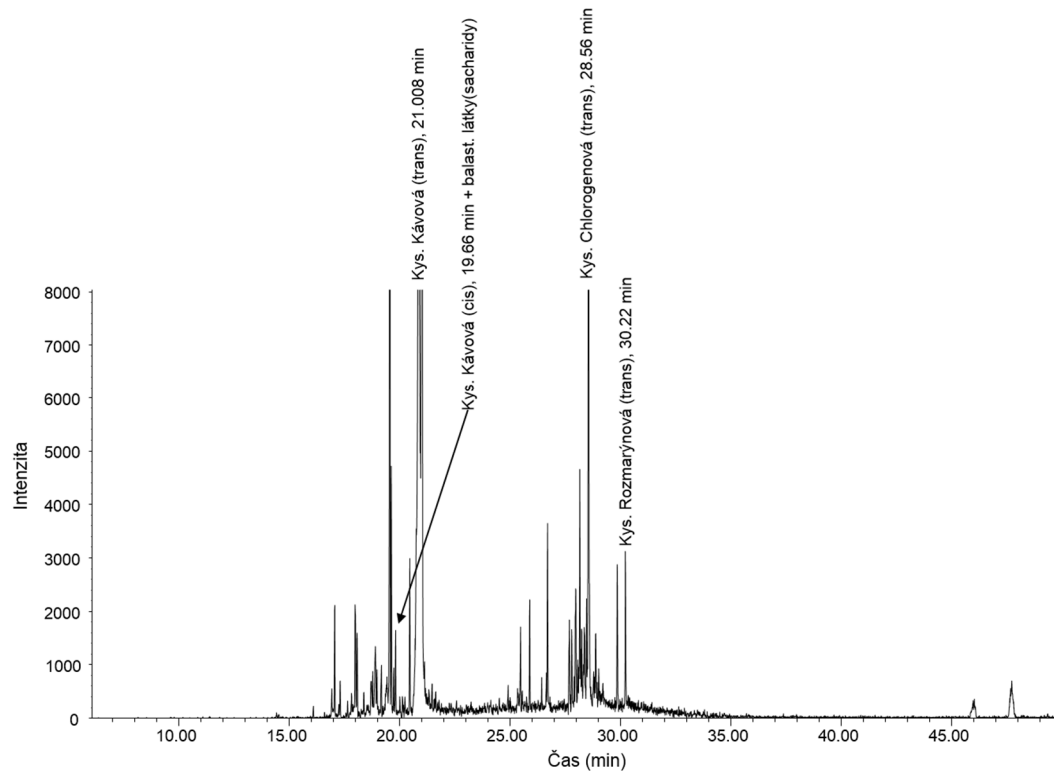
## 4.2 Vysokotlaká extrakce

Vzhledem k tomu, že pík kyseliny čekankové nebyl detekován, bylo nutné optimalizovat extrakční podmínky. K dosažení lepších výtěžků dochází za vyšších teplot a tlaků, byla proto zvolena vysokotlaká extrakce, která probíhala při teplotě 150 °C a tlaku 15 MPa, za použití rozpouštědla methanolu na přístroji *one* PSE. Extrakt natě čekanky byl následně přečištěn tetrachlormethanem a před samotnou analýzou byla provedena derivatizace činidlem BSTFA v prostředí pyridinu.

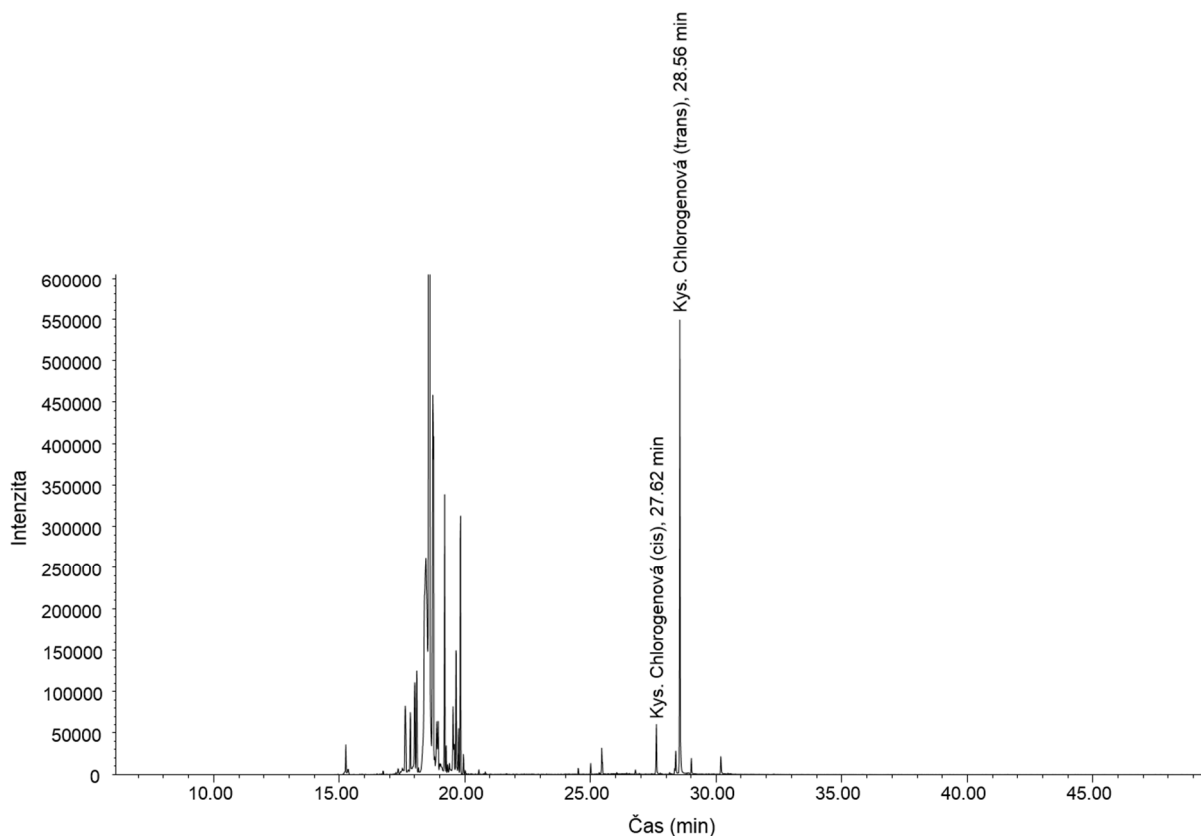
Výsledkem bylo značné zesílení signálu kyselin, zejména kyseliny kávové – obr. 13. Na obr. 14 – 15 lze vidět záznam spekter, kdy k selektivní detekci byly vybrány opět dva ionty a to 396 m/z a 345 m/z, které odpovídají dominantním iontům kyseliny kávové a chlorogenové. S větším zesílením signálu došlo i k většímu projevu balastních látek přítomných ve vzorku, které byly sacharidové povahy, jak ukazuje obr. 14.



