

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**Fytochemický rozbor rozchodnice růžové (*Rhodiola
rosea*) pomocí HPLC/ED a GC/MS**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Aneta Marvanová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.

2023 Olomouc

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci 17. 04. 2023

.....

Podpis

Poděkování:

Za neocenitelnou a nezištnou pomoc, cenné rady a připomínky při vypracování této práce děkuji panu doc. RNDr. Davidu Jirovskému, Ph.D. Mé další poděkování náleží panu doc. RNDr. Petru Bartákovi, Ph.D. za spolupráci při analýze vzorků pomocí GC/MS. Také bych ráda poděkovala panu prof. RNDr. Hrbáčovi, Ph.D. za pomoc při získávání dat z cyklické voltametrie. Na závěr bych ráda poděkovala Zeynab Belbasi, M.Sc. za velkou ochotu a pomoc v laboratoři.

Tato závěrečná práce byla podpořena Interní grantovou agenturou UP (IGA_PrF_2023_023 a IGA_PrF_2023_027).

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Aneta Marvanová
Název práce:	Fytochemický rozbor rozchodnice růžové (<i>Rhodiola rosea</i>) pomocí HPLC/ED a GC/MS
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta univerzity Palackého v Olomouci, Česká republika
Vedoucí práce:	doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2023

Anotace:

Tato práce je zaměřena na fytochemický rozbor vybraných komerčních produktů rostliny rozchodnice růžové (*Rhodiola rosea*) pomocí metod HPLC/ED a GC/MS.

Byly testovány celkem čtyři komerční tinktury a dva vzorky sušeného kořene. Ze vzorků sušeného kořene byly připraveny vlastní tinktury tradičním způsobem macerace v 50% roztoku ethanolu po dobu dvou a pěti týdnů. Výše uvedené vzorky byly podrobeny analýze pomocí dvou nezávislých technik (HPLC/ED a GC/MS) a výsledky vzájemně porovnány.

Klíčová slova:	Biologicky aktivní látky, fenoly, fytochemie, elektrochemická detekce, historie chromatografie, hmotnostní detekce, chromatografie, plynová chromatografie, rozchodnice růžová, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Počet stran:	84
Počet příloh:	0
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Aneta Marvanová
Title: Phytochemical analysis of Artic Root (*Rhodiola rosea*) by HPLC/ED and GC/MS
Type of thesis: Master's
Department: Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Czech Republic
Supervisor: doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.
The year of submission: 2023

Annotation:

This study is focused on the phytochemical analysis of selected commercial products of *Rhodiola rosea* plant (*Artic Root*) using HPLC/ED and GC/MS methods.

Four commercial tinctures and two samples of dried root were tested. From the latter samples, tinctures were also prepared using traditional method of maceration in 50% ethanol for two and five weeks. All of these samples were analysed using two independent methods (HPLC/ED and GC/MS) and the results compared.

Keywords: Artic Root, bioactive compounds, chromatography, electrochemical detection, gass chromatography, high-performance liquid chromatography, history of chromatography, mass detection, phenols, phytochemistry

Number of pages: 84
Number of appendices: 0
Language: Czech

OBSAH

Přehled použitých zkratk	9
Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	13
Seznam schémat	14
1 Úvod	15
2 Cíl práce	16
3 Teoretická část	17
3.1 Historie chromatografie	17
3.1.1 Období před Cvěttem	17
3.1.2 Období Cvětových objevů	19
3.1.3 Období po Cvětovi	20
3.2 Úvod do chromatografie	22
3.2.1 Charakteristika	22
3.2.2 Klasifikace	22
3.2.3 Teorie chromatografie	22
3.2.4 Van Deemterova rovnice	22
3.2.5 Golayova rovnice	23
3.2.6 Diference mezi LC a GC technikami	23
3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	25
3.3.1 Charakteristika	25
3.3.2 Instrumentace	25
3.4 Elektrochemický detektor (ED)	28
3.4.1 Charakteristika	28
3.4.2 Typy elektrochemických detektorů	28
3.4.3 Elektroaktivní funkční skupiny	31
3.4.4 Metody ke zjištění vhodného pracovního potenciálu	31
3.5 Plynová chromatografie (GC)	33

3.5.1	Charakteristika	33
3.5.2	Instrumentace	33
3.6	Hmotnostní detektor (MS)	36
3.6.1	Charakteristika	36
3.6.2	Instrumentace	36
3.6.3	Kombinace separačních metod s MS	37
3.7	Biologicky aktivní látky	39
3.7.1	Historie.....	39
3.7.2	Charakteristika	39
3.7.3	Klasifikace a syntéza.....	40
3.7.4	Aplikace	40
3.7.5	Analýza	41
3.7.6	MAPs (Medicinal and Aromatic Plants)	41
3.7.7	Bioaktivní fenolické sloučeniny rostlin	41
3.7.8	Těkavé sloučeniny rostlin	42
3.7.9	Extrakce bioaktivních látek.....	42
3.8	Rozchodnice růžová (Rhodiola rosea).....	44
3.8.1	Popis.....	44
3.8.2	Fytochemie	45
3.8.3	Současné metody analýzy	49
4	Experimentální část	50
4.1	Úvod	50
4.2	HPLC/ED	51
4.2.1	Instrumentální vybavení	51
4.2.2	Laboratorní vybavení	51
4.2.3	Chemikálie	52
4.2.4	Zakoupené vzorky.....	52
4.2.5	Pracovní postupy	53
4.2.6	Chromatografické podmínky	54

4.2.7	Výsledky a diskuze.....	54
4.2.8	Shrnutí	63
4.3	GC/MS	64
4.3.1	Instrumentální vybavení	64
4.3.2	Laboratorní vybavení	64
4.3.3	Chemikálie	64
4.3.4	Zakoupené vzorky.....	64
4.3.5	Pracovní postupy	64
4.3.6	Chromatografické podmínky	65
4.3.7	Výsledky a diskuze.....	66
4.3.8	Shrnutí	76
5	Závěr	78
6	Seznam literatury	79

PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	Acetonitril
AD	Alzheimerova choroba
CE	Kapilární elektroforéza
CV	Cyklická voltametrie
DVB	Divinylbenzen
EI	Ionizace elektronem
EtOH	Ethanol
FIA	Injekční průtoková analýza
GC/MS	Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
HDV	Hydrodynamická voltametrie
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HMDS	Hexamethyldisilazan
HPLC/ED	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
HS	Head-space analýza
LC	Kapalinová chromatografie
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MAPs	Medicinal Aromatic Plants
MetOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
NH ₂ OH/py	Hydroxylamin v pyridinu

NMR	Nukleární magnetická rezonance
NP	System normálních fází
PDMS	Polydimethylsiloxan
PTFE	Polytetrafluorethylen
PTGC	Plynová chromatografie s programovatelnou teplotou
RP	System reverzních fází
SF	Stacionární fáze
SPME	Mikroextrakce tuhými fázemi
TFA	Trifluoroctová kyselina
WHO	World's Health Organisation

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Náhled do Rungova díla	18
Obrázek 2 – Goppelsroederova aparatura	18
Obrázek 3 – M. S. Cvět	19
Obrázek 4 – Aparatura podle Cvěta a Cvětova disertační práce	20
Obrázek 5 – Moore a Stein stojící u svého kapalinového chromatografu	21
Obrázek 6 – Instrumentace HPLC	27
Obrázek 7 – Tenkovrstvá a trysková cela	29
Obrázek 8 – Přehled snadno oxidovatelných funkčních skupin	31
Obrázek 9 – Tvar potenciálové vlny pro CV	31
Obrázek 10 – Schéma hydrodynamického voltamogramu	32
Obrázek 11 – Instrumentace GC	35
Obrázek 12 – Zjednodušené schéma syntéz biologicky aktivních látek	40
Obrázek 13 – Chemická struktura salidrosidu	47
Obrázek 14 – Chemická struktura rosavinů	48
Obrázek 15 – Chemická struktura p-tyrosolu	48
Obrázek 16 – Instrumentace HPLC/ED	51
Obrázek 17 – Zakoupené vzorky sušeného kořene	52
Obrázek 18 – Zakoupené vzorky tinktur	53
Obrázek 19 – Cyklický voltamogram p-tyrosolu	56
Obrázek 20 – Cyklický voltamogram salidrosidu	56
Obrázek 21 – Hydrodynamický voltamogram salidrosidu a p-tyrosolu	57
Obrázek 22 – Chromatogram modelové směsi	58
Obrázek 23 – Kalibrační závislost pro salidrosid	58

Obrázek 24 – Kalibrační závislost pro p-tyrosol	59
Obrázek 25 – Souhrnný chromatogram pro vzorky tinktur	60
Obrázek 26 – Souhrnný chromatogram pro 1000x zředěné vzorky K1 (2T a 5T).....	60
Obrázek 27 – Souhrnný chromatogram pro 1000x zředěné vzorky K2 (2T a 5T).....	61
Obrázek 28 – Souhrnný chromatogram pro 1000x zředěné vzorky kořene po pěti týdnech macerace	61
Obrázek 29 – Souhrnný chromatogram pro 500x zředěný vzorek K1 (5T) a spikovaný vzorek	62
Obrázek 30 – Relativní zastoupení salidroside a p-tyrosolu v jednotlivých vzorcích	63
Obrázek 31 – Chromatogramy jednotlivých tinktur pomocí HS-SPME	66
Obrázek 32 – Chromatogram vzorku E2	67
Obrázek 33 – Chromatogram vzorku E2 (přiblížený)	67
Obrázek 34 – Chromatogramy pro vzorky K1 a K2 pomocí HS-SPME	68
Obrázek 35 – Chromatogramy pro vzorky K1 a K2 pomocí HS-SPME (přiblížené)	69
Obrázek 36 – Souhrn chromatogramů jednotlivých tinktur (E1 – E4, K1 a K2).....	70
Obrázek 37 – Relativní zastoupení jednotlivých látek ve vzorcích tinktur (E1 – E4, K1 a K2)	72
Obrázek 38 – Relativní zastoupení jednotlivých látek ve vzorcích macerovaného kořene.....	73
Obrázek 39 – Chromatogram vzorku E2 po derivatizaci	74
Obrázek 40 – Výřez z chromatogramu vzorku E2 po derivatizaci a selekci iontů	75

SEZNAM TABULEK

Tabulka I – Diference mezi LC a GC technikami	24
Tabulka II – Výčet extrakčních technik pro izolaci biologicky aktivních látek z přírodních produktů	43
Tabulka III – Vybrané sloučeniny obsažené v rozchodnici růžové	45
Tabulka IV – Přepočet na molární koncentrace	54
Tabulka V – Odhady LOD a LOQ	59
Tabulka VI – Obsah látek ve vzorcích	62
Tabulka VII – Hodnoty ploch pro zásobní roztoky solidrosidu a p-tyrosolu I.....	71
Tabulka VIII – Získané plochy látek ve vzorcích K1, K2 a tinktur	71
Tabulka IX – Vypočtené hodnoty hmotnostních koncentrací pro dané látky ve vzorcích K1, K2 a tinktur.....	71
Tabulka X – Hodnoty ploch pro zásobní roztoky solidrosidu a p-tyrosolu II.....	72
Tabulka XI – Získané plochy látek ve vzorcích kořene po dvou a pěti týdnech macerace	72
Tabulka XII – Vypočtené hodnoty hmotnostních koncentrací pro dané látky ve vzorcích kořenů po dvou a pěti týdnech macerace	73
Tabulka XIII – Retenční charakteristiky a vypočtené retenční indexy pro vybrané látky..	75

SEZNAM SCHÉMAT

Schéma I – Blokové schéma instrumentace HPLC	25
Schéma II – Blokové schéma instrumentace GC	33
Schéma III – Blokové schéma instrumentace MS	36
Schéma III – Farmakologické účinky rozchodnice růžové	44

1 ÚVOD

V současné době čím dál více roste poptávka po produktech z přírodních zdrojů z důvodu jejich mnohočetných zdravotních benefitů na lidský organismus. Tato práce je zaměřena na fytochemickou charakterizaci vybraných látek obsažených v rozchodnici růžové (*Rhodiola rosea*) pomocí dvou chromatografických metod, a to HPLC/ED a GC/MS. Rozchodnice růžová je bylina pocházející z hornatých oblastí Číny a Ruska. Byly prokázány její účinky na virová onemocnění, rakovinu, Alzheimerovu chorobu, kardiovaskulární a nervový systém, dále působí na stres, úzkost, depresi, nespavost a paměť. Detailnější rozbor této problematiky lze nalézt v mé předcházející práci *Rozchodnice růžová (Rhodiola rosea) a její využití ve fytoterapii, 2021*. [1]

Práce je členěna na dvě hlavní části – teoretickou a experimentální. Teoretická část pojednává o chromatografických metodách s odkazem na historii, princip, instrumentaci a detekci. Důraz je dále kladen na popis rozchodnice růžové a v ní obsažených biologicky aktivních látek, díky kterým má tato bylina blahodárné léčebné účinky.

Experimentální část zahrnuje analýzu komerčních vzorků pomocí HPLC/ED a GC/MS. Metoda HPLC/ED byla využita k analýze dvou významných látek rozchodnice, a to salidroside a p-tyrosolu. Obě tyto látky fenolického charakteru vykazují biologickou i elektrochemickou aktivitu, což je činí vhodnými kandidáty pro použití ED. Metoda GC/MS slouží primárně k analýze látek těkavých, v této práci však byla navíc použita i pro identifikaci látek netěkavých, jež nejsou elektroaktivní.

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce je seznámit čtenáře s biologicky aktivními látkami rozchodnice růžové s důrazem na charakterizaci fytochemického profilu s využitím dvou vzájemně doplňujících se chromatografických metod. Jako další cíle byly stanoveny:

- shrnout základní poznatky o historickém vývoji chromatografie,
- popsat základní principy použitých metod (HPLC/ED, GC/MS),
- vyvinout metody vhodné k analýze analytů v rostlinném materiálu,
- aplikovat vyvinuté metody na čtyři komerčně zakoupené extrakty rozchodnice růžové pomocí technik HPLC/ED a GC/MS.

Nad rámec původního plánu byla experimentální část rozšířena o přípravu vlastního extraktu ze dvou vzorků sušeného kořene rozchodnice a jeho následnou srovnávací analýzu s komerčními produkty.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 HISTORIE CHROMATOGRAFIE

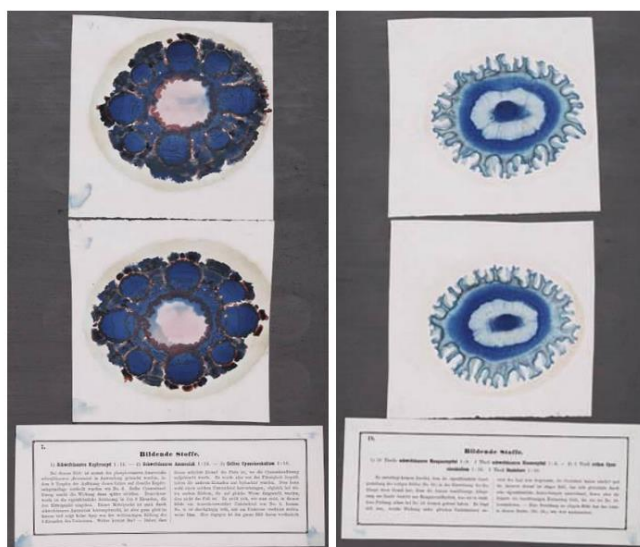
3.1.1 Období před Cvětem

Většina literárních zdrojů uvádí jako zrod chromatografie rok 1903, kdy se významnému ruskému vědci Cvětovi (dále *kap. 3. 1. 2*), podařilo separovat listová barviva na sloupci sorbentu. Z tohoto hlediska je historie chromatografie členěna na tři části: období před, během a po Cvětovi. V této kapitole jsou probrány poznatky z doby ještě před samotným Cvětem, neboli před největším chromatografickým velikánem v historii. [2]

Nejstarší záznamy o počátcích chromatografie sahají až do roku 77 př. n. l. V tomto období Caio Plínió Segundo, též známý jako Plínius Starší, vydal dílo pod názvem *Naturalis Historia*. Jednalo se o rozsáhlou encyklopedii zahrnující nejrůznější vědecké poznatky tehdejší doby. Jedním z příkladů byl test pravosti měděnky. Ten spočíval v nanesení vzorku na list papýru nasáklého blíže nedefinovaným rostlinným extraktem. V případě pravosti měděnky papýrus zčernal. Závěr jeho života byl poměrně tragický. Otrávil se toxickými plyny produkovanými sopkou Vesuv v Pompejích během zkoumání její sopečné činnosti. [2]

O zhruba 1700 let později popsal J. J. Berzelius jako první proces demineralizace slané vody, k čemuž využil filtraci skrze písek. Roku 1847 vydal italský fyzik a neurofyziolog C. Matteucci knihu pod názvem *Přednášky o fyzických jevech živých bytostí*, kde reprodukoval myšlenku Berzelia. Solný roztok zfiltraval obdobným způsobem – přes osmimetrovou trubici naplněnou pískem. Snažil se najít odpověď na otázku: *Jak je možné, že se z mořské vody skrze půdu stane sladkovodní zdroj*. [2]

Velkým přínosem pro papírovou chromatografii byl F. F. Runge, který zkoumal barevné kapaliny nanesené na kus papíru nebo látky. Vzniklé barevné obrazce (prstence) nazval *Rungovy obrazy*. Své poznatky pak uplatňoval v textilním průmyslu, kde také pracoval, přestože byl vystudovaným medikem. Vzhled stránky z jeho díla je možno vidět na **Obř. 1**. Je demonstrována na černém kartonu, přičemž v horní části stránky jsou umístěny příslušné Rungovy obrazy a pod nimi legenda. Ta zahrnuje informace o složení směsi použitých pigmentů a jejich návod k přípravě. [2, 3]

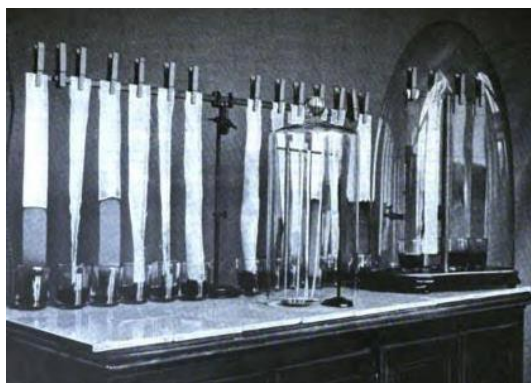


Obr. 1 – Náhled do Rungova díla [2]

Ch. F. Schönbeinovi je přisuzován objev ozónu a nitrocelulózy, k jejichž důkazu využil v roce 1891 princip papírové chromatografie. Podstata spočívala v namočení dlouhých proužků papíru do škrobového roztoku jodidu draselného. V přítomnosti ozónu se uvolnil jód a tím došlo ke vzniku charakteristického modrého zbarvení. [2, 4]

Roku 1893 L. Reed demonstruje využití jiného adsorbentu než papíru či tkaniny pro separaci barevných solí. Za tímto účelem využil práškového kaolinu umístěného v trubici. Tento poznatek vedl k myšlence separace prostřednictvím práškového materiálu v koloně. [3, 4]