**Obr. 13** Chromatogram kyseliny kávové získaný při vysokotlaké extrakci natě čekanky - 396 m/z



**Obr. 14** Chromatogram derivátů kyseliny kávové získaných při vysokotlaké extrakci z natě čekanky - 396 m/z (výřez z obr. 13)



*Obr. 15 Chromatogram derivátů kyseliny kávové získaných při vysokotlaké extrakci z natě čekanky - 345 m/z*

### 4.3 Extrakce subkritickou vodou

Vysokotlaká extrakce dávala větší intenzity signálů, ale byl zde i rušivý vliv balastních látek, byla proto hledána cesta, jak tento problém vyřešit a jednou z možností byla extrakce subkritickou vodou s následným přečištěním organickým rozpouštědlem. Tím byl pro jednu část extraktu diethylether a pro druhou část ethylacetát. Toto přečištění bylo zvoleno na základě rozdělávání mezi vodu a diethylether (ethylacetát). Tedy že sacharidy, jakožto balastní látky by měly přejít do vodné fáze a kyseliny do fáze organické. Srovnání návratnosti zkoumaných fenolických kyselin a balastních látek při přečištění dvěma výše uvedenými rozpouštědly je uvedeno v tabulce II. Z tabulky II vyplývá vysoká účinnost odstranění balastních látek při zachování velké návratnosti kyseliny kávové ve srovnání s výsledky z vysokotlaké extrakce. Problém nastává u vyšších kyselin, které se ztrácejí. Řešením by mohla být optimalizace podmínek extrakce subkritickou vodou. V případě této metody byla extrakce prováděna jako v předchozím případě na přístroji *one* PSE, byly však pozměněny některé parametry. Byla zvýšena navážka natě čekanky ze 1,5 g na 7,16 g. Získaný extrakt byl poté rozdělen na dvě

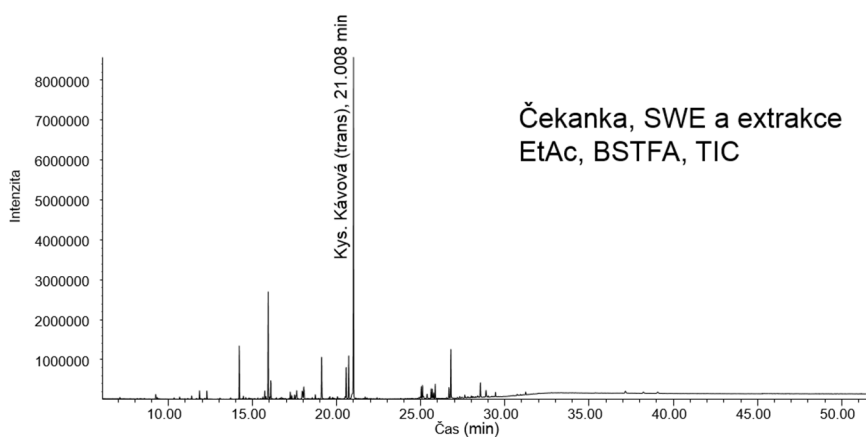
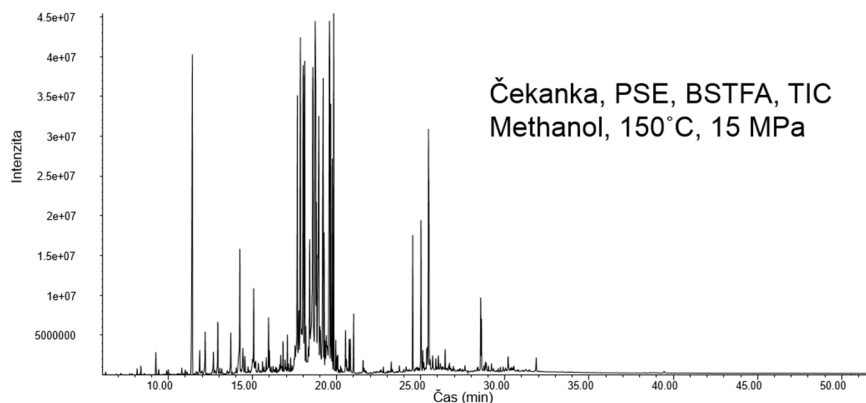


části, kdy první z nich byla extrahována diethyletherem a druhá ethylacetátem s následným zakoncentrováním vzorku. Průběh derivatizace byl stejný jako v předchozím případě. Odstranění balastních látek lze pozorovat i na obrázku 16, kde jsou porovnávány dva chromatogramy. Vrchní chromatogram reprezentuje vysokotlakou extrakci methanolem, spodní pak extrakci subkritickou vodou s následnou extrakcí ethylacetátem a zakoncentrováním vzorku. Oba chromatogramy jsou ve formě celkového iontového proudu.