Roku 1901 publikoval žák Schönbeina – F. Goppelsroeder – knihu pod názvem *Kapilární analýza*. Opět využil papírových proužků, jejichž konce byly po celou dobu experimentu namočený ve vhodném roztoku (**Obr. 2**). V důsledku toho však nedošlo ke zřetelnému oddělení složek, protože se jednotlivé zóny vzájemně překrývaly. Kdyby naněsł definované množství vzorku na papír a nechal ho vyvíjet v čistém rozpouštědle, byl by to právě on, kdo by byl považován za otce chromatografie, jak tvrdí někteří historikové. [2 – 4]



Obr. 2 - Goppelsroederova aparatura [2]

3.1.2 Období Cvětových objevů

Za předního zakladatele adsorpční chromatografie, jinak řečeno otce chromatografie, je považován ruský přírodovědec M. S. Cvět (**Obr. 3**), od něhož je odvozen i samotný název chromatografie. Z tohoto důvodu mu je zde věnováno více pozornosti. Pro vznik pojmu chromatografie existují dnes dvě hypotézy. Jedna říká, že vznikl spojením dvou řeckých slov, a to *chroma* a *graphein* znamenající v překladu *barvopsaní*. Druhá hypotéza se odkazuje na překlad příjmení tohoto chromatografického velikána. [2, 5]



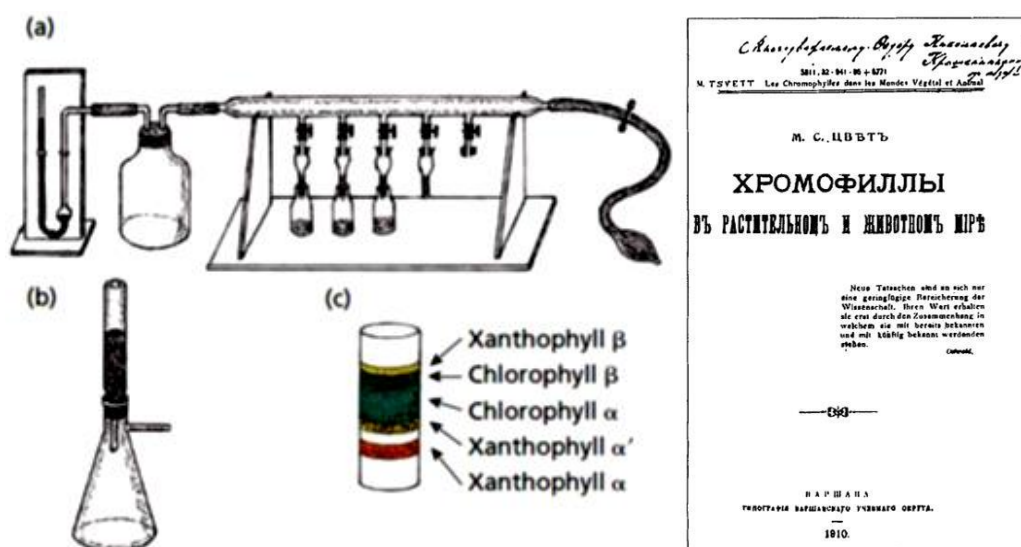
Obr. 3 – M. S. Cvět [2]

Narodil se v Itálii roku 1872. Velkou část života prožil ve Švýcarsku, kde také získal vysokoškolské vzdělání. Po úspěšném absolvování doktorátu zamířil do domoviny svého otce (do Ruska), ale vzdělání získané ve Švýcarsku mu tam nebylo uznáno. Proto musel sepsat novou disertační práci, o níž je letmá zmínka dále. Přesná příčina jeho smrti není zcela známa. Některé zdroje uvádí, že za tím stál chronický zápal hrtanu, jiné zdroje to zase přisuzují srdeční chorobě. Rok po jeho smrti, tedy v roce 1918, mu byla navrhována Nobelova cena za chemii. Přidělena mu nakonec nebyla kvůli jeho dřívějším sporům s některými členy komise. [2, 5]

Svůj život zasvětil rostlinám a fotosyntéze, proto se zaměřoval převážně na rostlinné pigmenty. Chlorofyly popsal jako skupinu látek rozpustných v alkoholu udávající rostlině její charakteristické zbarvení. Podařilo se mu separovat listová barviva na sloupci sorbentu uhličitanu vápenatého a v mobilní fázi, která představovala směs organických rozpouštědel. Jeho práce následně vedla k poznání, že listy obsahují dva různé chlorofyly (dnes známé pod označením α a β) a osm dalších pigmentů, které však byly v té době komunitou zavrženy. [2, 3, 5, 6]

Aparaturu podle Cvěta lze vidět na **Obr. 4 vlevo**. Skládá se z pryžové baňky, která zajišťuje zvýšení tlaku na koloně, čímž umožní průtok rozpouštědla skrze adsorbent. V takto připravené aparatuře jsou po nadávkování vzorku odděleny jednotlivé pigmenty.

Poté se kolona oddělí a adsorbent se nechá mechanicky odstranit z kolony. Barevné zóny jsou od sebe separovány a látky pak extrahovány z adsorbentu pomocí etheru (případně petroletheru) a ethanolu. Výsledný roztok je pak podroben perkolaci přes sloupec uhlíčitánu vápenatého. Navrhl také, že by tato metoda mohla být vhodná i pro jiné látky než jsou právě rostlinné pigmenty. Roku 1910 shrnul veškeré své poznatky do knihy pod názvem *Chlorofyly ve světě zvířat a rostlin* (**Obr. 4 vpravo**). Díky této knize obdržel titul doktora (uznávaného v Rusku) a o rok později získal za toto dílo cenu N. Achmatova od Imperiální ruské akademie věd. [2, 5]

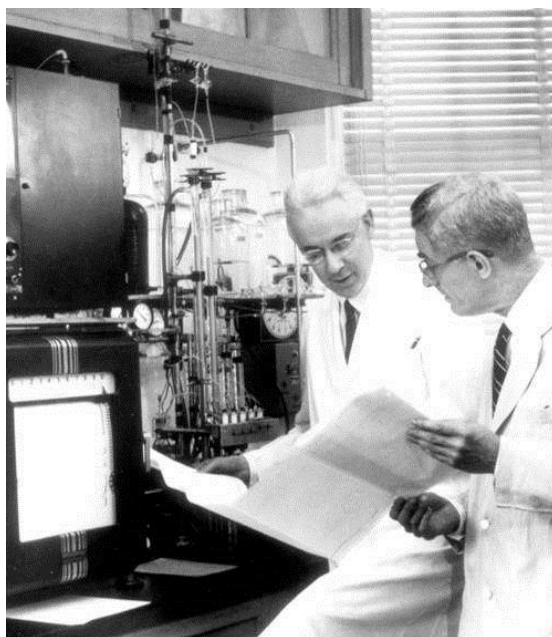


Obr. 4 – vlevo: Aparatura podle Cvěta: a) aparatura s možností zapojení až pěti kolon, b) za využití jedné kolony, c) výsledný chromatogram, **vpravo:** Cvětova disertační práce [2]

3.1.3 Období po Cvětovi

Druhým nejvýznamnějším mezníkem v oboru chromatografie je rok 1952. V tomto roce obdrželi vědci A. J. P. Martin a R. L. M. Sygne Nobelovu cenu za práci v oboru chromatografie, resp. rozdělovací chromatografie. Položili tak základ dnešní plynové chromatografie. [6, 7]

Za zakladatele prvního instrumentálního kapalinového chromatografu jsou považováni vědci Moore a Stein (**Obr. 5**). Využili ho pro analýzu aminokyselin, přesněji řečeno k objasnění aminokyselinové sekvence ribonukleázy a její prostorové struktury. Za tento přínos vědě obdrželi v roce 1972 Nobelovu cenu. [2]



Obr. 5 – Moore a Stein stojící u svého kapalinového chromatografu [2]

Od 50. let minulého století lze zaznamenat nespočet inovací nejen v chromatografii, ale i analytické chemii obecně. Je snaha metody modernizovat, aby šly tzv. s „trendem“ současné doby (rychlost, finanční nenáročnost a vyšší produktivita). Díky tomu se vyvinuly další metody, které jsou jistou modifikací klasických metod. Náleží sem například ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*UHPLC, Ultra High Performed Liquid Chromatography*) využívající lepšího hardwarového vybavení, menších částic sorbentu v koloně vedoucích k vyšším tlakům a tedy lepší účinnosti. Čím dál více se také rozvíjí superkritická fluidní chromatografie (*SFC, Supercritical Fluid Chromatography*), kde se jako mobilní fáze využívá oxid uhličitý v nadkritickém stavu. Dnes se chromatografie řadí mezi nejvíce používané techniky napříč všemi obory chemie. Lze se s ní setkat ve farmaceutickém, potravinářském, zemědělském, hutnickém průmyslu, v klinické chemii, toxikologii, dokonce i v archeologii. Díky inovacím v oblasti transportu metod se lze s nimi setkat i mimo zemský povrch. Od roku 2012 se na Marsu nachází dálkově ovládaný plynový chromatograf sloužící k analýze složení tamější půdy a atmosféry. [2, 7]

3.2 ÚVOD DO CHROMATOGRRAFIE

3.2.1 Charakteristika

Chromatografie se dnes řadí mezi nepostradatelné metody sloužící k separaci, identifikaci a stanovení velkého počtu organických a anorganických látek. Je založena na distribuci mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, a to mobilní (pohyblivá) a stacionární (nepohyblivá). Pod pojmem mobilní fáze si lze představit kapalinu (LC) nebo plyn (GC) proudící systémem, díky níž je vzorek unášen na kolonu, kde je ukotvená vhodná stacionární fáze. Podmínkou, aby byla daná separace uskutečněna, je existence fázového rozhraní. Záznamem analýzy je pak chromatogram, neboli soubor píků s různou plochou, výškou, vzdáleností, v ideálním případě symetrickým tvarem Gaussovy křivky. [8 – 11]

3.2.2 Klasifikace

Chromatografické metody lze členit podle různých kritérií. Může se rozdělovat podle typu mobilní fáze, způsobu provedení, principu separace, účelu a podle kombinace stacionární a mobilní fáze. [10]

3.2.3 Teorie chromatografie

V literatuře se uvádí celkem dva teoretické podklady pro popis chromatografického děje, a to teorie chromatografického patra a dynamická (rychlostní) teorie. [8]

O první zmiňovanou teorii se zasloužili vědci Martin a Synge roku 1941. Je založena celkem na pěti předpokladech, z nichž nejdůležitější jsou dva, a to: kolona tvořená hypotetickými patry a zanedbávání vlivu difúze mezi patry. Od této teorie se pak odvíjí i mnoho veličin, jako je například počet teoretických pater, výškový ekvivalent teoretického patra anebo účinnost. [8, 10]

Za zakladatele druhé teorie je považován van Deemter, který nadále pracuje s pojmem teoretické patro a uvádí celkem tři faktory způsobující rozšiřování zón píků, které jsou si vzájemně nezávislé a aditivní. Patří sem:

- I. vířivá (turbulentní) difúze (H_{TURB}),
- II. podélná (axiální) difúze (H_{DIF}),
- III. odpor proti převodu hmoty (příčná difúze, H_{RES}). [8, 10, 12]

Podrobněji si lze o této problematice dočíst například ve zdrojích [8, 10, 12, 13].

3.2.4 Van Deemterova rovnice

Tato rovnice je odkazem na dynamickou teorii chromatografického děje. Lze ji získat součtem jednotlivých difúzních příspěvků a jejich vhodnou úpravou. (**Rovnice 1 – 3**),

$$H = H_{TURB} + H_{DIF} + H_{RES} \quad (1)$$

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + \frac{2k}{3(k+1)^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_S} \cdot u \quad (2)$$

$$H = A + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (3)$$

kde λ je empirický faktor homogenity náplně, γ labyrintový koeficient, d_p průměrná velikost částic, u lineární průtoková rychlost, D_M difúzní koeficient rozpuštěné látky v mobilní fázi, k kapacitní faktor, d_f tloušťka filmu stacionární fáze a D_S je difúzní koeficient rozpuštěné látky ve stacionární fázi. **Rovnice 3** vyjadřuje závislost jednotlivých příspěvků na lineární průtokové rychlosti. Z toho je patrné, že člen A (H_{TURB}) není na lineární průtokové rychlosti nijak závislý. Naopak člen B (H_{DIF}) má hyperbolicky klesající závislost a člen C (H_{RES}) lineárně rostoucí. Tyto vztahy lze graficky zaznamenat a tím získat van Deemterův graf popisující závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární průtokové rychlosti (u). Křivka má tvar hyperboly s výrazným minimem odpovídající maximální separační účinnosti. Optimální průtokovou rychlost lze vyjádřit jako odmocninu podílu členu B a C. [8, 10, 13]

3.2.5 Golayova rovnice

Výše uvedené rovnice (**Rovnice 1 – 3**) platí pro náplňové kolony (tedy pro LC). Pro GC (resp. kapilární kolony) platí tzv. Golayova rovnice (**Rovnice 4**). Je pojmenována po vědci, který je vynálezcem právě těchto kolon (1958). Jedná se o modifikovanou van Deemterovu rovnici, v níž se zcela zanedbává člen A, protože kapilární kolony neobsahují kanálky, na rozdíl od kolon náplňových. Člen B je vyjádřen jako dvojnásobek difúzního koeficientu rozpuštěné látky v nosném plynu ($2D_M$) a jeho labyrintový faktor je roven jedné. Ve členu C se zanedbává sférický aspekt částic a je vyjádřen pomocí odporu proti převodu hmoty ve stacionární (C_s) a mobilní fázi (C_m). Proměnné v této rovnici představují stejné veličiny, jako jsou uvedeny výše, vystupuje zde navíc jen poloměr kolony (r_c). [8, 12, 14 – 16]

$$H = \frac{2D_M}{u} + \frac{2kd_f^2u}{3(1+k)^2D_S} + \frac{(1+6k+11k^2)r_c^2u}{24(1+k)^2D_M} \quad (4)$$

3.2.6 Diference mezi LC a GC technikami

V **Tab. I** jsou sepsány největší rozdíly mezi LC a GC technikami. Vykazují však i několik společných rysů. Obě dvě se řadí mezi chromatografické metody sloužící k separaci směsí a následné identifikaci látek. Směs je unášena mobilní fází na kolonu, kde je následně separována. [17]

Tab. I – Diference mezi LC a GC technikami [17]

	LC	GC
SF:	zejména silikagel	na bázi kapalného silikonu
MF:	kapalina	plyn
Vzorky:	netěkavé	těkavé
Uspořádání:	kolonové, planární	kolonové
Kolona/kapilára:	náplňová kolona	kapilára nebo náplňová kolona
Chromatografické podmínky:	vyšší tlak	vyšší teplota
Separace dle:	polarity molekul a složení MF	těkavosti molekul
Nejčastější detektory:	UV/VIS, ED, RID, MS	FID, TCD, MS
Teorie:	Van Deemterova	Golayova
Aplikace:	polymery, potraviny, léčiva, vitamíny, lipidy, polysacharidy, proteiny	těkavé látky, sekundární metabolity, pesticidy, mastné kyseliny, drogy, toxiny

3.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC)

3.3.1 Charakteristika

Metoda je známá pod zkratkou HPLC, která byla v minulosti překládána jako metoda vysokotlaká (*High-Pressure Liquid Chromatography*). S postupným zmenšováním částic sorbentu stacionární fáze bylo umožněno pracovat při vyšších průtokových rychlostech. Z tohoto důvodu je v současnosti upřednostňován překlad vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High-Performance Liquid Chromatography*). Jak již bylo řečeno dříve, existuje její jistá vylepšená verze, a to UHPLC (*Ultra High-Performance Liquid Chromatography*), kterou lze od firmy Waters sehnat pod obchodní zkratkou UPLC. Z názvu metody je patrné, že mobilní fází je v tomto případě kapalina. Blokové schéma této metody lze vidět na **Schématu I** a skutečnou instrumentaci pak na **Obr. 6**. V následující části je stručně rozebrána instrumentace. [8]

3.3.2 Instrumentace

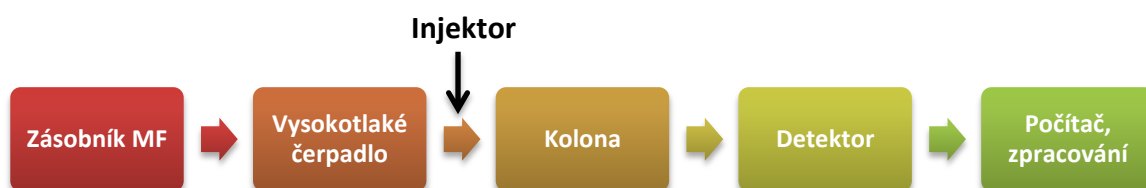


Schéma I - Blokové schéma instrumentace HPLC

Zásobník mobilní fáze

Zásobník mobilní fáze představuje nádobu o různé kapacitě. Je nutné, aby její materiál byl kompatibilní s použitými rozpouštědly (např. borosilikátové sklo pro systém RP a NP, polymery bez kovů naopak pro iontovou chromatografii). Mobilní fáze je nasávána skrze kapiláru z polytetrafluorethylenu (PTFE) s filtrační fritou. Ještě před jejím zavedením do systému je třeba řádné filtrace a odplynění (proubláním heliem, vakuovým degasserem, ultrazvukem apod.). Mechanické nečistoty mohou zanášet systém, což vede k celé řadě problémů. Bublínky rozpuštěných plynů pak hrají roli zejména v nereprodukovatelnosti průtoku, nestabilitě čerpadla a snížení citlivosti detektoru. [8, 11, 18]

Vysokotlaké čerpadlo

Mezi hlavní požadavky čerpadel se řadí: bezpulznost, kontinuální přívod mobilní fáze, schopnost vyvinout tlak až 400 barů (v případě UHPLC až 1400 barů), schopnost

umožnit průtok 0,1 – 1 ml/min a samozřejmě mechanickou a chemickou odolnost. Dnes mají největší uplatnění pístová čerpadla, proto ostatní typy zde rozebrány nejsou. [8, 11, 13, 18]

Pístové čerpadlo obsahuje dva ventily – sací a výtlačný. Otevře se sací ventil, píst je elektromotorem tlačěn dozadu a mobilní fáze nasávána do činné části. Poté se sací ventil uzavře, otevře výtlačný a díky pístu pohybujícímu se tentokrát směrem dopředu, je mobilní fáze vytlačována směrem na kolonu. Tento typ čerpadla poskytuje malý příspěvek mrtvého objemu, ovšem pracuje pulzně. Z tohoto důvodu se zavádí tlumič pulzů a druhá hlavice pracující v opačné fázi. [8]

Dávkování vzorku

Při manuálním dávkování vzorku se využívá skleněné stříkačky Hamilton, pomocí které se odebere vzorek ze skleněné vialky utěsněné gumovým septem. V současnosti se však dává přednost autosamplerům. [8, 18]