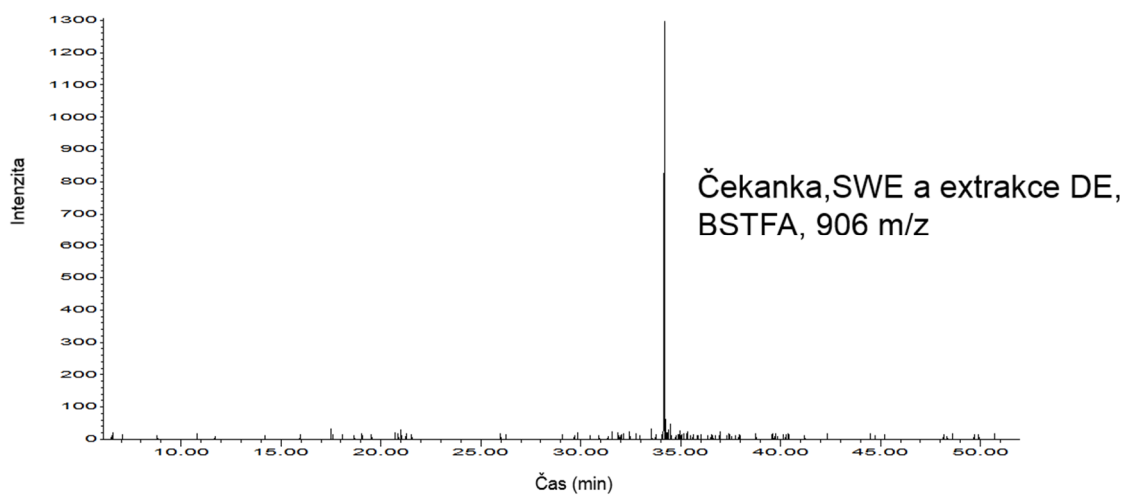
**Tab. II** Srovnání návratnosti (v %) fenolických kyselin a balastních látek při SWE a přečištění EtAc a DE

Látka	SWE/EtAc	SWE/DE
<b>Fruktosa</b>	< 0,01	< 0,01
<b>Myo – inositol</b>	< 0,01	< 0,01
<b>Sacharosa</b>	< 0,01	< 0,01
<b>Kyselina kávová</b>	24,162	80,979
<b>Kyselina chlorogenová</b>	0,716	0,540
<b>Kyselina rozmarýnová</b>	0,022	1,868

Na obrázku 17 je znázorněn chromatografický záznam z analýzy první části extraktu, který byl po extrakci subkritickou vodou extrahován diethyletherem. Záznam není v podobě celkového iontového proudu, ale pouze vybraný iont – 906 m/z. Tato hodnota byla zvolena z důvodu molární hmotnosti kyseliny čekankové po derivatizaci silylačním činidlem BSTFA. Jedná se pravděpodobně o kyselinu čekankovou.



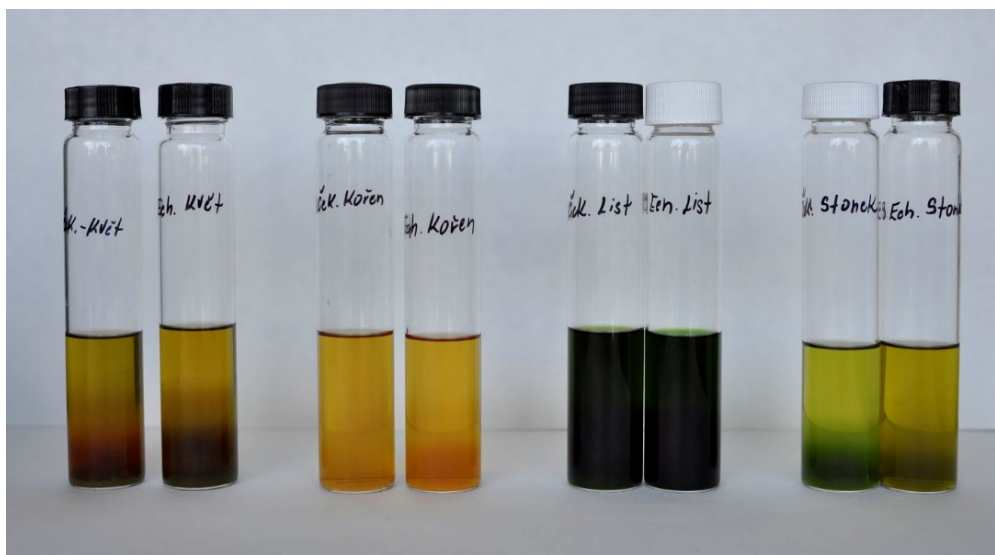
**Obr. 16** Srovnání chromatogramů z vysokotlaké extrakce a extrakce subkritickou vodou