Nástřik vzorku

Nástřik vzorku do systému HPLC musí být rychlý, reprodukovatelný a přesný. Jednou z nejstarších možností nástřiku vzorku je injekční stříkačkou přímo na kolonu. Dnes se však tato technika nevyužívá z důvodu špatné reprodukovatelnosti objemů a nevhodnosti pro kvantitativní analýzu. Častý je nástřik vzorku pomocí dávkovací smyčky (šesticestný dávkovací ventil). Ta má dvě pozice: *load* a *inject*. Injekční stříkačka s požadovaným množstvím vzorku je zavedena do portu *load*, její objem vytlačen a hned poté přepnut na port *inject*. V tom momentu dojde k přehození smyček v dávkovacím ventilu a vzorek putuje na kolonu, nikoliv do odpadu. Existuje i tzv. *microliter pick-up nástřik* využívající transportní kapaliny. [8, 18]

Předkolony

Existují celkem dva typy předkolon, a to *scavenger column* a *guard column*. První zmiňovaná předkolona obsahuje silikagel a je umístěna mezi zásobníkem MF a dávkovačem vzorku. Druhý typ předkolony je mnohem častější. Nachází se před kolonou a tím ji chrání před kontaminací. [11]

Kolona

Jedná se o trubici dosahující délky 5 – 25 cm s průměrem nejčastěji 2 – 5 mm, která je naplněna stacionární fází. Probíhá v ní hlavní separační proces. [8, 11]

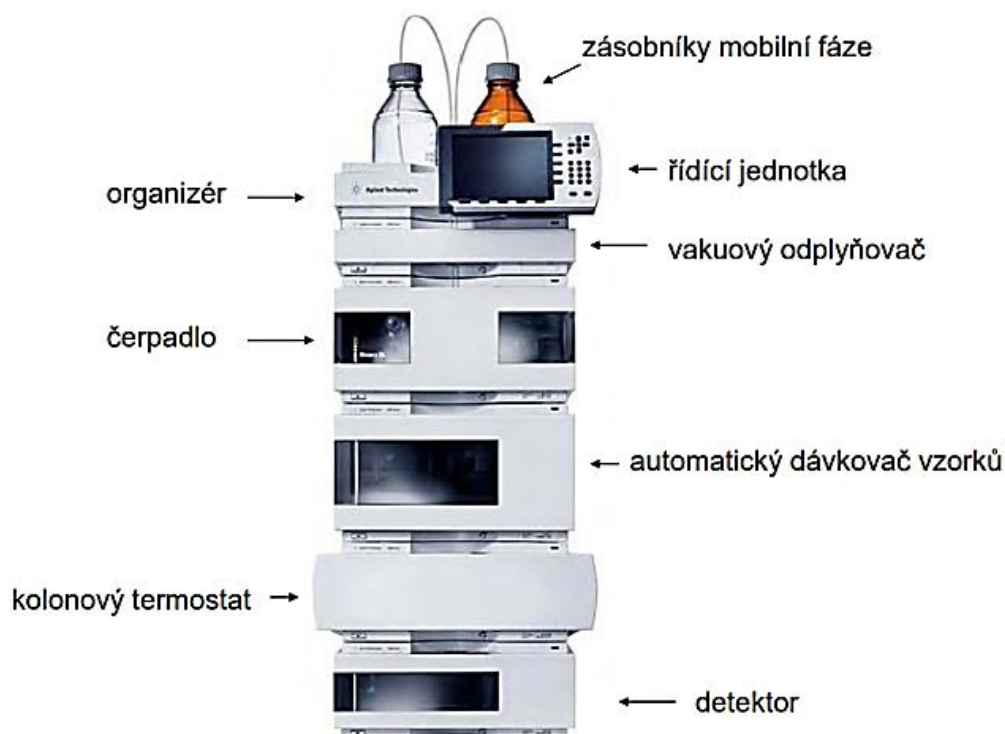
Stacionární fázi může představovat sorbent, nebo kapalina na vhodném nosiči. Mezi její charakteristiky se řadí průměrná velikost částic, jejich distribuce a tvar, měrný povrch, obsah uhlíku a typ navázaného ligandu. Nejvíce rozšířenou možností jsou chemicky

vázané fáze na bázi silikagelu. Silikagel je nejrozšířenější polární anorganický sorbent. Vykazuje dobrou mechanickou i chemickou odolnost, je však potřeba dodržet doporučený rozsah pH od výrobce (většinou od 3 do 7), jinak by mohlo dojít k jeho degradaci. Nemodifikovaný silikagel je vhodný pro systémy NP a HILIC. Ovšem až 80 % aplikací je prováděno v systému RP (nepolární SF a polární MF), který je využit i zde. V tom případě je potřeba na povrch silikagelu navázat vhodný ligand. Mezi ty nejčastější se řadí dlouhé alkylové řetězce, dioly, aromatické, aminopropylové nebo třeba kyanopropylové skupiny. [8, 11]

Detektor

V kombinaci s HPLC je možno využít mnoho typů detektorů v závislosti na cíli analýzy a povaze analytu. Ve farmaceutickém průmyslu se lze nejčastěji setkat se spektrofotometrickým a hmotnostním detektorem. V této práci bylo využito elektrochemického detektoru, o němž je zmínka v následující kapitole. [8]

Zpracování signálu, záznam, počítač



Obr. 6 – Instrumentace HPLC [19]

3.4 ELEKTROCHEMICKÝ DETEKTOR (ED)

3.4.1 Charakteristika

Elektrochemický detektor (ED) měří závislost určité elektrické veličiny (např. proudu, potenciálu, kapacity apod.) na druhé proměnné veličině (času). Změna elektrické veličiny je vyvolána průchodem elektroaktivní látky průtokovou celou v tříelektrodovém uspořádání (elektroda referenční, pracovní a pomocná). Výběr elektrody je závislý na typu daného analytu, ovšem velmi slibným materiálem se jeví skelný uhlík, který byl mj. použit i zde. Je vhodný zejména pro detekci organických látek. Vyrábí se vypalováním uhlíkové pryskyřice při vyšší teplotě, díky čemuž dojde k zuhelnatění a následnému zesklivatění. Takto vyrobený skelný uhlík má výbornou mechanickou odolnost, poskytuje dobré elektrické vlastnosti a je snadný na údržbu. [20, 21]

Tento typ detektoru vykazuje vysokou citlivost, selektivitu, přesnost, rychlou odezvu, jednoduchost, možnost snadné miniaturizace a rovněž finanční nenáročnost. Díky kombinaci voltametrických a průtokových metod (např. CE, FIA apod.) se výrazně zkracuje doba na jednu analýzu. Platí, že elektroda by měla být mechanicky stabilní, tudíž nelze použít rtuťových elektrod v kombinaci s HPLC/ED, příp. FIA/ED. V této diplomové práci jsou zkoumány nejvýznamnější elektroaktivní látky rozchodnice růžové pomocí HPLC/ED, tudíž následující dva odstavce odkazují právě na toto spojení. [8, 20 – 23]

Odezva látky na elektrodě je silně závislá na složení mobilní fáze, zejména na jejím pH. Je zde taktéž kladen větší důraz na odplynění mobilní fáze, aby bylo dosaženo stabilní nulové linie a aby byla zajištěna reprodukovatelnost výsledků. Vodně-organická mobilní fáze musí být vodivá a pokud možno s nejmenším obsahem organické složky. [8, 21]

Eluát jde z kolony a protéká přes povrch elektrody, která je udržována na vhodném potenciálu vzhledem k referenční elektrodě. Daná molekula podléhá oxidaci (redukci) vlivem přítomnosti elektroaktivní funkční skupiny. Elektrony pak putují směrem k elektrodě, kde se zaznamenává změna veličiny (proudu) a ta je pak funkcí koncentrace analytu ve vzorku. [20]

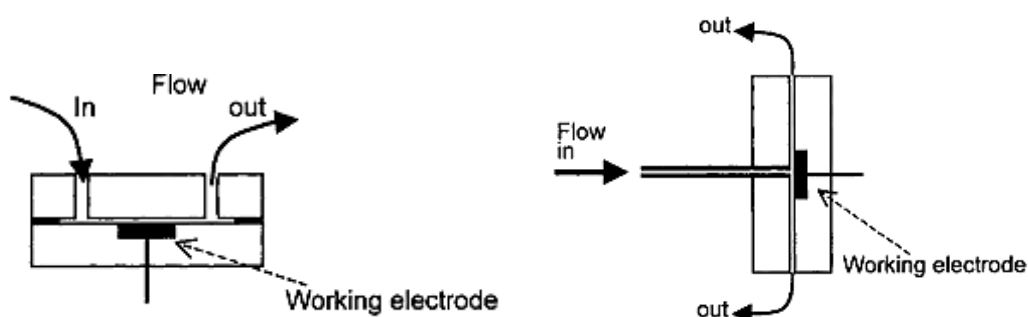
3.4.2 Typy elektrochemických detektorů

3.4.2.1 Amperometrické detektory

Amperometrický detektor zaznamenává proud, který byl vyvolán průchodem elektroaktivní látky průtokovou celou při konstantním elektrodovém potenciálu. Jen malá část eluátu omývá povrch elektrody a v důsledku toho nedochází k úplné konverzi

analytu. Daná elektrochemická reakce tedy probíhá jen v bezprostřední blízkosti elektrody a reakci podléhá méně než 10 % přítomného analytu. [20, 22]

Amperometrické detektory nabízí celou řadu výhod. Poskytují rychlé odezvy, nabízí vysokou citlivost, nízkou spotřebu vzorků a rozpouštědel a hlavně možnost využití široké škály elektrodových materiálů (skelný uhlík, uhlíková vlákna, bórem dopovaný diamant, nitrid bóru, tuhé materiály). Jejich nevýhodou naopak je, že v závislosti na různých faktorech (pH, potenciálu, typu použitého rozpouštědla apod.) lze elektrodu snadno deaktivovat nahromaděním nejrůznějších nečistot a složek. V následující části jsou popsány jednotlivé typy cel. [8, 20]



Obr. 7 – Tenkovrstvá (vlevo) a trysková cely (vpravo) [20]

Tenkovrstvá cely (thin-layer)

Tento typ cely (Obr. 7 vlevo) byl použit v prvním komerčně dostupném spojení HPLC/ED. Cely je složena ze dvou bloků, z nichž jeden obsahuje pracovní elektrodu z inertního materiálu a druhý protielektrodu z nerezové oceli. Eluát z HPLC kolony jde do cely přes vhodný mikroport a pokračuje dále úzkým otvorem přes pracovní elektrodu. Zaznamenává se změna veličiny a eluát pak odchází do odpadu. Díky snadné demontáži pro údržbu, rychlosti odezvy a finanční nenáročnosti se jeví jako výhodná volba. Problémem však může být malá plocha elektrody, vlivem které elektroda neustojí zpětný tlak po zapojení do série s jinými detektory. [20]

Trysková cely (wall-jet)

Tato cely (Obr. 7 vpravo) se poprvé objevila roku 1973 ve spojení FIA/ED. Eluát jde opět přes mikroport do cely, kde dopadá na pracovní elektrodu pod úhlem 90°. Poté pokračuje radiálně oběma směry přes povrch elektrody do odpadu. [20]

Polarografická cely

Dříve se mezi amperometrické cely zařazovala i cely polarografická. Ta však v dnešní době velké uplatnění nemá z důvodu toxicity rtuti a nevhodnosti pro průtokové

systemy kvůli stále se měnícímu tvaru kapky. Uplatnění může ovšem naléznout v redukčním módu. [20]

Tubulární cela

Zajímavostí u tubulární cely je nemožnost jejího zakoupení – je třeba si ji vyrobit. Dnes se vyskytuje velmi ojediněle z důvodu obtížného dosáhnutí velmi malých objemů pro HPLC a čištění elektrod, přestože je její konstrukce jednoduchá a hydrodynamicky dobře definovaná. [22]

3.4.2.2 Coulometrické detektory

U této skupiny detektorů se měří náboj, který je potřebný k přeměně daného analytu po průchodu celou detektorem. Zde, na rozdíl od amperometrické detekce, dochází k úplné konverzi analytu, tedy 100% proudové účinnosti (úplné elektrolýze). Jedná se o absolutní metodu, protože se zvyšující průtokovou rychlostí roste výška píku, ale jejich plocha zůstává stejná v širokém rozsahu průtokových rychlostí. Využívá se zde velkoplošných elektrod (frit), kterých může být několik za sebou. Na každou z nich je možno vložit jinou hodnotu potenciálu a tím zvýšit selektivitu detekce. [8, 20, 22]

3.4.2.3 Pulzní detekce

Jedná se o aplikaci vysokého a následně nízkého potenciálu na elektrodu v řádech milisekund. Tento typ detekce se mj. používá k přečištění elektrody. [20]

3.4.2.4 Vícenásobné detekce

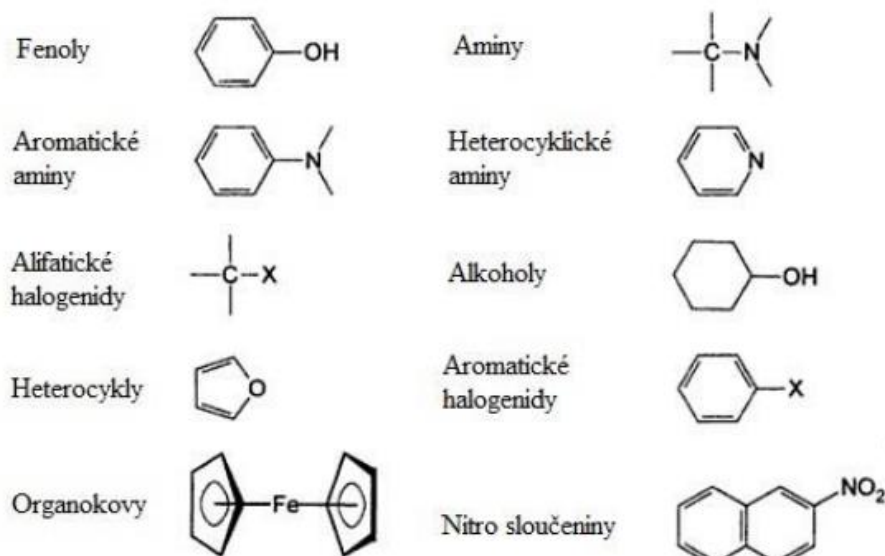
Vícenásobná detekce představuje dvě či více elektrod za sebou, které mohou být připojeny paralelně či sériově. U paralelního typu zapojení protéká eluát přes více elektrod současně, u sériového postupně. Opět platí, že na každou elektrodu může být vkládán jiný potenciál za účelem zvýšení selektivity detekce. Často se využívá 16-elektrodového systému HPLC/ED. Výsledkem je pak grafická 3D závislost retenčního času na vkládaném pracovním potenciálu. [20, 24]

3.4.2.5 Mikrodetektory a biosenzory

Mikrodetektory jsou vhodné především pro kolony s malým průměrem. Řadí se sem elektrody z uhlíkatých vláken a elektrody na bázi čipu. Předpokládá se, že tato oblast se bude v blízké době velmi intenzivně rozvíjet a zejména detektory na bázi biosenzorů, které by mohly napomáhat k rychlé diagnóze nejrůznějších chorob. Mohou například napomoci včas diagnostikovat rakovinu vaječníku [25], leptospirózu [26] či tuberkulózu [27] a mnoho dalších vážných onemocnění, kde je nutné včas zakročit. [20]

3.4.3 Elektroaktivní funkční skupiny

Při určitém potenciálu mohou látky vykazovat elektroaktivitu – schopnost elektrochemické přeměny (oxidace, redukce). Vzhledem k tomu, že tato práce je zaměřena na (poly)fenolické sloučeniny, lze na **Obr. 8** vidět významné zástupce snadno oxidovatelných funkčních skupin. [20]

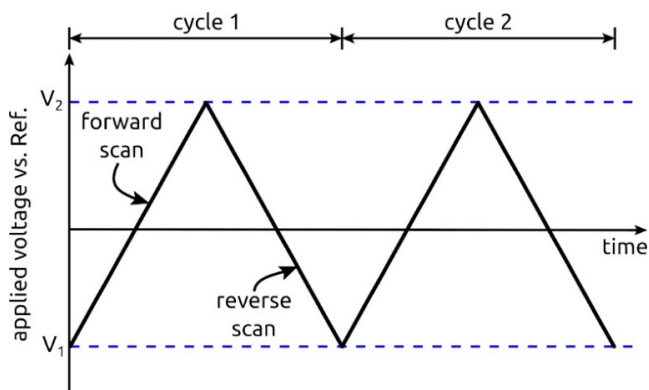


Obr. 8 – Přehled snadno oxidovatelných funkčních skupin [20]

3.4.4 Metody ke zjištění vhodného pracovního potenciálu

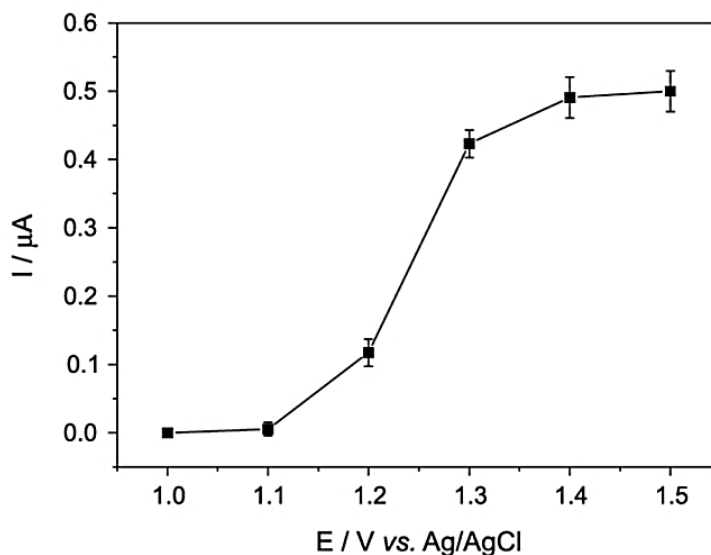
Jedním z hlavních parametrů pro optimalizaci metody HPLC/ED je volba správného pracovního potenciálu. Ten se volí tak, aby jeho hodnota byla ideální pro daný analyt, tj. aby docházelo k oxidaci (příp. redukci). Mezi metody, sloužící k získání prvotních informací o elektroaktivitě analytu je cyklická voltametrie (CV) a hydrodynamická voltametrie (HDV). Obě dvě možnosti jsou zahrnuty v experimentální části. [8, 20]

U CV se na pracovní elektrodu vkládá potenciálová vlna (**Obr. 9**) po dobu několika málo sekund a následně se daná situace převrátí. Tímto způsobem je možno přidávat cykly a sledovat, jak se daná látka chová v čase. [20]



Obr. 9 – Tvar potenciálové vlny pro CV [28]