**Obr. 17** Chromatogram z extrakce subkritickou vodou a extrakce diethyletherem při 906 m/z.

#### 4.4 Extrakce reálných vzorků

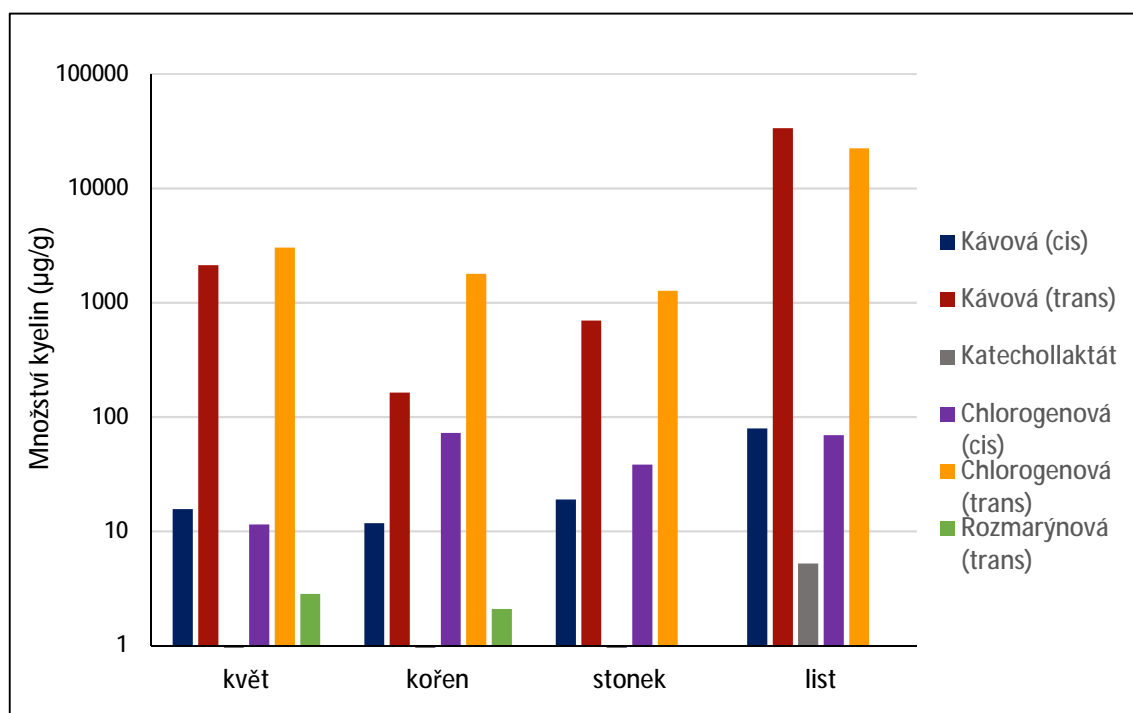
Pro zvýšení citlivosti byl pozměněn parametr u hmotnostního spektrometru a to snímání hmotnostních spekter, kdy nebyla spektra zaznamenávána v celém rozsahu 29 – 950 m/z, ale pouze při třech vybraných iontech – 196, 345 a 396 m/z. Ion 196 m/z odpovídá vnitřnímu standardu m-nitrofenolu, ionty 345 a 396 m/z slouží k detekci kyseliny chlorogenové, kávové, 3-(3,4-dihydroxyfenyl) mléčné neboli katechollaktátu a kyseliny rozmarýnové. Pro porovnání množství kyselin v jednotlivých částech rostlin byla využita kvantifikace metodou vnitřního standardu. Přehled extraktů získaných při vysokotlaké extrakci je na obrázku 18. Navážky rostlinného materiálu společně s výslednou koncentrací kyselin jsou uvedeny v tabulkách III a IV. Grafické znázornění množství kyselin v jednotlivých částech rostlin je na obrázcích 19 a 20. Z těchto obrázků také vyplývá, že největší množství kyselin bylo v případě čekanky obsaženo v jejích listech. Nejvíce zastoupeným derivátem kyseliny kávové byla pro všechny části s výjimkou listů kyselina chlorogenová (trans izomer). U třapatky byla situace zcela odlišná. Převažujícím derivátem byla kyselina kávová (trans izomer) a nejvíce kyselin bylo obsaženo v kořeni rostliny, což byla také jediná část rostliny, ve které se vyskytovala, ač ve velmi malém množství, kyselina rozmarýnová (trans izomer).



**Obr. 18** Extrakty získané z PSE extrakce (zleva čekanka, třapatka – květ, čekanka, třapatka – kořen, čekanka, třapatka – list a čekanka, třapatka – stonk)

**Tab. III** Koncentrace kyselin v jednotlivých částech čekanky obecné

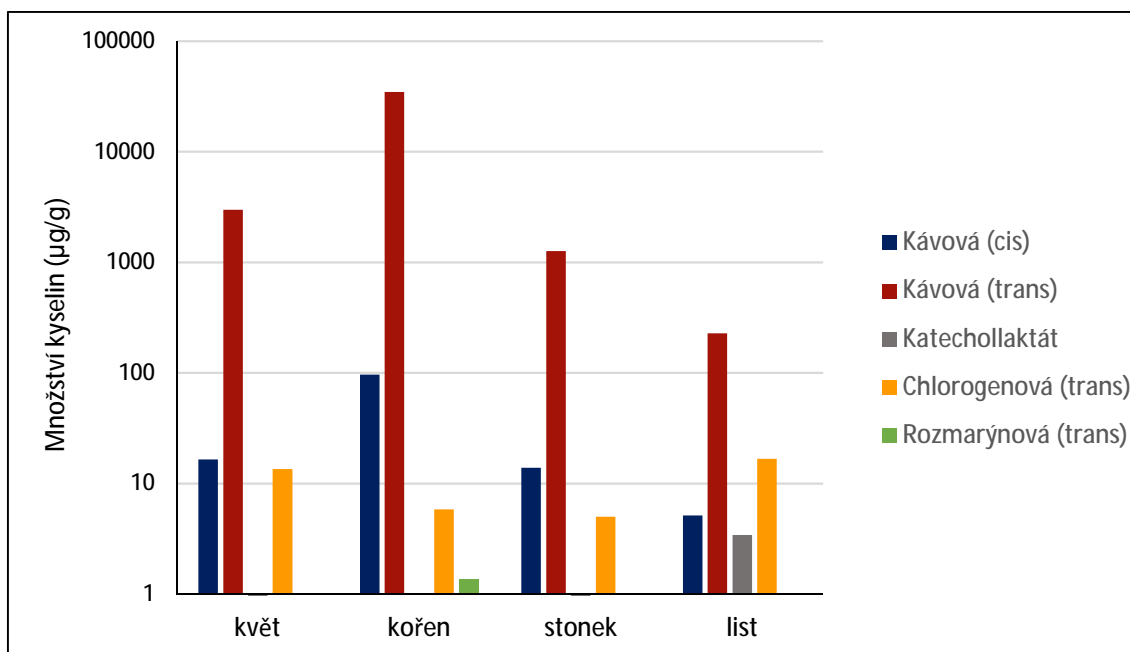
čekanka obecná				
	květ	kořen	stonek	list
<b>Navážka (g)</b>	2,60	1,37	1,30	1,00
<b>Celková koncentrace kyselin (µg/g)</b>				
<b>Kávová (cis)</b>	15,63	11,73	18,99	79,13
<b>Kávová (trans)</b>	2127	163,7	695,7	33561
<b>Katechollaktát</b>	0,2749	0,4725	0,6774	5,206
<b>Chlorogenová (cis)</b>	11,46	72,24	38,28	69,12
<b>Chlorogenová (trans)</b>	3035	1783	1267	22391
<b>Rozmarýnová (cis)</b>	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
<b>Rozmarýnová (trans)</b>	2,836	2,095	n. d.	n. d.



**Obr. 19** Porovnání množství fenolických kyselin v jednotlivých částech čekanky obecné

Tab. IV Koncentrace kyselin v jednotlivých částech třapatky nachové

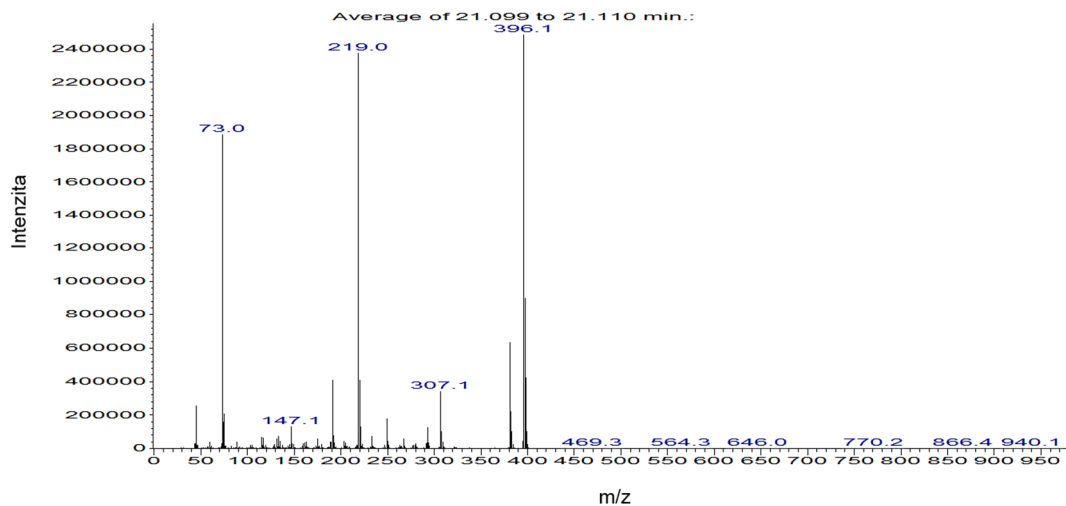
třapatka nachová				
	květ	kořen	stonek	list
Navážka (g)	2,02	1,70	1,83	1,10
<b>Celková koncentrace kyselin (µg/g)</b>				
Kávová (cis)	16,46	96,41	13,85	5,12
Kávová (trans)	2974	34609	1263	227,5
Katechollaktát	0,5104	n. d.	0,2203	3,418
Chlorogenová (cis)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Chlorogenová (trans)	13,48	5,835	5,005	16,74
Rozmarýnová (cis)	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
Rozmarýnová (trans)	n. d.	1,371	n. d.	n. d.



Obr. 20 Porovnání množství fenolických kyselin v jednotlivých částech třapatky nachové