HDV (**Obr. 10**) představuje závislost odezvy (výšky nebo plochy píku) na vkládaném pracovním potenciálu. Touto metodou lze tedy získat informace o elektroaktivitě za chromatografických podmínek, což může být v některých případech přínosnější než CV. Tam, kde nedochází k elektrochemické přeměně (potenciál není dostačující pro vyvolání elektrochemické přeměny), je proud prakticky nulový. V momentě, kdy daná látka začne vykazovat jistou elektroaktivitu, roste proudová odezva. Nejdříve roste rychle a potom zpomaluje, až dosáhne tzv. limitního proudu. Od tohoto bodu látka nepodléhá elektrochemické přeměně a proudová odezva tedy nijak zásadně neroste. Za optimální hodnotu potenciálu se volí ta, která se nachází těsně po dosažení limitního proudu. Při stanovení více analytů vedle sebe se volí podobná hodnota potenciálu, ovšem platná pro hůře oxidovatelnou (příp. hůře redukovatelnou) látku. Při použití nižšího potenciálu, než jaký je limitní proud, se zvýší selektivita detekce, protože s rostoucím potenciálem podléhá elektrochemické přeměně více látek. [8, 20]



Obr. 10 – Schéma hydrodynamického voltamogramu [29]

3.5 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE (GC)

3.5.1 Charakteristika

Jak již bylo řečeno dříve, zásluhu na GC si nesou vědci Martin a Synge (1952). Slouží k separaci látek těkavých, ovšem pokud je provedena derivatizace (převedení látek netěkavých na těkavé), je možno analyzovat i látky, kde by za normálních okolností GC nebyla metodou první volby. Mobilní fází je v tomto případě plyn. Kostra instrumentace je do jisté míry podobná instrumentaci HPLC (**Schéma II** a **Obr. 11**). [13]

3.5.2 Instrumentace

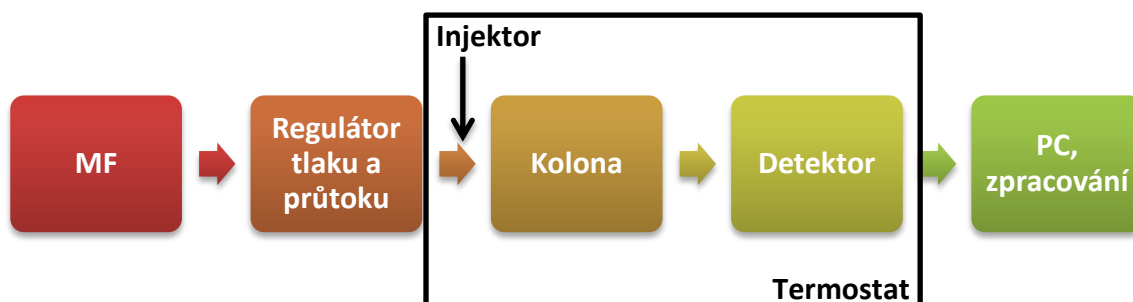


Schéma II - Blokované schéma instrumentace GC

Zdroj nosného plynu

Nosným plynem (MF) bývá nejčastěji dusík, vodík, helium či argon v závislosti zejména na typu použitého detektoru. Plyn je umístěn v tlakové láhvi o požadované čistotě, viskozitě a hustotě. Problémem mohou být organické nečistoty, kyslík a zbytková vlhkost, které lze eliminovat aktivním uhlím, katalyticky za laboratorní či zvýšené teploty a molekulovým sítem ve stejném pořadí. [11 – 14]

Regulátor tlaku a průtoku

Regulátory tlaku a průtoku mají zásadní vliv jednak na účinnost a jednak na kvalitu analýzy. Pro izotermickou analýzu postačí jehlový ventil. V případě využití teplotního programu musí být zařazen diferenční regulátor průtoku kvůli zvyšující se viskozitě plynu. K měření průtoku je možno využít polovodičového senzoru spojeného s mikroprocesorem, digitálního elektronického průtokoměru nebo mnohem jednoduššího bublinového průtokoměru. [11,14]

Dávkování vzorku

Plynné vzorky mohou být dávkovány pomocí plynotěsných stříkaček, obtokových pipet nebo dávkovacích kohoutů, kapalně vzorky pak pomocí injekčních stříkaček. U pevných vzorků je situace o něco komplikovanější. Jednou z možností je využití technik jako head-space (HS) či SPME. Druhou možností je dávkovat je stejně jako vzorky

kapalné po předchozím rozpuštění. Dále se pro dávkování vzorků využívá dávkovacích smyček, ventilů a samozřejmě autosamplerů. [14, 15]

Nástřik vzorku je uskutečněn prostřednictvím přímého nástřiku na kolonu, nástřiku s děličem nebo bez děliče (*split a splitless-mode*), PTV nástřikem a MMI nástřikem (*Multiple-Mode Inlet*) v závislosti na daném vzorku, možnostech a cíli analýzy. [14, 15]

Regulované termostaty

Teplota hraje u GC mnohem zásadnější roli než u HPLC. Zásadněji zde ovlivňuje reprodukovatelnost retenčních charakteristik. Nástřik, kolonu a detektor je tedy nutno termostatovat. Při analýze pomocí GC lze pracovat za izotermických podmínek, nebo mnohem častěji s teplotním gradientem. Výhodami tzv. PTGC (GC s programovatelnou teplotou) jsou zkrácení doby analýzy, vhodná metoda pro čištění kolony, lepší limity detekce, lepší přesnost pro více zadržované látky apod. Na druhou stranu se mezi nevýhody řadí zvýšený šum pozadí při vyšších teplotách a jen omezené množství kapalných SF zvládne odolat teplotním výkyvům. [13, 14]

Retention gap

Jedná se o nepotaženou a deaktivovanou krátkou kapiláru. Zachycuje netěkavé látky, které by za normálních okolností mohly kontaminovat kolonu a tím ji znehodnotit. Zároveň také umožňuje látky refokusovat, čímž je zajištěn lepší tvar píku. [14, 16]

Kolona

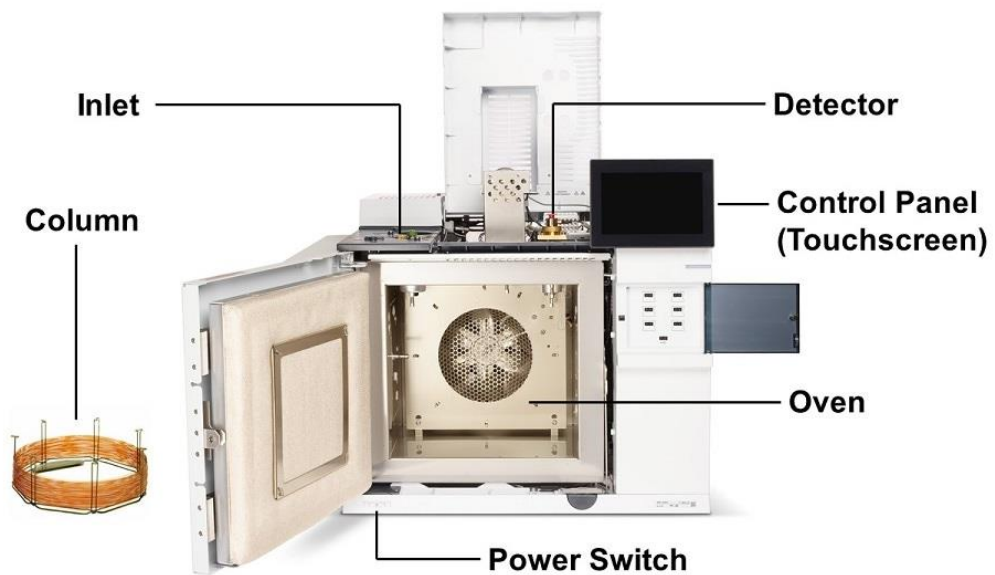
Jedná se o křemenné kapiláry dosahující délky 5 – 100 m a průměrem pod 1 mm. Hlavním parametrem kolon v GC je jejich polarita. Jsou celkem tři možné varianty, a to WCOT (kapalina zakotvena přímo na vnitřní stěně kapiláry), SCOT (kapalina zakotvená na nosiči) a PLOT (pórovitý adsorbent na vnitřní stěně kapiláry). Mezi nejčastější adsorbenty pro GSC se řadí aktivní uhlí, grafitizovaný uhlík, uhlíkatá molekulová síta, silikagel, oxid hlinitý, molekulová síta na bázi křemíku a porézní polymery. Pro GLC se dříve jako kapalina využíval skvalen, dnes se dává přednost silikonovým olejům. Podmínkou je, aby byly dané kapaliny chemicky inertní, stabilní, čisté, aby rozpouštěly analyt a měly nízkou viskozitu a těkavost. Obecně platí, čím kolona dosahuje větší délky, tím déle analýza potrvá, ale tím lepšího rozlišení se dosahuje. [11, 13 – 15]

Detektor

Existuje mnoho typů detektorů, které jsou specifické pro techniku GC. Mezi ty klasické se řadí FID (plameno-ionizační), TCD (tepelně vodivostní), ECD (detektor elektronového záchytu) apod. V praxi se lze ovšem setkat zejména s kombinací GC/MS,

kteřá mj. byla pouřžita i zde a z tohoto důvodu je právě toto spojení rozebráno v následující kapitole. [13, 14]

Zpracování signálu, záznam, počítač



Obr. 11 – Instrumentace GC [30]

3.6 HMOTNOSTNÍ DETEKTOR (MS)

3.6.1 Charakteristika

Pojmy *identifikace* a *MS* si jdou ruku v ruce. Chemická identifikace znamená ztotožnění analytu (resp. analytického signálu) s konkrétní chemickou látkou. Tento typ detektoru se vyznačuje velkou citlivostí, selektivitou, možností kombinace s chromatografickými metodami a možností charakterizace sloučenin. Proces odehrávající se v MS je rozdělen na tři části: ionizace, separace a detekce (**Schéma III**). Výsledkem je hmotnostní spektrum, představující závislost relativního zastoupení rozdělených iontů na poměru hmotnosti ku náboji (m/z). [11, 31]

3.6.2 Instrumentace

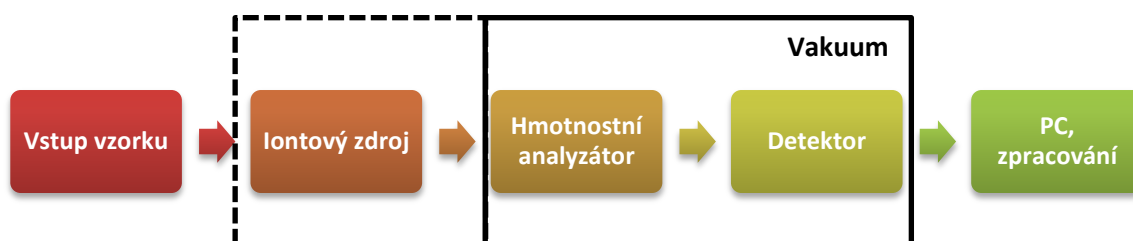


Schéma III – Blokové schéma instrumentace MS

Iontový zdroj

Ionizace molekul vzorku představuje nezbytnou a také nejvíce kritickou část analýzy. Bez ní by molekuly zůstaly v neutrální podobě, tudíž by je nebylo možné detekovat. Zároveň je třeba zvolit takový typ ionizační techniky, který bude kompatibilní s daným vzorkem a který bude vyhovovat stanovenému cíli analýzy. V případě spojení GC/MS se v drtivé většině využívá ionizace elektronem (EI), o níž je zmínka dále. [12, 15]

Princip EI spočívá v blízké interakci nízkotlakého oblaku plynu s elektrony urychlenými elektrickým polem o napětí 70 eV. Vysokoenergetické elektrony předávají část své energie molekulám analytu a tím vzniká molekulární ion (kationradikál) dle **Rovnice 5**. Vysokoenergetické elektrony jsou produkovány žhaveným vláknem z wolframu. Hodnota 70 eV je jistá konvence, protože je známo, že organické molekuly mají ionizační potenciál okolo 10 eV. Díky tomu je zajištěno, že hmotnostní spektrum sloučeniny bude vždy stejné a zásluhou toho vznikly knihovny spekter. [12, 15]



Hmotnostní analyzátozy

Nejstaršími typy hmotnostních analyzátozů jsou magnetické sektorové analyzátozy a sektorové analyzátozy s dvojitou fokusací. Separace je uskutečněna na základě

zakřivení trajektorie iontů v magnetickém poli a ta je závislá na hodnotě m/z . Velmi častým analyzátozem pro spojení MS se separačními metodami je kvadrupól (Q). Je složen ze čtyř rovnoměrně od sebe rozmístěných tyčí vytvářející tunel. Na dvě vždy protilehlé tyče je vkládáno střídavé napětí o stejné polaritě. Přepínáním polarity mezi danými dvojicemi je umožněn pohyb iontů. Tento typ analyzátoru slouží jako hmotnostní filtr, který dále propouští ionty jen o konkrétních hodnotách m/z . Iontová past (IT) je tvořena dvěma prstencovými elektrodami mající hyperbolický tvar. Díky kombinaci vysokofrekvenčního a elektrostatického pole se vytvoří potenciálová jáma, v níž jsou ionty po určitou dobu akumulovány. Po změně radiofrekvenčního potenciálu dojde k propouštění iontů směrem na detektor. Dalším analyzátozem, který je často využíván ve spojení GC/MS, je analyzátor doby letu (TOF), kde se měří doba letu iontů převážně v oblasti s nulovým elektrickým polem po dodání vhodné energie. Dále se lze setkat s iontovou cyklotronovou rezonancí (ICR) a orbitrapem. [11, 32]

Detektor

Separované ionty odchází z hmotnostního analyzátoru a dopadají na detektor, kde se generuje kaskáda elektronů a tím se vytváří signál, který se zaznamenává. [15]

3.6.3 Kombinace separačních metod s MS

Při analýze složitých směsí je vhodné analyty nejdříve separovat pomocí vhodné separační metody a až poté využít hmotnostní spektrometrii pro jejich identifikaci. Mezi zcela nejvíce propagované kombinace se řadí LC/MS a GC/MS, jak už bylo naznačeno dříve.

GC/MS

GC/MS je zkratka pro spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Jedná se o nejrozšířenější metodu pro separaci, identifikaci a kvantifikaci organických látek v komplexních matricích. Uplatnění nalezne v chemii životního prostředí, ve farmacii pro měření zbytkových rozpouštědel, v potravinářství, v průmyslové chemii, pro detekci drog na letištích, ve forenzní chemii apod. Je vhodná pro méně polární, těkavé a tepelně stabilní látky. Pro analýzu netěkavých látek se využívá procesu zvaného derivatizace, která spočívá v převedení látek málo těkavých na těkavé. Jejich separace je uskutečněna jednak na základě jejich těkavosti, jednak na základě jejich hmotnosti. [12, 14, 15]

Existují dvě hypotézy pro první oficiální spojení těchto dvou metod. První je přisuzována vědcům Holmesovi a Morrellovi (1957). V té době pracovali pro firmu Philip Morris, Inc. ve Virginii a jejich první GC/MS obdrželo označení 21-103B. Druhá, méně známá hypotéza, je přisuzována Gohlkemu a McLaffertymu, kdy v té době byly pod vedením Dow Chemical Company v Michiganu. Dodnes se historikové a vědci přou, kdo

byl vlastně tím prvním vynálezcem tohoto spojení. Podle [15] však vyplývá, že objev Gohlkeho a McLaffertyho je pravděpodobně datován o rok dříve než Holmes a Morell, uvádí však, že to nelze s jistotou potvrdit. [15]

Obě dvě techniky vyžadují, aby byl vzorek v plynném stavu, obě jsou dále zahřívány a raději pracují s malým množstvím vzorku. Nachází se zde ovšem jeden zásadní problém, který se musel technicky vyřešit. GC pracuje za atmosférického tlaku na rozdíl od MS, kde se využívá vakua. Tento problém je ladně vyřešen za pomoci separátoru mobilní fáze (kapilární kolony vyhřívané na vyšší teplotu ve vakuu) nebo přímým zavedením tenké kapilární kolony do iontového zdroje, odkud je nosný plyn odčerpán vakuovým systémem hmotnostního spektrometru. Mobilní fáze spolu se vzorkem pak prochází instrumentací GC, kde se jednotlivé složky od sebe separují, prochází přes rozhraní a dochází do iontového zdroje umístěného ve vakuu. V této kombinaci se ve velké většině využívá ionizace elektronem (EI), jejíž princip byl popsán dříve. Z molekul analytu vznikají nabitě ionty, které dále putují do hmotnostního analyzátoru (Q, IT, TOF) a signály se pak zpracovávají za vzniku hmotnostních spekter, která se porovnávají s knihovnou spekter v počítači. Ten poskytne výčet zhruba 20 látek na základě charakteristických iontů s nejvyšší pravděpodobností. [12, 14, 15]

Existuje několik modifikací pro toto spojení mimo tradiční spojení GC/MS. Před GC je možno zavést pyrolyzér a díky tomu lze sledovat průběh technologických procesů nebo jejich environmentální důsledky. Tato metoda nese označení Pyr-GC/MS. Další možností je např. tzv. „fast-GC/MS“, spočívající v aplikaci krátkých kolon, přetlaku a rychlého ohřevu. Tato kombinace umožní zkrátit dobu běžné GC/MS analýzy až 10x. [32]

3.7 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY

3.7.1 Historie

Biologicky aktivní látky (též bioaktivní látky) existovaly na Zemi ještě dříve díky rostlinám než samotné lidstvo. Lidé poté začali konzumovat různé části rostlin především pro jejich nutriční účely. Postupem času si všímali jejich blahodárných účinků a začali je využívat pro léčení nejrůznějších onemocnění či jako samotnou prevenci vůči nim. Je nutno poznamenat, že první záznamy o léčebných účincích bylin sahají až do počátků tradiční čínské medicíny, o níž je více diskutováno v mé předcházející práci. [33 – 36]

3.7.2 Charakteristika

Bioaktivní látky jsou chemické sloučeniny nalezené v rostlinách, ovoci, zelenině, olejích, oříšcích, jako jsou například vitamíny, (poly)fenoly, terpeny, alkaloidy, nukleosidy, a fytosteroly, které nabízejí medicínální účinky pro organismus. Antioxidanty se myslí látky, které inhibují oxidační stres způsobující mnoho degenerativních onemocnění, jako je například cukrovka, Alzheimerova choroba (AD), rakovina apod (viz *kap. 3. 7. 4*). [37]

Podle WHO je až 80 % populace závislá na příjmu bioaktivních látek z rostlin. Týká se to zejména rozvojových zemí, kde není dostatečně rozvinutý farmaceutický průmysl. V současnosti je snaha nahradit synteticky připravované léky přírodními, nabízející vyšší bezpečnost, nižší toxicitu a minimální vedlejší účinky. Problémem 21. století jsou finance a zisky z podeje. Přestože v posledních letech dramaticky stoupla poptávka po zdravých potravinách a kosmetice, tak ne všechny „zdravé“ produkty obsahují vše, co by jako zdravé obsahovat měly. V zájmu většiny firem není totiž zdraví populace, ale především zisk z prodeje. [33 – 38]

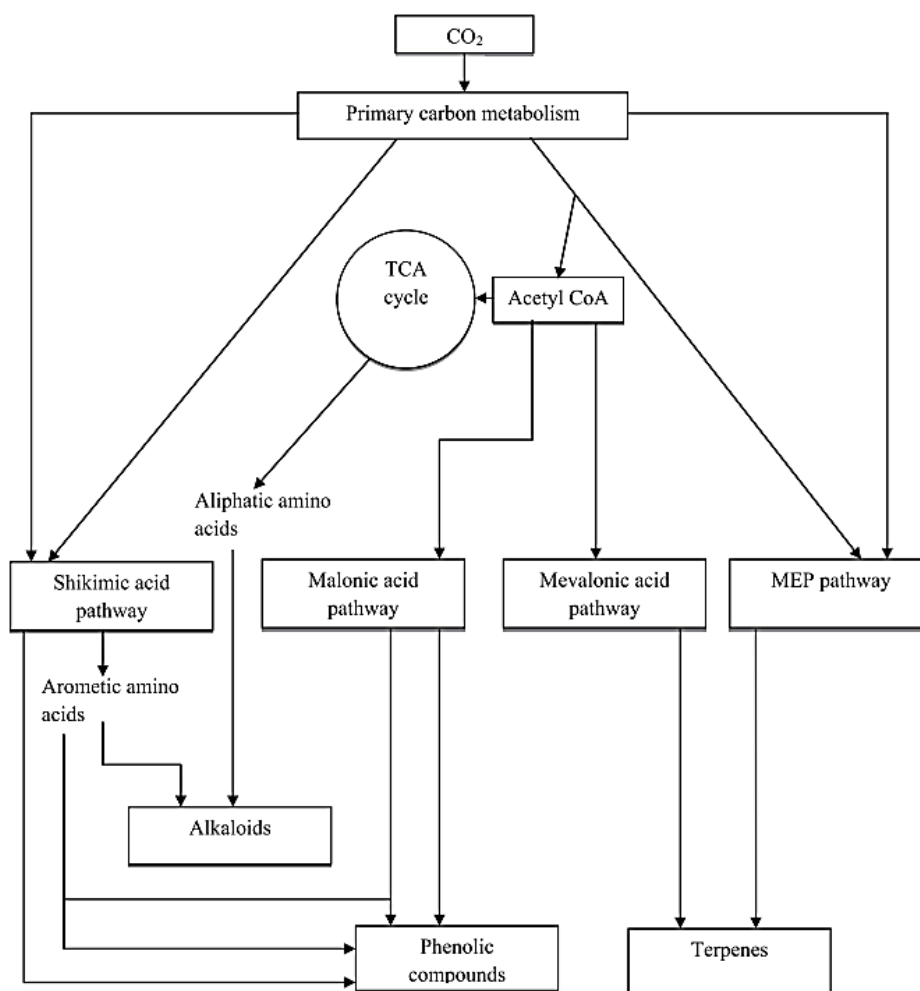
Kvůli nadměrnému užívání přírodních zdrojů pro výrobu nejrůznějších farmaceutik jsou některé rostliny v ohrožení či dokonce vyhynuté. Stačí jen uvážit, že až ¼ dostupných léků je syntetizována z rostlin. Aby se tomuto problému předcházelo, snaží se vědci po celém světě hledat alternativní cesty získávání těchto přírodních látek. [39]

Všechny sloučeniny v rostlině se klasifikují do dvou skupin: primární a sekundární metabolity. Jejich hranice však není zcela přesně definována. Obecně platí, že mezi primární metabolity se řadí aminokyseliny, polysacharidy, lipidy, proteiny, zkrátka látky, zodpovídající za růst a vývoj rostliny. Sekundární metabolity mají naopak za úkol zvýšit obranyschopnost rostlin vůči predátorům a mikroorganismům. Biologicky aktivní látky jsou tedy sekundárními metabolity, které vyvolávají toxikologické či farmakologické účinky na lidech a zvířatech. [24, 34 – 36, 40]

3.7.3 Klasifikace a syntéza

Biologicky aktivní látky se rozdělují do následujících tří skupin: (1) terpeny, (2) alkaloidy a (3) fenolické sloučeniny. [24, 35, 41]

Syntéza biologicky aktivních látek (sekundárních metabolitů obecně) je uskutečněna prostřednictvím fotosyntézy. Primární metabolismus rostlin produkuje základní látky nezbytné pro růst rostliny (mastné kyseliny, aminokyseliny, polysacharidy apod.), které mj. slouží jako prekurzory syntéz těchto látek. Jejich syntéza je uskutečněna prostřednictvím čtyř různých cest: (1) cesta šikimové kyseliny, (2) malonové, (3) mevalonové a (4) nemevalonátové. Cestou 1 a 2 je syntetizována velmi důležitá skupina látek zodpovědných za antioxidační aktivitu – fenoly. Alkaloidy jsou pak produkovány cestou 1 a terpeny pak cestou 3 a 4. Zjednodušené schéma jejich syntéz lze vidět na **Obr. 12**. [35, 40]



Obr. 12 – Zjednodušené schéma syntéz biologicky aktivních látek [35]

3.7.4 Aplikace

Vlastností biologicky aktivních látek využívají téměř všechna odvětví chemie, biologie a medicíny. Mezi nejčastější farmakologické účinky patří: antioxidační,

antiseptické, antibakteriální, stimulační a inhibiční, imunologické a antivirové. Mohou taky působit jako prevence vůči kardiovaskulárním onemocněním, rakovině [42], cukrovce, zvýšené hladině cholesterolu [43], AD, obezitě, onemocnění jater a chronickým respiračním onemocnění, mj. je o tomto tématu více pojednáno v mé předcházející práci, kde se zaměřuji na farmakologické účinky rozchodnice růžové na lidský organismus. [33, 34, 37, 38, 40, 44]

3.7.5 Analýza

Mezi nejvíce využívané instrumentální analytické metody se řadí metody elektromigrační, plošná a sloupcová kapalinová chromatografie a v neposlední řadě samozřejmě HPLC a GC. Velmi výhodná je zejména kombinace HPLC/ED, o které je pojednáno dříve. Látky s antioxidačními účinky jsou většinou (poly)fenolické povahy, tudíž budou snadno podléhat oxidaci, která se detekuje pomocí ED. K získání mnoha dalších informací pak slouží spojení se spektrálními metodami, ať už se jedná o UV/VIS, NMR, IR či MS. [40]

3.7.6 MAPs (Medicinal and Aromatic Plants)

Zkratkou MAPs jsou označeny rostliny s léčivými účinky na lidský organismus. Slouží jednak jako prevence vůči chorobám, jednak napomáhá ke zmírnění jejich projevů. Jak jednou řekl sám Hippocrattes: „*Necht' je tvé jídlo medicínou*“⁴⁰. MAPs se člení do čtyř skupin podle finální formy užití: (1) esenciální oleje, (2) koření, (3) byliny, (4) ostatní. Mezinárodní unie pro ochranu přírody a Světový fond na ochranu přírody odhadli, že se na světě vyskytuje okolo 50 000 – 80 000 MAPs, ovšem jen 10 % z nich bylo podrobeno výzkumu farmakologie. MAPs obsahují širokou škálu bioaktivních látek, jako jsou např.: (poly)fenoly, alkaloidy, flavonoidy, terpeny, steroidy, saponiny a mnoho dalších. O některých těchto skupinách je pojednáno v následující kapitole. [40]

3.7.7 Bioaktivní fenolické sloučeniny rostlin

(Poly)fenoly tvoří nejpočetnější skupinu bioaktivních fytochemikálií vyskytující se v rostlině zcela přirozeně. Mají silný antioxidační účinek, který napomáhá tělu bojovat s volnými radikály. Mohou být produkovány dvěma způsoby, jak již bylo řečeno dříve (prostřednictvím šikimové a malonové kyseliny). Skrze šikimovou kyselinu vznikají převážně fenylypropanoidy. Ovšem uvádí se ještě jedna možná cesta vzniku fenolů, a to prostřednictvím octové kyseliny. Obecně se mezi látky (poly)fenolické povahy řadí jednoduché fenoly, kumariny, lignany, flavonoidy, isoflavonoidy, anthokyaniny, proanthokyanidy a stilbeny. [35, 40, 44]

Fenolové kyseliny obsahují aromatické jádro, na kterém je navázána karboxylová skupina a jedna či více hydroxylových (příp. methoxylových) skupin. Rozdělují se na deriváty benzoové kyseliny (např. gallová, salicylová a protokatecholová) a deriváty skořicové kyseliny (kumarová, ferullová a kávová). Tvrdí se, že až 1/3 příjmu fenolických sloučenin v potravě tvoří právě fenolové kyseliny. [40, 44]

Kumariny náleží do skupiny benzo- α -pyronů. Lignany jsou obsáhlou skupinou biologicky aktivních látek, které jsou tvořené dvěma β - β -spojenými fenylypropanovými jednotkami. [40]

Flavonoidy tvoří velkou skupinu fenolických sloučenin, které jsou zodpovědné za barvu, aroma a chuť dané rostliny (příp. potraviny). Dělí se na flavony, flavonoly, flavonony a flavonoly na základě jejich oxidačního stavu centrálního pyranového kruhu. Flavony se většinou vyskytují jako glykosidy apigeninu a luteolinu a nachází se v rostlinných tkáních. Napomáhají snížit hladinu cholesterolu v krvi. Flavonoly jsou konjugovanou formou glykosidů (kaempferol, quercetin apod.). Monomerní flavan-3-oly pak zahrnují katechin, epikatechin, gallokatechin, katechingallát, epikatechingallát apod. [40, 44].

3.7.8 Těkavé sloučeniny rostlin

Těkavé sloučeniny se stejně jako (poly)fenoly podílí na aromatických vlastnostech rostlin. V rostlinách se běžně vyskytují alkoholy s rozvětvenými řetězci, které jsou výsledkem deaminace a dekarboxylace aminokyselin. Pro tzv. „zelený zápach“ rostlin jsou zodpovědné těkavé aldehydy, které jsou syntetizovány lipoxygenázovou cestou z mastných kyselin. Mezi další početné skupiny těkavých látek se řadí pyraziny, seskviterpenoidní laktony a terpenoidy. [40]

3.7.9 Extrakce bioaktivních látek

Izolace bioaktivních látek je prováděna nejrůznějšími extrakčními postupy, jejichž výčet lze vidět v **Tab. II**. Důkladněji zde budou popsány jen dvě, a to macerace a mikroextrakce tuhou fází (SPME).

V současnosti je snaha vytvářet metody, které jdou v souladu se životním prostředím, tzv. *zelená chemie*. Při tradičních extrakčních postupech bývá využíváno velké množství rozpouštědla, které následně není možné zrecyklovat a tím dochází k zatížení ekosystému. Často bývají navíc těkavá, hořlavá a toxická. Vzhledem k častému provádění extrakcí v průmyslu se jednotlivé extrakční postupy inovují a snaha je zajistit menší spotřebu rozpouštědel (příp. jejich možnost zrecyklování) a zrychlenou dobu analýzy. [39]

Macerace

Macerace patří mezi nejstarší metody extrakce vůbec. Rozemletý pevný vzorek se vloží do uzavřené nádoby spolu s vhodným rozpouštědlem a za nepřístupu světla se nechá luhovat po dobu minimálně čtyř až šesti týdnů. Po této době se směs scedí a pevné částice se slisují. Kapalina se smísí a na závěr se podrobí filtraci, aby se odstranily případné nečistoty. [35]

Mikroextrakce tuhou fází (SPME, Solid-phase Micro-extraction)

Za průkopníka této extrakční techniky je považován Dr. Janusz Pawliszyn a oficiálně byla uveřejněna roku 1992. Nejdříve se vybere vhodné vlákno (většinou křemenné vlákno o délce 1 cm s polymerem typu PDMS, PDMS/DVB). Vlákem se propíchne septum zkumavky obsahující daný vzorek a nechá se definovanou dobu sorbovat. Poté se jehla opatrně vytáhne, zavede do injektoru GC, kde je následně tepelně desorbována. Ve spojení s LC/MS slouží k analýze netěkavých a tepelně labilních látek. Vlákno se nechá v kontaktu s mobilní fází, poté dojde k sorpci a následné desorpci směrem na kolonu. [24]

Účinnost SPME je ovlivněna hodnotou pH, tloušťkou vrstvy naneseného polymeru, způsobem vzorkování, iontovou silou roztoku, teplotou vzorku a mícháním. Výhodou je, že není nutné čekat na úplné ustanovení rovnováhy, je však třeba dodržet stejnou dobu sorpce, teplotu a také hloubku ponoru vlákna ve všech analýzách. [24]

Tab. II – Výčet extrakčních technik pro izolaci biologicky aktivních látek z přírodních produktů

Název extrakční techniky	Citace
Soxhletova extrakce	[35, 45]
Macerace	[35, 45]
Destilace s vodní párou	[35]
Perkolace	[45]
Turboextrakce	[45]
Ultrazvuková extrakce (UAE)	[35, 36, 45]
Enzymatická extrakce (EAE)	[35, 36]
Mikrovlnná extrakce (MAE)	[35, 36, 45]
Extrakce pulzním elektrickým polem (PEF)	[35, 36]
Superkritická fluidní extrakce (SCFE)	[35, 36, 46]
Tlakem akcelerovaná extrakce (PLE)	[35, 36, 45]

3.8 ROZCHODNICE RŮŽOVÁ (RHODIOLA ROSEA)

3.8.1 Popis

Detailnější popis této studované rostliny je shrnut v mé předcházející práci *Rozchodnice růžová (Rhodiola rosea) a její využití ve fytoterapii (2021)*. [1]

Rozchodnice růžová (*Rhodiola rosea*) je vytrvalá sukulentní bylina s charakteristickým žlutým mnohokvětstvím dosahující výšky až 70 cm. Je jedním z hlavních představitelů tradiční čínské medicíny (TCM). Nese si celou řadu druhotných názvů, jak již bylo zmíněno v mé předcházející práci (arktický kořen, růžový kořen, zlatý kořen). Roste v hornatých oblastech na severní polokouli, zejména na území Ruska a Číny. Od roku 2012 se u nás řadí mezi kriticky ohrožené druhy. [1, 47]

Její výjimečnost tkví v mnohočetných farmakologických účincích. Největším přínosem je na poruchy centrální nervové soustavy. Byly prokázány zřetelné antidepresivní, antistresové, antioxidační účinky, účinky proti únavě, špatné náladě taktéž napomáhá ke kvalitnějšímu spánku a lepší paměti. Dokonce jsou sepsány práce, které pojednávají o blahodárných účincích tlumící projevy Alzheimerovy choroby, rakoviny a předcházení vzniku cévní mozkové příhody a kardiovaskulárních onemocnění. Dále však stojí za zmínku antibakteriální a antivirové účinky, kterých se využívalo (a stále využívá) v covidové situaci (2019 – současnost). Slouží tak k posílení imunity daného jedince. Ze stejného důvodu je přidávána do potravinových suplementů pro sportovce. K získání podrobnějších informací o medicínálních účincích na organismus poslouží například zdroje [1, 48 – 50]. Na **Schématu IV** lze vidět shrnutí nejvýznamnějších účinků na lidský organismus.

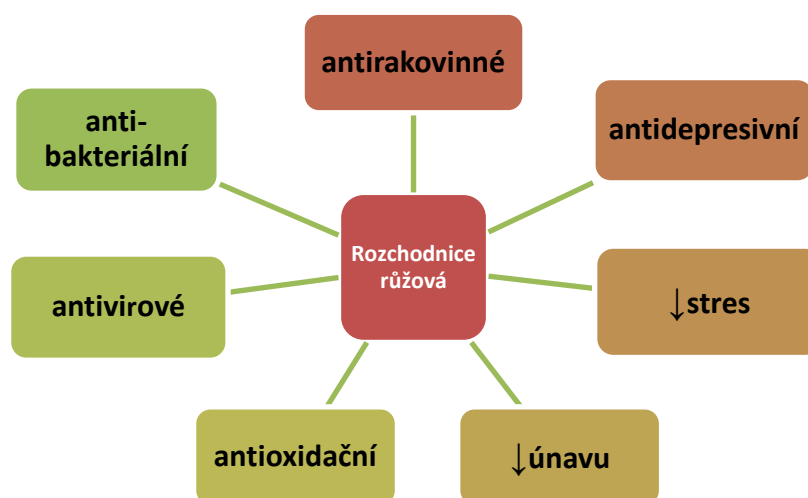


Schéma IV – Farmakologické účinky rozchodnice růžové

3.8.2 Fytochemie

Je potřeba mít na paměti, že chemické složení jakékoliv rostliny (rozchodnice nevyjímaje) je individuální v závislosti na daných přírodních podmínkách a také na samotném druhu Rhodioly. Různé literární zdroje uvádí odlišné celkové množství identifikovaných bioaktivních látek v rozchodnici růžové (průměrně okolo 150). [47]

V oddencích se vyskytují tuky, vosky, steroly, organické kyseliny, taniny a proteiny. Mezi nejdůležitější látky zodpovědné za adaptogenní aktivitu rozchodnice patří deriváty fenypropanoidu (rosaviny) a fenylethanu (p-tyrosol a salidosid). Uvádí se, že látka geraniol je zodpovědná za charakteristickou vůni po růžích. Tomu však napomáhají v rámci synergického efektu i další látky, jako je linalool a jeho oxidy, nonanal, decanal, nerol nebo cinnamylalkohol. [1, 47]

V **Tab. III** jsou uvedeni nejvýznamnější zástupci látek identifikovaných v rozchodnici pořízené metodou HPLC [48]. Sloučeniny jsou členěny do šesti tříd: deriváty acyklických alkoholů, benzylu a fenolu, fenylethanu, gallové kyseliny, fenypropanoidů a v neposlední řadě flavonoidy a jejich glykosidy. Mezi deriváty acyklických alkoholů se řadí rhodiolosid A-F a creosid. Do druhé třídy (deriváty benzylu a fenolu) náleží hydrochinon a dále například 4-hydroxymethylbenzoát. Salidosid a p-tyrosol spadají do třídy derivátů fenylethanu, o nichž je zmínka dále. Antioxidační účinek neposkytuje jen p-tyrosol, ale dále i gallová kyselina, nebo kyseliny ze třídy derivátů fenypropanoidu. Ke kyselinám se dále řadí i velmi početná skupina – rosaviny, o nichž je letmá zmínka níže. Mezi flavonoidy se řadí herbecitin, kaempferol, katechin a dále třeba epikatechin. Podrobnější údaje o fytochemickém složení všech druhů rozchodnice lze nalézt v [48].