## 4.5 Standardy kyselin

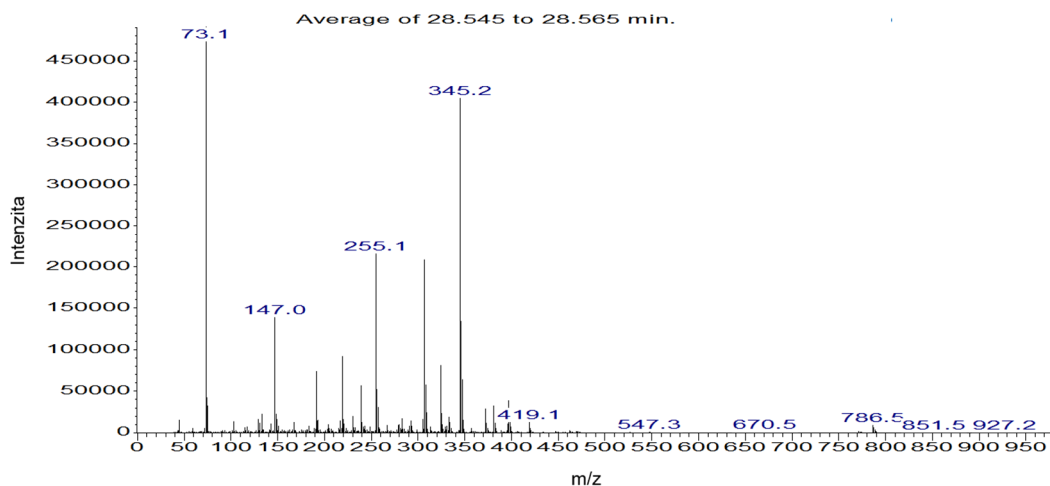
### *Standard kyseliny kávové*



*Obr. 21 Chromatogram standardu kyseliny kávové*

### *Standard kyseliny chlorogenové*

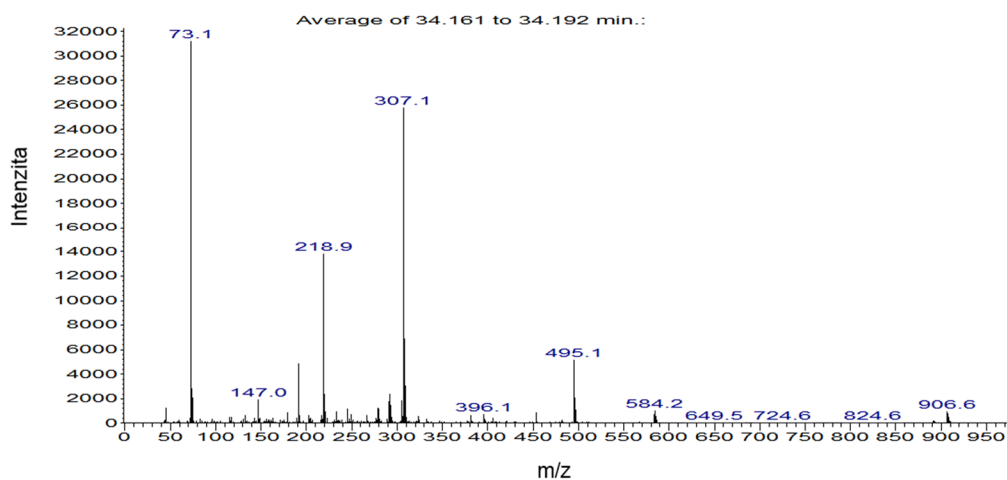
K detekci kyseliny chlorogenové byl vybrán iont 345 m/z, neboť se jedná o dominantní iont ve spektru, ačkoliv je iont 73 m/z větší, jak ukazuje obrázek 22.



*Obr. 22 Chromatogram standardu kyseliny chlorogenové*

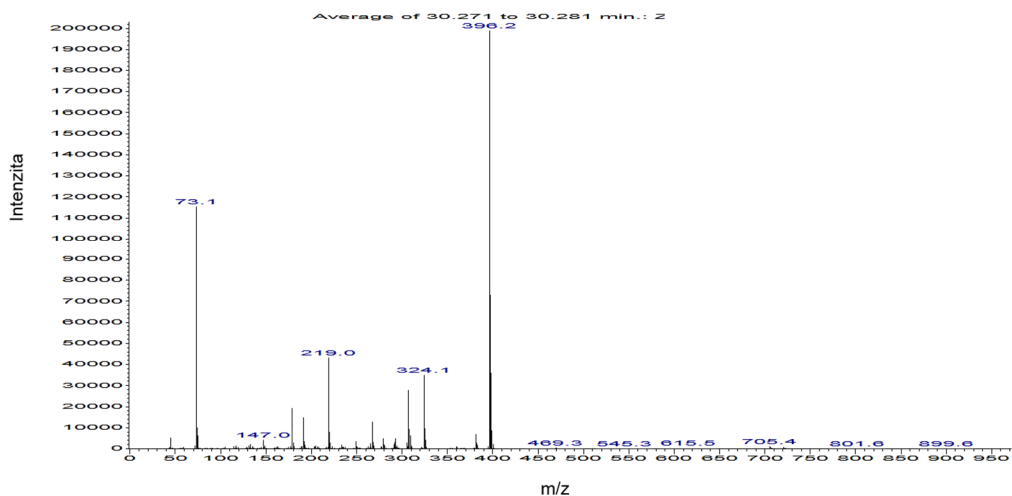
### Standard kyseliny čekankové

Při extrakci subkritickou vodou byl při molekulárním iontu, odpovídajícímu kyselině čekankové, detekován pík s nízkou intenzitou v čase okolo 34 minut – obr. 17. Analýzou standardu kyseliny čekankové bylo potvrzeno, že se skutečně jedná o kyselinu čekankovou – viz obr. 23. Nízká intenzita signálu je pravděpodobně způsobena termální stabilitou respektive nestabilitou dané látky, která se rozpadá, i když je její bod varu vyšší než nastavená teplota kolony.



Obr. 23 Chromatogram standardu kyseliny čekankové

### Standard kyseliny rozmarýnové



Obr. 24 Chromatogram standardu kyseliny rozmarýnové

## 5 Závěr

V této práci byly stanovovány deriváty kyseliny kávové v rostlinném materiálu při různých extrakčních podmínkách. Jako první extrakční metoda byla zvolena ta nejjednodušší a to macerace. Týdenní macerací čekanky v methanolu byla získána kyselina kávová a její dva deriváty – kyselina chlorogenová a rozmarýnová, obě v podobě svých cis a trans izomerů. Intenzita signálů nebyla ovšem příliš vysoká, a proto bylo přistoupeno k vysokotlaké extrakci. Jak je patrné z výsledků, tato metoda extrakce způsobila zesílení intenzity signálů, nicméně byl zvětšen i projev balastních látek, které se vyskytovaly ve formě sacharidů. Detekovány byly stejné kyseliny jako v případě macerace. Odstranit vliv balastních látek se podařilo extrakcí subkritickou vodou s následným přečištěním extraktu diethyletherem respektive ethylacetátem. Spolu s odstraněním balastních látek se však začaly ztrácet i některé kyseliny a to chlorogenová a rozmarýnová.