Tab. III – Vybrané sloučeniny obsažené v rozchodnici růžové [48]

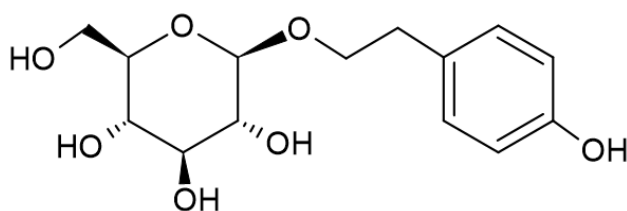
Třída	Sloučenina	Sumární vzorec
Deriváty acyklických alkoholů	(E)-Creosid I, Creosid I	$C_{14}H_{24}O_7$
	Rhodiolosid D	$C_{16}H_{30}O_8$
	Rhodiolosid E	$C_{21}H_{38}O_{11}$
	Rhodiolosid A	$C_{16}H_{28}O_8$
	(-)-Rosiridin	$C_{16}H_{28}O_7$
	Rhodiolosid B	$C_{22}H_{38}O_{12}$
	Rhodiolosid F	$C_{21}H_{36}O_{11}$
	Geranyl 6-O- α -L- arabinofuranosyl- β -D- glukopyranosid	$C_{21}H_{36}O_{10}$
	Rhodiolosid C	$C_{22}H_{38}O_{12}$

Deriváty benzylu a fenolu	Hydrochinon	$C_6H_6O_2$
	4-Hydroxymethylbenzoát	$C_8H_8O_3$
	Creosid III	$C_{18}H_{24}O_9$
Deriváty fenylethanu	p-Tyrosol	$C_8H_{10}O_2$
	Salidrosid	$C_{14}H_{20}O_7$
	Viridosid	$C_{15}H_{22}O_7$
	Mongrhosid	$C_{20}H_{30}O_{11}$
	Picein	$C_{14}H_{18}O_7$
Deriváty gallové kyseliny	Gallová kyselina	$C_7H_6O_5$
	Methylgallát	$C_8H_8O_5$
	6-O-Galloylsalidrosid	$C_{21}H_{24}O_{11}$
Deriváty fenylpropanoidu	Cinnamylalkohol	$C_9H_{10}O$
	Rosavin	$C_{20}H_{28}O_{10}$
	Rosin	$C_{15}H_{20}O_6$
	Rosarin	$C_{20}H_{28}O_{10}$
	Triandrin	$C_{15}H_{20}O_7$
	Vimalin	$C_{16}H_{22}O_7$
	p-Kumarová kyselina	$C_9H_8O_3$
	Trans-p-Hydroxyskořicová kyselina	$C_9H_8O_3$
	Kávová kyselina	$C_9H_8O_4$
	Ferulová kyselina	$C_{10}H_{10}O_4$
Chlorgenová kyselina	$C_{16}H_{18}O_9$	
Flavonoidy a jejich glykosidy	Kaempferol	$C_{15}H_{10}O_6$
	Herbacetin	$C_{15}H_{10}O_7$
	Rhodionin	$C_{21}H_{20}O_{11}$
	Rhodalin	$C_{20}H_{18}O_{11}$
	Rhodosin	$C_{27}H_{30}O_{16}$
	Rhodalidin	$C_{26}H_{28}O_{16}$
	Rhodionidin	$C_{27}H_{30}O_{16}$
	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$
	Gossypin	$C_{21}H_{20}O_{13}$
	Rhodiolin	$C_{25}H_{20}O_{10}$
	Katechin	$C_{15}H_{14}O_6$
Epikatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	

Salidrosid

Pod systematickým názvem je znám jako p-hydroxyfenylethyl-β-D-glukosid a pod triviálním jako rhodiolosid (**Obr. 13**). Jedná se o derivát fenylethanu, který má na aromatickém jádře v para poloze jednu hydroxylovou skupinu, která ho činí elektroaktivním. Z druhé strany je pak připojena cukernatá složka – glukosa. Je rozpustný ve vodě, ethanolu a n-butanolu. [1]

Představuje hlavní bioaktivní složku udávající rostlině její výjimečné farmakologické účinky. Dříve se používal pro standardizaci jednotlivých extraktů. Nyní však panuje myšlenka, že za unikátní farmakologické účinky je zodpovědno více látek současně v rámci synergického efektu. [1, 51]



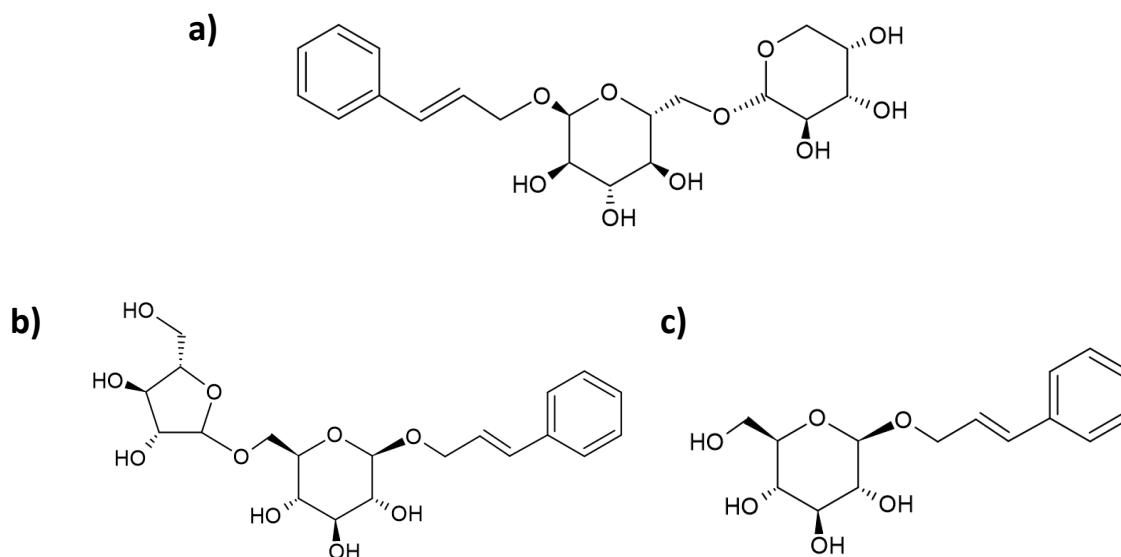
Obr. 13 – Chemická struktura salidrosidu

Kvůli dřívější intenzivní sklizni rozchodnice jsou zdroje v současnosti dosti omezené, proto je snaha přijít na alternativní způsob jeho biosyntézy. Existuje několik možných cest, z nichž každá má své pro a proti. Obecně platí, že salidrosid je syntetizován ze svého aglykonového prekurzoru (p-tyrosolu) pomocí enzymu UDP-glukosyltransferáza. Klíčová je tedy samotná syntéza p-tyrosolu. Jako nejvíce preferovanou cestou se uvádí biosyntéza z šikimové kyseliny, která po pár enzymatických krocích produkuje fenylalanin (Phe) a tyrosin (Tyr). Nelze s jistotou říci, která aminokyselina bude právě tou výchozí sloučeninou pro syntézu p-tyrosolu. V článcích však převažuje většinový názor, že pravděpodobnější se jeví cesta tyrosinu, z tohoto důvodu zde není druhá cesta rozebrána.

Tyrosin je přeměněn na tyramin prostřednictvím enzymu tyrosindekarboxyláza (TyrDC), který je dále oxidován na 4-hydroxyfenylacetalaldehyd (4-HPAA) a následně poté redukován na 4-hydroxyfenylacetalalkohol díky enzymům monoaminoxidáz a reduktáz [52, 53]. Mezi další možné cesty k získání salidrosidu se uvádí Troshenko a Juodvirshis metoda, Shi Tianyaova metoda, Wu Jinlonngova metoda, Li Zhongjun metoda, Qiu Renhuova metoda, které jsou podrobněji popsány ve článku [52]. Dále je možné salidrosid syntetizovat prostřednictvím rostlinných genů exprimujících v *Escherichia coli*. [54]

Rosaviny

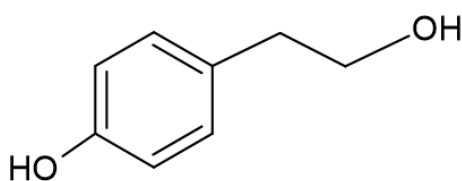
Další velmi početnou a důležitou skupinou jsou rosaviny. Do této skupiny náleží rosaviny (**Obr. 14**), rosariny a rosiny. Díky jejich struktuře se řadí do skupiny fenylypropanoidů, lépe řečeno se jedná o glykosidy cinnamylalkoholu. [53]



Obr. 14 – Chemické struktury rosavinů: a) rosavin, b) rosarin, c) rosin

p-Tyrosol

2-(4-hydroxyphenyl)ethanol (**Obr. 15**) je přírodním antioxidantem, běžně se vyskytující ve víně, olivovém oleji a také i ve zde studované rozchodnici. Vykazuje širokou škálu farmakologických účinků. [55-57]



Obr. 15 – Chemická struktura p-tyrosolu

Díky jeho ověřeným pozitivním účinkům na organismus se jeví jako vhodný kandidát pro syntézu nových léčiv. První variantou syntézy je extrakce z přírodních materiálů. Zde se však vyskytuje problém s omezenými možnostmi sběru rozchodnice. Proto se vyžaduje jeho syntetická příprava, která byla řečena dříve. Další okrajovou možností jeho syntézy je organokovová cesta a tepelná de-terc-butylace. Nejslibněji se však jeví syntéza prostřednictvím 2-fenylethanolu. [57]

3.8.3 Současné metody analýzy

Pro analýzu tak komplexních vzorků, jako jsou rostlinné extrakty, jsou nejvhodnější metody chromatografické se správně zvolenou detekční koncovkou. Díky chromatografii se jednotlivé složky od sebe separují, což by mělo ulehčit jejich identifikaci či kvantifikaci. Často se také před samotnou analýzou provádí extrakce za účelem zakoncentrování smýšlených analytů. Výčet možných extrakčních technik byl popsán v *kap. 3. 7. 9.*

Pro analýzu významných bioaktivních komponent je nejvhodnější metoda kapalinové chromatografie v různých podobách. Jak již bylo zmíněno, většina bioaktivních látek je fenolické povahy a tudíž elektroaktivní. Této vlastnosti bylo využito v práci [58], kde byl zkoumán vliv rozchodnice na depresi, buněčnou proliferaci a množství neuronů v mozovém hippocampu krys za využití binární mobilní fáze (MeOH:pufr). Velmi běžnou kombinací je taktéž HPLC s UV-Vis spektrometrií, kde byla využita jako mobilní fáze směs ACN:H₂O v poměru 1:9 v/v za isokratických podmínek [56]. Gradientové eluce pak bylo využito ve studiích [59, 60]. Gradientu bylo také použito v práci [61], ovšem tentokrát ve spojení s LC-MS/MS. Stejnou technikou pro analýzu vzorků rozchodnice se zabývali [51, 56, 62, 63]. Existují také články zahrnující planární chromatografii [51, 61, 63 – 65], nukleární magnetickou rezonanci [51, 60 – 62, 66] či samotnou hmotnostní spektrometrii [66]. Poslední zmiňovaný článek pojednává o analýze glykosidů fenypropanoidů pomocí MS, NMR a také UV metody. Po analýzu antioxidantů (nejen v rozchodnici) bylo dokonce využito kombinace HPLC s tzv. *triple* detektorem (CAD, DAD a MS detektor) [67].

Pro analýzu těkavých látek v rozchodnici pomocí GC/MS existuje celá řada článků. Pro analýzu lipofilních sloučenin [68] bylo využito kolony na bázi polyethylenglykolu, helia jako nosného plynu a spitless-mode pro nástřík vzorku. Článek [69] pojednává o analýze těkavých látek z kořene rozchodnice. Extrakce byla provedena pomocí párové destilace a HS-SPME. Článek [70] je zaměřen na charakterizaci nízkomolekulárních sacharidů a glykosidů fenypropanoidů. Za tímto účelem bylo využito derivatizace, která spočívala v oximaci (pomocí NH₂OH/py) a následné silanizaci (TMSO). Tento článek posloužil jako základ pro vývoj metody GC/MS v této diplomové práci. Byly také publikovány další studie [71 – 74], ve kterých se využívá metody GC/MS pro analýzu různých druhů rozchodnice. Je také možno využít pyrolýzní technologie za účelem analýzy zbytků z odvarů rozchodnice [75].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 ÚVOD

Cílem této studie bylo porovnat jednotlivé komerční tinktury, dále porovnat vlastní výrobu tinktury vůči zakoupeným, sledovat vliv doby macerace na účinnost tinktury a taktéž porovnat dvě chromatografické metody pro analýzu těchto vzorků.

Celá experimentální část je rozdělena na dvě kapitoly podle příslušné metody, která byla použita, tedy sekce kapalinové a plynové chromatografie.

První část (HPLC/ED) je zaměřena na analýzu dvou významných elektroaktivních komponent – salidosidu a p-tyrosolu. Nejdříve byla navrhnutá metoda pro analýzu těchto látek, kde se vycházelo z literárních zdrojů uvedených v *kap. 3. 8. 3*. Po vhodné optimalizaci metody byly jednotlivé vzorky proměřeny a zjištěno relativní zastoupení těchto látek.

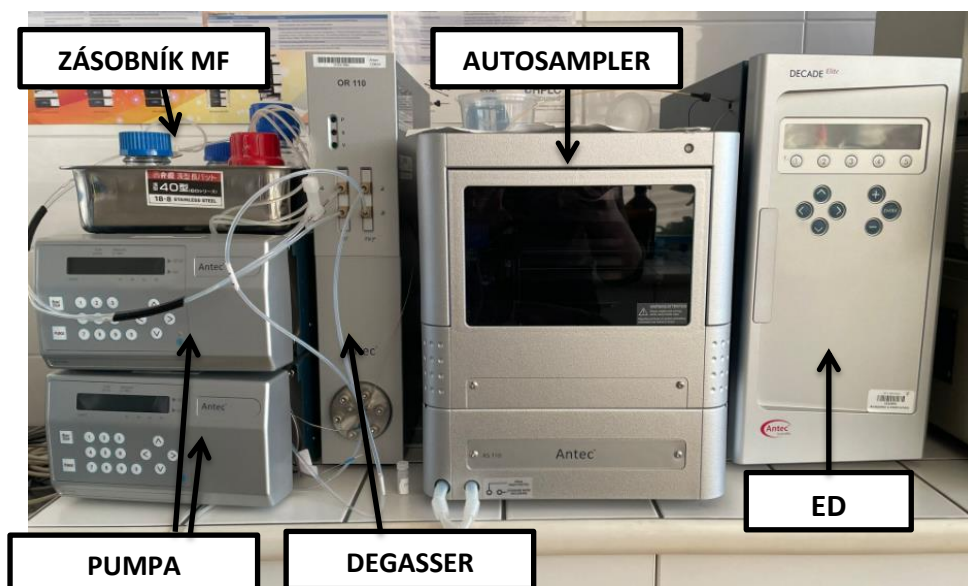
Druhá část (GC/MS) klade důraz zejména na těžké látky ve vzorcích rozchodnice a dále je doplněna o derivatizační techniky, díky nimž bylo možné detekovat hlavní komponenty (salidosid a p-tyrosol). Derivatizace navíc umožnila identifikovat početnou skupinu látek v rozchodnici – rosaviny, které nebylo možné na HPLC/ED za stanovených podmínek detekovat.

4.2 HPLC/ED

4.2.1 Instrumentální vybavení

HPLC systém (**Obr. 16**) byl složen z autosampleru AS 110, pumpy LC 110 S a degasseru ALEXYS OR 110, vše od AntecScientific, Nizozemsko. Pro detekci byl využit elektrochemický detektor DECADE Elite (AntecScientific, Nizozemsko) vybavený diskovou pracovní elektrodou ze skelného uhlíku a referentní HyREF™ elektrodou (Pd/H₂) [76]. Pro sběr, úpravu a interpretaci dat byl využit software Clarity version 8.4 (Data Apex, Česká republika).

Pro měření cyklické voltametrie byl využit potenciostat (L-Chem, Česká republika) s tužkovou pracovní elektrodou ze skelného uhlíku a referentní argentschloridovou (Ag/AgCl) elektrodou.



Obr. 16 – Instrumentace HPLC/ED

4.2.2 Laboratorní vybavení

Bylo využito pH metru (inoLab, Německo), centrifugy (Fisher Scientific, USA), analytické váhy (Mettler Toledo, USA), skleněné aparatury pro vakuovou filtraci mobilní fáze (Merck Millipore, USA) a magnetické míchačky. Pro běžné laboratorní úkony bylo dále využito: lžičky, špachtle, automatických pipet a jejich špiček, plastových vialek, skleněných vialek s víčky, nálevky, kádinky, odměrného válce, parafilmu, míchadla, injekční stříkačky se stříkačkovým filtrem (porozita 0,45 μm), odměrné baňky (500 ml), skleněných zásobníků mobilní fáze s víčky a diskového nylonového filtru (porozita 0,2 μm).

4.2.3 Chemikálie

Acetonitril (HPLC-gradient grade, Fisher Scientific, USA), methanol (HPLC-gradient grade, Fisher Scientific, USA), ethanol (HPLC-super gradient, PENTA, Česká republika), dihydrogenfosforečnan sodný (TraceSelect, Sigma-Aldrich, Německo), kyselina trihydrogenfosforečná (85%, TraceSelect, Sigma-Aldrich, Německo), standard solidrosidu (Sigma-Aldrich, Německo), standard p-tyrosolu (Sigma-Aldrich, Německo). Pro mobilní fázi byla připravena voda procesem reverzní osmózy (Millipore).

4.2.4 Zakoupené vzorky

Písmeno *K* odkazuje na vzorek sušeného kořene a písmeno *E* na vzorek extraktu. Číselná hodnota udává pořadí zakoupených vzorků a zkratky *2T* a *5T* indikují dobu macerace (2T = dva týdny a 5T = pět týdnů).

- **K1:** Rhodiola – kořen (50 g, distributor: Valdemar Grešík)
- **K2:** Rozchodnice – kořen (10 g, distributor: Bylík)
- **E1:** Rozchodnice růžová - tinktura z pupenů (50 ml, výrobce: Mgr. Jarmila Podhorná - Naděje)
- **E2:** Rhodiola – bylinné kapky (50 ml, výrobce: Valdemar Grešík)
- **E3:** Rozchodnice – tinktura z pupenů (50 ml, výrobce: Serafin)
- **E4:** Rhodiola (rozchodnice růžová) – bylinné kapky (50 ml, výrobce: Dr. Popov)



Obr. 17 – Zakoupené vzorky sušeného kořene: a) K1, b) K2



Obr. 18 – Zakoupené vzorky tinktur: a) E1, b) E2, c) E3, d) E4

4.2.5 Pracovní postupy

4.2.5.1 Příprava fosfátového pufru

Fosfátový pufr o koncentraci 25 mmol/l byl připraven navážením 1,5 g NaH_2PO_4 a rozpuštěním ve 480 ml vody. Titrací 85% H_3PO_4 byl pufr upraven na hodnotu $\text{pH} = 4$ a doplněn vodou na objem 500 ml. Následně byl vakuově přefiltrován za využití mikrofiltru o porozitě 0,2 μm .

4.2.5.2 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla připravena smícháním adekvátních objemových množství rozpouštědel (v/v) a jejich následným probubláním heliem pro odstranění rozpuštěného plynu. Pokud není uvedeno jinak, byla používána mobilní fáze o složení ACN:fosfátový pufr v poměru 15:85 (v/v, kap. 4. 2. 7. 1).

4.2.5.3 Příprava standardů a podmínky jejich uchování

Pro přípravu zásobního roztoku salidroside byl navážen 1 mg jeho standardu, který se rozpustil v 1 ml směsi $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ v poměru 1:1 v/v ($c_m = 1 \text{ mg/ml}$). Pro přípravu pracovního roztoku byl tento zásobní roztok sonikován a následně 100x zředěn mobilní fází ($c_m = 0,01 \text{ mg/ml}$). Zásobní a pracovní roztok p-tyrosolu byl připraven stejným způsobem. Veškeré standardy byly uchovány v mrazáku při teplotě $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.5.4 Výroba vlastní tinktury

Bylo naváženo 20 g vzorku K1 a 5 g vzorku K2. Oba vzorky umístěné zvlášť ve skleněné nádobě se převrstvily pětinasobkem extrakční směsi $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v). Poté byly vzorky uzavřeny, utěsněny parafilmem a umístěny do tmy, kde se nechaly po dobu dvou a pěti týdnů extrahovat.