Na základě těchto výsledků byla zvolena pro reálné vzorky jako extrakční metoda vysokotlaká extrakce, neboť záměrem bylo stanovit co největší množství derivátů kyseliny kávové. Z výsledků je patrné, že se nepodařilo stanovit cis izomer kyseliny rozmarýnové. Trans izomer této kyseliny společně s cis izomerem kyseliny chlorogenové se vyskytovaly pouze u několika vzorků. Naopak nejvíce zastoupenou kyselinou byla v třapatce kyselina kávová v podobě trans izomeru a v čekance kyselina chlorogenová, taktéž trans isomer.

Cílem práce bylo stanovit, který derivát kyseliny kávové je ještě možno detekovat plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Extrakce subkritickou vodou umožňuje účinnou extrakci s přečištěním extraktu pro stanovení kyseliny kávové. Extrakce methanolem je naopak vhodná pro ostatní kyseliny, ale za cenu extraktů s vysokým podílem balastních látek. Ostatními kyselinami se myslí kyseliny chlorogenová, rozmarýnová a kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl) propionová. Problém nastává u reálných vzorků rostlin, kde se ztrácí i některé výše uvedené kyseliny v důsledku jejich nestability. Kyselinu čekankovou, která by měla být nejvíce zastoupeným derivátem kyseliny kávové, se sice podařilo detekovat při extrakci subkritickou vodou, ale v methanolických extraktech není vidět a tudíž ji nelze s ničím srovnat. Z výsledků tedy vyplývá, že pro oba izomery kyseliny kávové lze použít různé extrakční techniky. Pro jiné deriváty kyseliny kávové se jako nejvhodnější metodou jeví macerace.



## 6 Summary

This thesis deals with a determination of caffeic acid derivatives in plant samples under different extraction techniques. The first extraction method was the simplest - a maceration. After weekly maceration of chicory in methanol there were obtained these acids: caffeic acid, rosmarinic acid and chlorogenic acid (the last two were in a form of their cis and trans isomers). However, the abundance of signals was not too high so accelerated solvent extraction was undertaken. The results showed, that this method caused an amplification of abundance, but abundance of ballast substances, that were in form of carbohydrates was increased too. The same acids as in the case of maceration were detected. The influence of ballast substances was successfully removed by subcritical water extraction with subsequent purification by diethyl ether respectively by ethyl acetate. Together with the removal of ballast substances same acids were also lost, namely chlorogenic and rosmarinic acid.

Based on gained results was chosen accelerated solvent extraction for real plant samples with subsequent purification by tetrachlormethane because the goal of study was to obtain the most amount of caffeic acid derivatives. Results showed, that there was not detected rosmarinic acid (cis isomer) in both plants. In the case of coneflower there was not also detected chlorogenic acid (cis isomer). Rosmarinic acid (trans isomer) was only detected in the flowers and roots of chicory and roots of coneflower. Conversely, the most represented acid was caffeic acid in the form of trans isomer in coneflower and chlorogenic acid (trans isomer) in chicory.

The aim of the work was to determine, which caffeic acid derivative can still be detected by gas chromatography with mass spectrometer. Subcritical water allows efficient extraction with purification of the extract to determine the caffeic acid. On the other hand for other acids is appropriate extraction by methanol, but with the high influence of ballast substances. Other acids are – chlorogenic, rosmarinic and 3-(3,4-dihydroxyphenyl) propionic acid. The problem is with real plant samples, where some of the above acids are lost as a result of their instability. The cichoric acid, which should be the most represented derivative of caffeic, has been detected in the extract from subcritical water extraction, but can not be seen in methanol extracts and therefore can not be compared with it. Based on the above results it follows that for both isomers of caffeic acid could be used different extraction techniques. For other caffeic acid derivatives is the most suitable method maceration.

## 7 Seznam použité literatury

1. Schar D.: *Echinacea: rostlina, která posílí váš imunitní systém: léky z přírody*. Hodkovičky: Pragma, 2004.
2. Mulinacci N., Innocenti M., Gallori S., Romani A., Marca La G., Vincieri F. F.: Optimization of the chromatographic determination of polyphenols in the aerial parts of *Cichorium intybus* L. *Chromatographia* 54, 455 (2001).
3. Franck A.: Technological functionality of inulin and oligofructose. *Br. J. Nutr.* 87, 287 (2002).
4. Sahan Y., Gurbuz O., Guldaz M., Degirmencioglu N., Begenirbas A.: Phenolics, antioxidant capacity and bioaccessibility of chicory varieties (*Cichorium* spp.) grown in Turkey. *Food Chem.* 217, 483 (2017).
5. <https://www.walldevil.com/737445-chicory-wallpaper.html>, staženo 6. 3. 2017.
6. Kužel S.: *Technologie pěstování a zpracování Echinacea purpurea na extrakt s požadovanými prvky jakosti a podklady pro jeho certifikaci: vědecká monografie*. V Českých Budějovicích: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2008. Malotechnologie.
7. Harmatha J.: Strukturní bohatství a biologický význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenyylpropanoidů. *Chem. Listy* 99, 622 (2005).
8. Dixon R. A., Achnine L., Kota P., Liu C. J., Reddy M. S. S., Wang, L.: The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3, 371 (2002).
9. Konar N., Dalabasmaz S., Poyrazoglu E. S., Artik N., Colak A.: The determination of the caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea* aerial parts under various extraction conditions by supercritical fluid extraction (SFE). *The Journal of Supercritical Fluids* 89, 128 (2014).
10. Pari L., Prasath A.: Efficacy of caffeic acid in preventing nickel induced oxidative damage in liver of rats. *Chem.-Biol. Interact.* 173, 77 (2008).
11. Veselý O.: *Srovnání plodů některých odrůd zimolezů z hlediska obsahu vybraných biologicky aktivních látek*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Brno 2015.
12. Sigma – Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/>, staženo 6. 3. 2017.