4.2.5.5 Zpracování vzorků před HPLC analýzou

Komerční i vlastní tinktury byly před samotnou analýzou přefiltrovány přes nylonový stříkačkový filtr (porozita 0,45 μm) a poté 5x zředěny mobilní fází.

4.2.5.6 Příprava kalibrační řady

Pro potřeby kalibrace metody byly připraveny tři sady kalibračních roztoků pro oba standardy metodou postupného ředění v rozsahu $c_m = 0,07 - 1 \mu\text{g/ml}$. V **Tab. IV** je zahrnut přepočítání hmotnostních koncentrací na molární pro jednotlivé kalibrační roztoky. Molární hmotnost salidrosidu činí 300,30 g/mol a pro p-tyrosol odpovídá 138,16 g/mol.

Tab. IV – Přepočítání na molární koncentrace

	Salidrosid	p-Tyrosol
$c_m (\mu\text{g/ml})$	$c (\text{mol/l})$	$c (\text{mol/l})$
0,07	$2,33 \cdot 10^{-7}$	$5,07 \cdot 10^{-7}$
0,10	$3,33 \cdot 10^{-7}$	$7,24 \cdot 10^{-7}$
0,20	$6,66 \cdot 10^{-7}$	$1,45 \cdot 10^{-6}$
0,40	$1,33 \cdot 10^{-6}$	$2,90 \cdot 10^{-6}$
0,70	$2,33 \cdot 10^{-6}$	$5,07 \cdot 10^{-6}$
1,00	$3,33 \cdot 10^{-6}$	$7,24 \cdot 10^{-6}$

4.2.6 Chromatografické podmínky

- průtok: 0,3 ml/min
- MF: ACN:fosfátový pufr (15:85, v/v)
- kolona C₈ NUCLEODUR GRAVITY (5 μm , 250 mm x 2,0 mm I.D., MACHERY NAGEL)
- nástřík 20 μl , partial-loop fill
- teplota kolony: 35 °C
- deponovaný potenciál na pracovní elektrodě: 0,8 V (vs. Pd/H₂)

4.2.7 Výsledky a diskuze

Vzhledem k mé dřívější práci [1] jsou zde uvedeny pouze tři optimalizační postupy, které jsou členěny do dvou kategorií: optimalizace podmínek pro separaci (MF, SF) a detekci (deponovaný pracovní potenciál). Veškeré optimalizační postupy byly prováděny s pracovními roztoky standardů (*kap. 4. 2. 5. 3*).

4.2.7.1 Optimalizace podmínek pro separaci

Optimalizace MF

Byl studován vliv složení mobilní fáze na separaci salidroside a p-tyrosolu. Ve všech případech bylo využito fosfátového pufru jako vodná složka mobilní fáze, jiné anorganické soli testovány nebyly. Z důvodu nutnosti jeho vysoké čistoty pro elektrochemickou detekci nebyla nutná jeho optimalizace. Byl zkoumán pouze vliv obsahu a typu organického modifikátoru v mobilní fázi (ACN, MeOH).

Samotné optimalizaci byl podroben pouze ACN. Přestože se jedná o dražší a více toxickou variantu pro životní prostředí, poskytuje lepší účinnost separace. Je to způsobeno tím, že se viskozita směsi ACN:H₂O snižuje se zvyšujícím se jeho podílem. Na rozdíl od směsi MeOH:H₂O mající maximální viskozitu okolo 40 % MeOH. Směs ACN:H₂O navíc v systému RP poskytuje mnohem lepší rozpustnost pro soli. Dále obecně platí, že látky s velkými polárními skupinami (fenoly) mají vyšší afinitu k ACN. Na základě těchto poznatků a na základě čerpaných literárních zdrojů uvedených v *kap. 3. 8. 3* byl vybrán ACN jako organické rozpouštědlo do mobilní fáze s jeho přidávkem 5 %, 6 %, 12 % a 15 %. [21]

Byl však testován vliv selektivního příspěvku MeOH jako druhého organického rozpouštědla v mobilní fázi ACN:MeOH:fosfátový pufr 5:5:90 (v/v). Ovšem tato ternární mobilní fáze nebyla z hlediska selektivity přínosná, z tohoto důvodu nebyla dále uvažována. Za optimální složení mobilní fáze byla tedy zvolena směs ACN:fosfátový pufr (15:85, v/v), která poskytovala dobrou separaci analytů za přijatelnou dobu analýzy.

Optimalizace SF

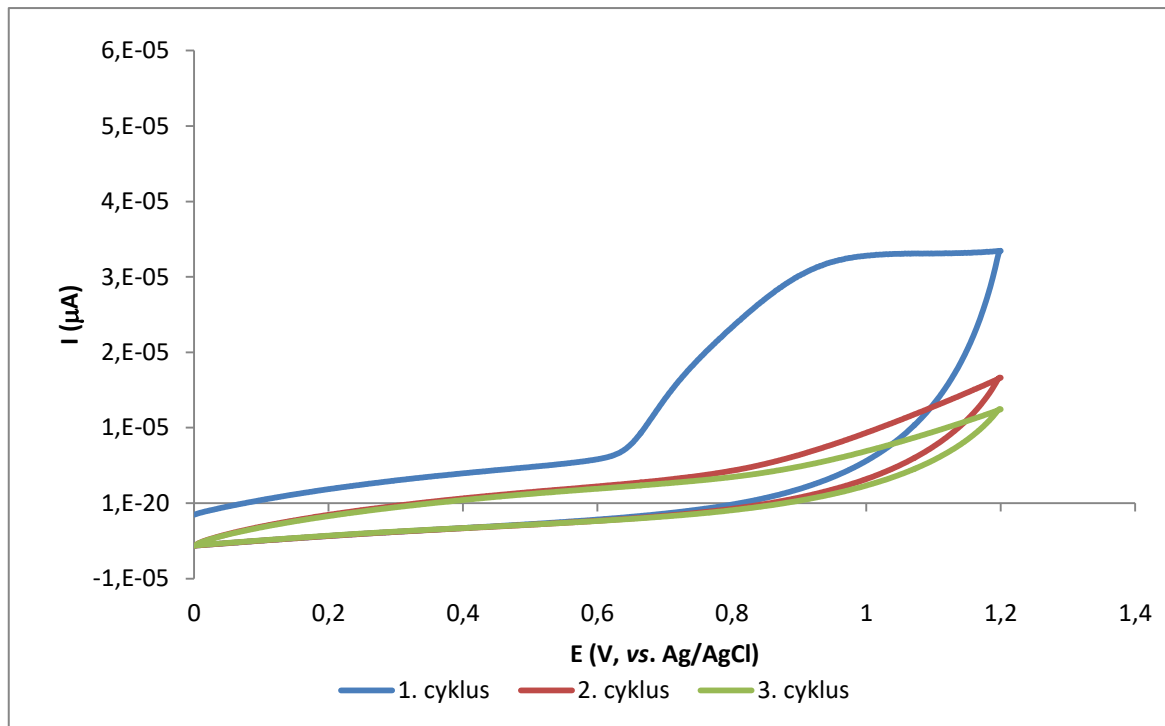
V literárních zdrojích (*kap. 3. 8. 3*) se pro separaci těchto látek vychází především ze dvou typů reverzních kolon (C₈ a C₁₈). Testováno bylo hned několik kolon tohoto druhu. Dobré výsledky za izokratických podmínek poskytla kolona C8 NUCLEODUR GRAVITY (5 μm, 250 mm x 2,0 mm I.D., MACHERY NAGEL), proto byla zvolena za optimální typ kolony.

4.2.7.2 Optimalizace podmínek pro detekci

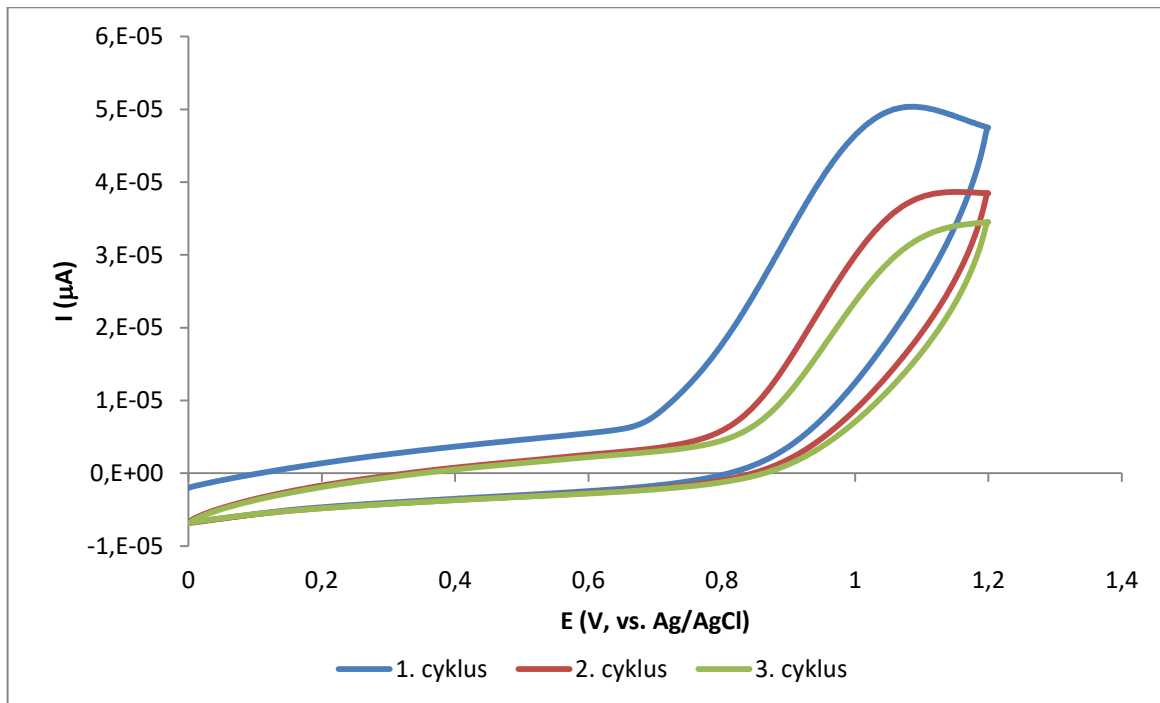
Za účelem optimalizace pracovního potenciálu byla nejdříve provedena cyklická voltametrie (CV) se záměrem studia obecného elektrochemického chování látek. Ze stejného důvodu byl následně získán taktéž hydrodynamický voltamogram (HDV).

Výsledky z CV lze vidět na **Obr. 19 a 20**. Pracovní potenciál byl vkládán v rozsahu 0 – 1,2 V (vs. Ag/AgCl) ve třech po sobě jdoucích cyklech. Z **Obr. 19** vyplývá, že polymerní produkty p-tyrosolu pasivují elektrodu, protože na rozdíl od průtokového měření je zde kontakt pracovní elektrody s p-tyrosolem je podstatě delší. Tato situace v případě salidroside nenastává (**Obr. 20**) pravděpodobně díky objemnému cukernému zbytku

nacházející se v p-poloze. Vhodným oxidačním potenciálem byla zvolena hodnota 1,1 V (vs. Ag/AgCl).



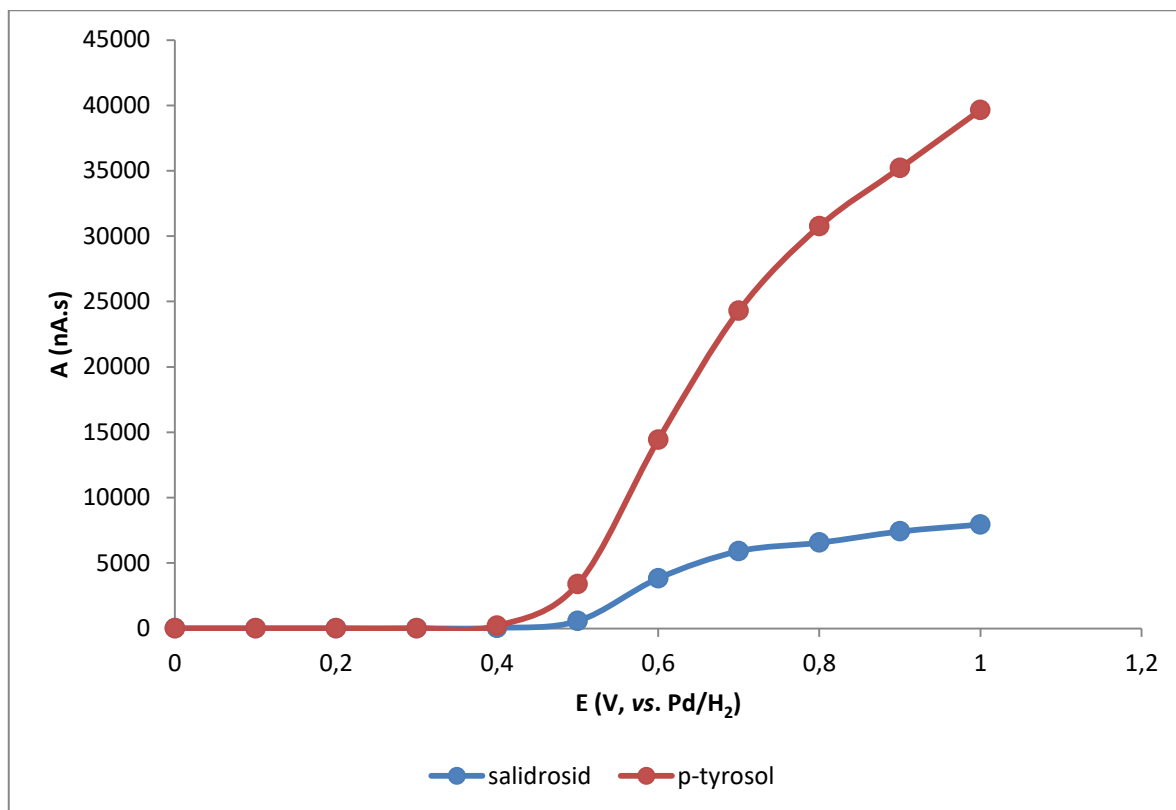
Obr. 19 – Cyklický voltamogram p-tyrosolu



Obr. 20 – Cyklický voltamogram solidrosidu

V případě HDV bylo měřeno v rozsahu 0 – 1 V (vs. Pd/H₂). Z Obr. 21 je patrné, že látky do potenciálu 0,3 V nepodléhají oxidaci. Při překročení hodnoty potenciálu 0,4 V se obě látky začínají oxidovat. Za optimální hodnotu deponovaného pracovního potenciálu

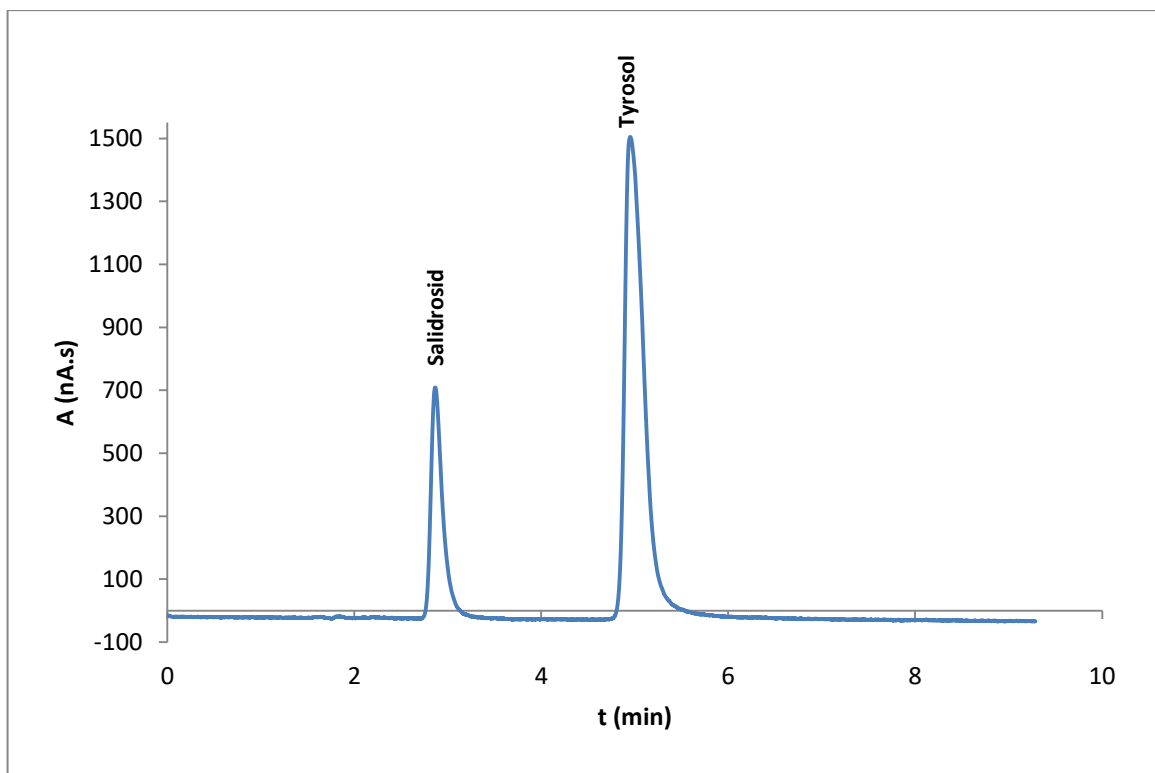
byla zde zvolena hodnota 0,8 V (vs. Pd/H₂), se kterou (pokud není uvedeno jinak) bylo dále nakládáno. Tato hodnota odpovídá optimálnímu potenciálu získaného metodou CV při přepočtu na stejnou referenční elektrodu. Vyšší hodnoty potenciálu by přinesly jen malé zvýšení odezvy pro analyty a snížily by selektivitu detekce.