13. AKila P., Vennila L.: Chlorogenic acid a dietary polyphenol attenuates isoproterenol induced myocardial oxidative stress in rat myocardium: An in vivo study. *Biomed. Pharmacoter.* *84*, 208 (2016).
14. Yuan Y., Gong X., Zhang L., Jiang R., Yang J., Wang B., Wan J.: Chlorogenic acid ameliorated concanavalin A-induced hepatitis by suppression of Toll-like receptor 4 signaling in mice. *Int. Immunopharmacol.* *44*, 97 (2017).
15. <http://www.compoundchem.com/2014/01/30/why-is-coffee-bitter-the-chemistry-of-coffee/>, staženo 6. 3. 2017.
16. Bogucki, D. E., Charlton, J. L.: A non-enzymatic synthesis of (S)-(-)-rosmarinic acid and a study of a biomimetic route to (+)-rabdosiin. *Can. J. Chem.* *75*, 1783 (1997).
17. Adomako - Bonsu A. G., Chan S. L. F., Pratten M., Fry J. R.: Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicol. In Vitro* *40*, 248 (2017).
18. Ou J., Huang J., Wang M., Ou S.: Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGEs formation in vitro. *Food Chem.* *221*, 1057 (2017).
19. Sigma – Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/>, staženo 6. 3. 2017.
20. Vanzo A., Cecotti R., Vrhovsek U., Torres A. M., Mattivi F., Passamonti S.: The fate of trans - caftaric acid administered into the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* *55*, 1604 (2007).
21. Sigma – Aldrich. <http://www.sigmaaldrich.com/>, staženo 6. 3. 2017.
22. Lee J., Scagel C. F.: Chicoric acid: chemistry, distribution, and production. *Front. Chem.* *40*, (2013).
23. Tsai Y. L., Chiu C. C., Chen J. Y. F., Chan K. Ch., Lin S. D.: Cytotoxic effects of Echinacea purpurea flower extracts and cichoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis. *J. Ethnopharmacol.* *143*, 914 (2012).
24. Thygesen L., Thulin J., Mortensen A., Skibsted L. H., Molgaard P.: Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from Echinacea purpurea, alone and in combination. *Food Chem.* *101*, 74 (2007).
25. [https://en.wikipedia.org/wiki/Cichoric\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Cichoric_acid), staženo 6. 3. 2017.
26. Mudge E., Lopes – Lutz D., Brown P., Schieber A.: Analysis of alkylamides in Echinacea plant materials and dietary supplements by ultrafast liquid chromatography

- with diode array and mass spectrometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 59, 8086 (2011).
27. Miller S. C., Yu H.: *Echinacea: the genus Echinacea*. Boca Raton: CRC Press, 2004.
  28. Vrchotová N., Kužel S., Tříška J., Kolář L., Totušek J.: Extrakce a analýza fenolických látek z třapatky nachové (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) *Chem. Listy* 96, 636 (2002).
  29. Štulík K.: *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004.
  30. *Vysokoučinné analytické separace biologicky aktivních látek*. Praha: VŠCHT, 2006. 30
  31. Kaufmann B., Christen P.: Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.* 13, 105 (2002).
  32. Luthria D., Vinjamori D., Noel K., Ezzell J.: *Oil extraction and analysis: critical issues and comparative studies*. Champaign, III.: AOCS Press, c2004.
  33. [https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/teorie\\_pse.pdf](https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/teorie_pse.pdf), staženo 6. 3. 2017.
  34. Ramos L., Kristenson E. M., Brinkman U. A. T.: Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *J. Chromatogr. A* 975, 3 (2002).
  35. Zakaria S. M., Kamal S. M. M.: Subcritical Water Extraction of Bioactive Compounds from Plants and Algae: Applications in Pharmaceutical and Food Ingredients. *Food Eng. Rev.* 8, 23 (2016).
  36. Ong E. S., Cheong J. S. H., Goh D.: Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *J. Chromatogr. A* 1112, 92 (2006).
  37. Schummer C., Delhomme O., Appenzeller B., Wennig R., Millet M.: Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* 77, 1473 (2009).
  38. Halket J. M., Zaikin V. G.: Derivatization in mass spectrometry - 3. Alkylation (arylation). *Eur. J. Mass. Spectrom.* 10, 1 (2004).
  39. Halket J. M., Zaikin V. G.: Derivatization in mass spectrometry - 2. Acylation. *Eur. J. Mass Spectrom.* 9, 421 (2003).

40. Halket J. M., Zaikin V. G.: Derivatization in mass spectrometry - 1. Silylation. *Eur. J. Mass Spectrom.* 9, 1 (2003).
41. Hübschmann H. J.: *Handbook of GC-MS: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2015.
42. Hussain S. Z., Maqbool K.: GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science. *Int. J. Curr. Sci.* 13, 116 (2014).
43. Ubik K.: *Fyzikálně-chemické metody*. Praha: Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, 2000.