Obr. 21 – Hydrodynamický voltamogram salidroside a p-tyrosolu

4.2.7.3 Analýza modelové směsi

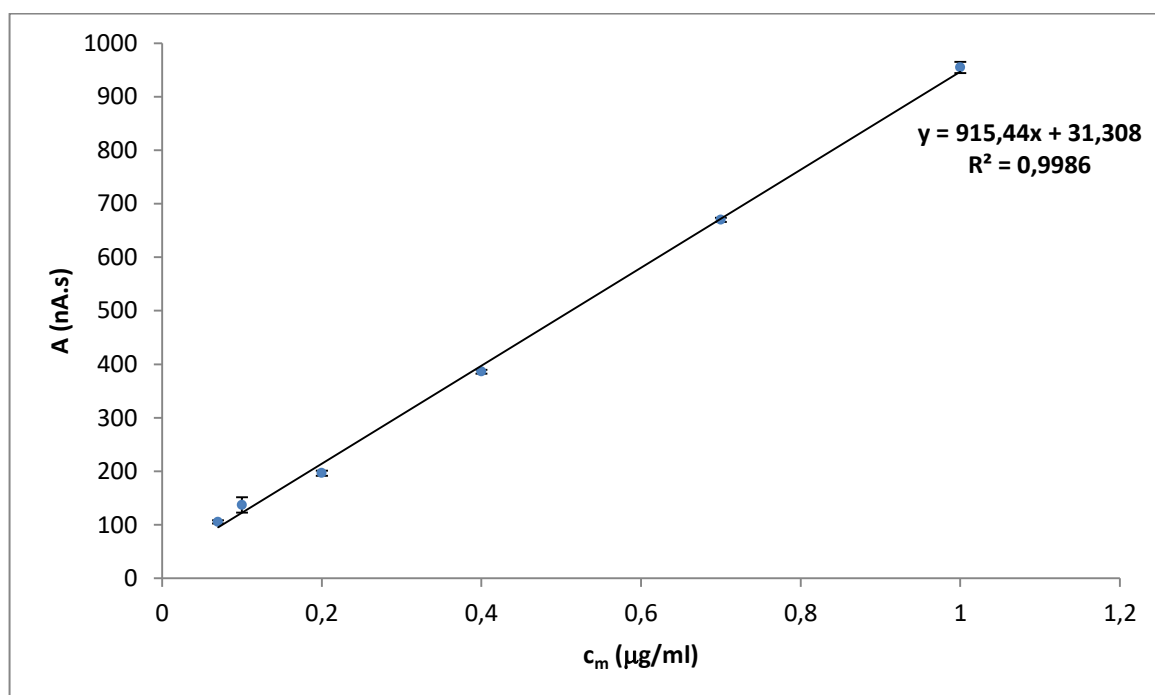
Výsledné optimalizované podmínky byly aplikovány na modelovou směs představující pracovní roztok salidroside a p-tyrosolu současně (Obr. 22). Retenční čas salidroside činil 2,8 min a pro p-tyrosol 4,8 min.



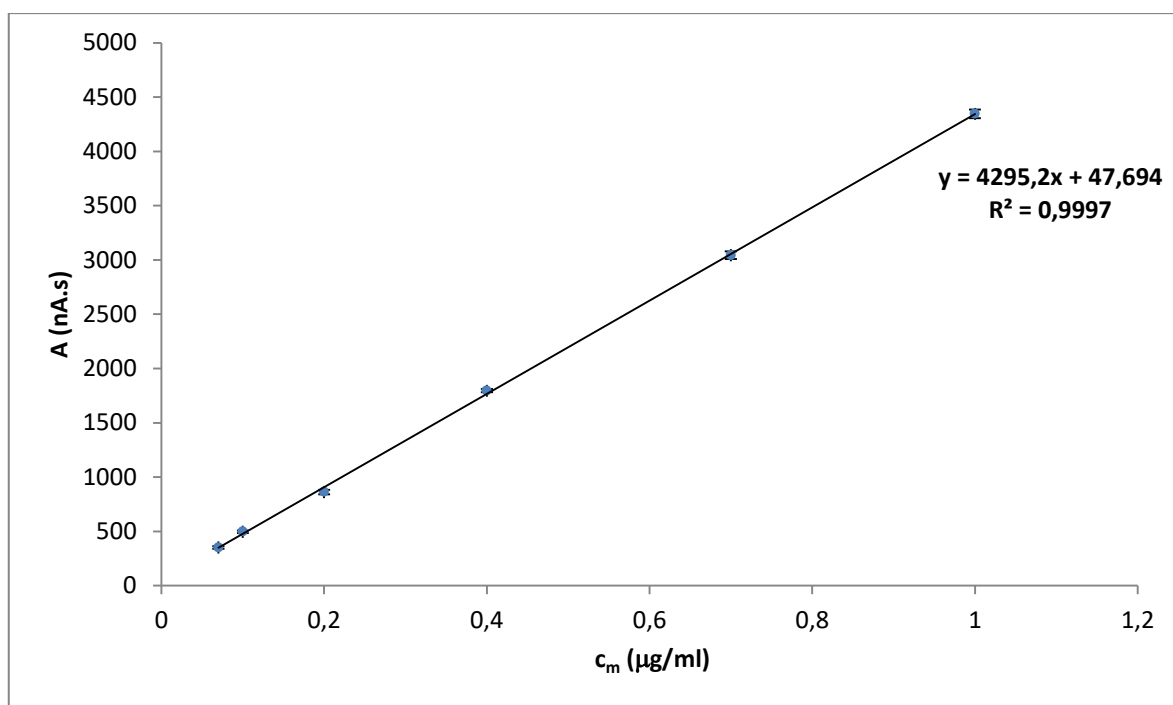
Obr. 22 – Chromatogram modelové směsi

4.2.7.4 Kalibrace, LOD, LOQ

Byla provedena kalibrace s roztoky dle postupu v *kap. 4. 2. 5. 6.* Všechny kalibrační body byly změřeny 3x. Z těchto dat byl pro každou koncentraci vypočten průměr ploch, směrodatná odchylka a z nich dále sestavena kalibrační závislost (**Obr. 23 a 24**).



Obr. 23 – Kalibrační závislost pro salidroside



Obr. 24 – Kalibrační závislost pro p-tyrosol

Součástí kalibračního procesu byly také odhady LOD a LOQ pro obě látky, které byly vyhodnoceny jako trojnásobek výšky šumu pro LOD ($= (3 \cdot \sigma) / b_1$) a desetinásobek pro LOQ ($= (10 \cdot \sigma) / b_1$). Výška šumu činila 1 nA. Z kalibrační řady na základě výšek píků pro obě látky byly následně zjištěny jejich hodnoty (Tab. V). [77]

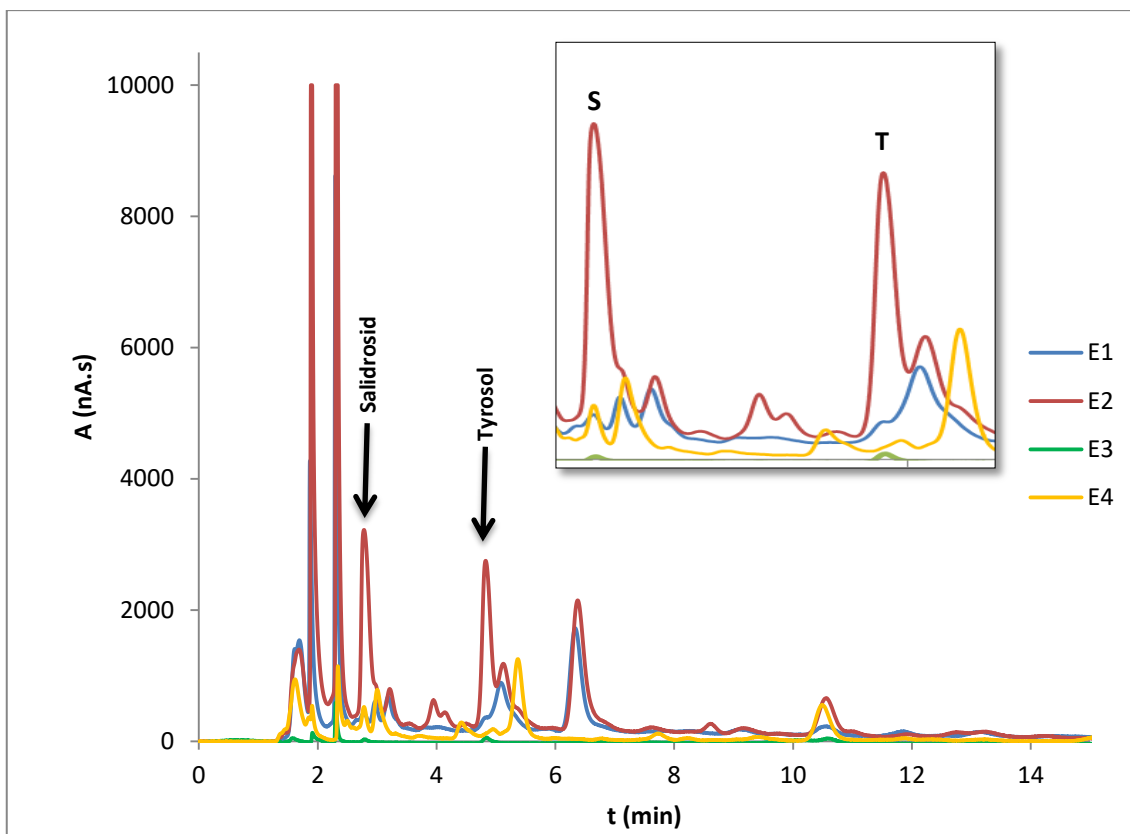
Tab. V – Odhady LOD a LOQ

	Salidrosid	p-Tyrosol
	c (mol/l)	c (mol/l)
LOD	$4,99 \cdot 10^{-8}$	$4,47 \cdot 10^{-8}$
LOQ	$1,66 \cdot 10^{-7}$	$1,49 \cdot 10^{-7}$

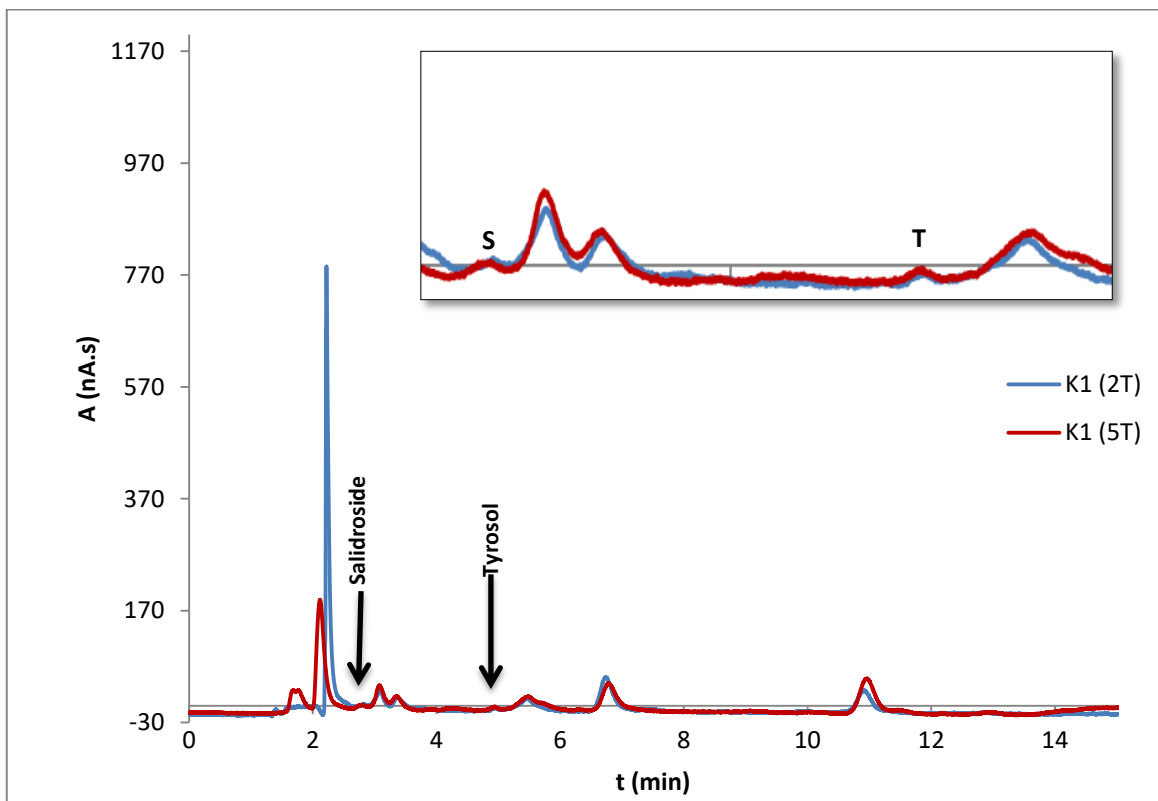
4.2.7.5 Analýza reálných vzorků

Vyvinutá metoda byla aplikována na reálné vzorky. Jednotlivé vzorky připravené dle kap. 4. 2. 5. 5. byly změřeny a případně dále zředěny na koncentraci tak, aby spadala do kalibračního rozsahu.

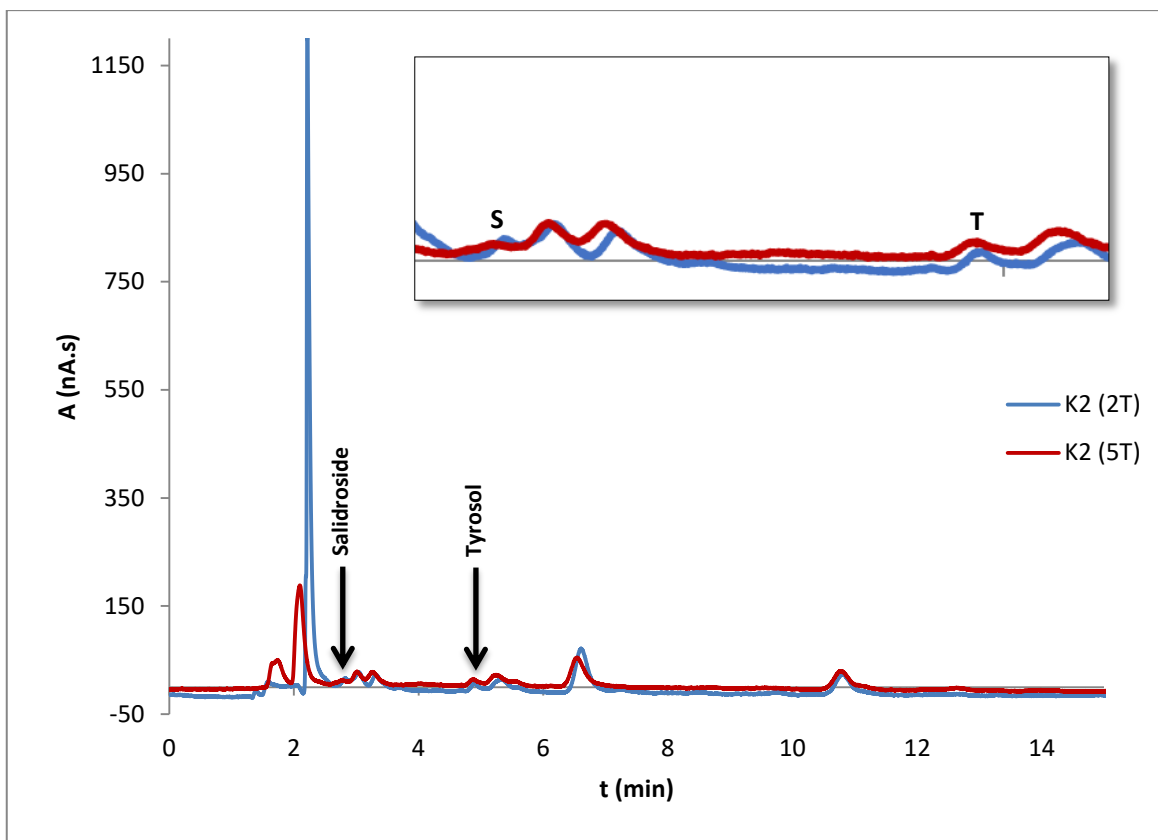
Na Obr. 25 lze vidět souhrnný chromatogram jednotlivých tinktur. Obr. 26 obsahuje výsledný chromatogram vzorků kořene K1 po dvou a pěti týdnech macerace, Obr. 27 pak náleží vzorku K2. Obr. 28 porovnává vzorky kořene po pěti týdnech macerace mezi sebou. Vzhledem k tomu, že nebyl k dispozici hmotnostní detektor, muselo být provedeno spikování vzorků pro možnost jejich identifikace (Obr. 29). To bylo provedeno smícháním 5 µl přefiltrovaného vzorku K1 (5T) s 2,5 µl zásobních roztoků salidroside a p-tyrosolu a doplněno MF do 1 ml.



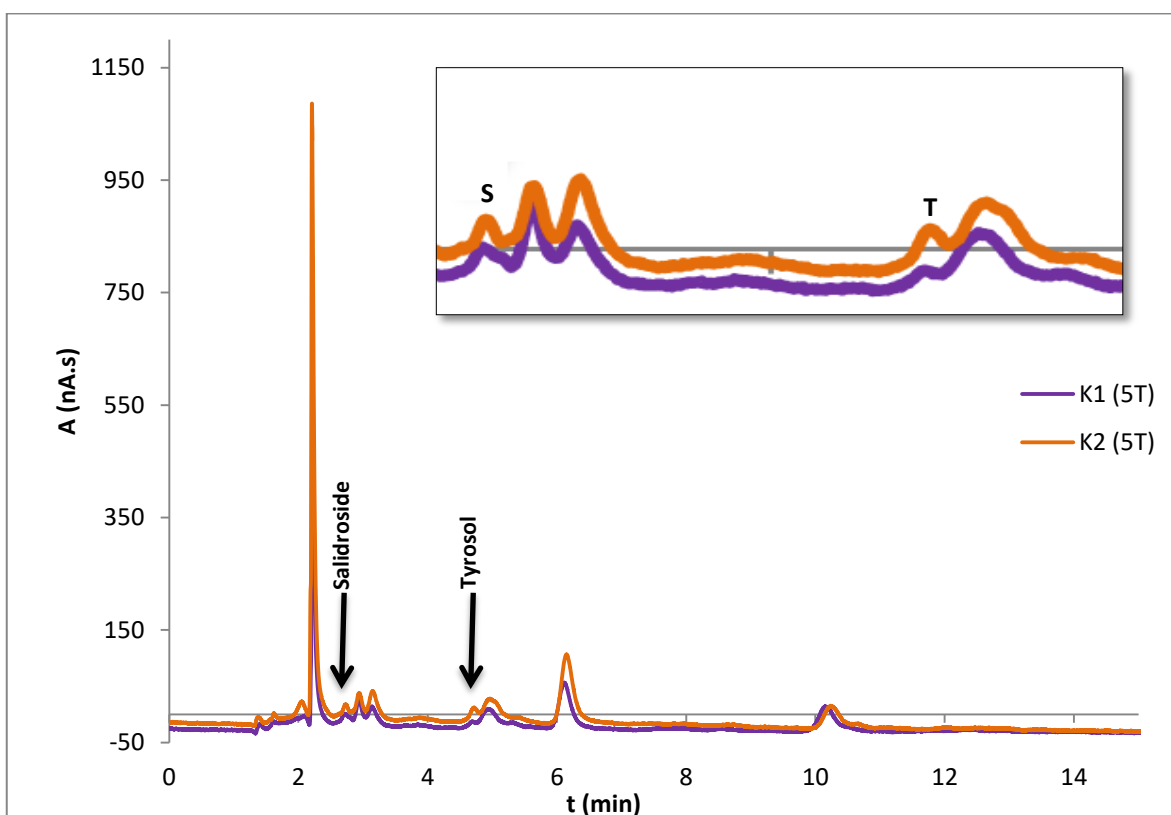
Obr. 25 – Souhrnný chromatogram pro vzorky tinktur (S: salidroside, T: p-tyrosol)



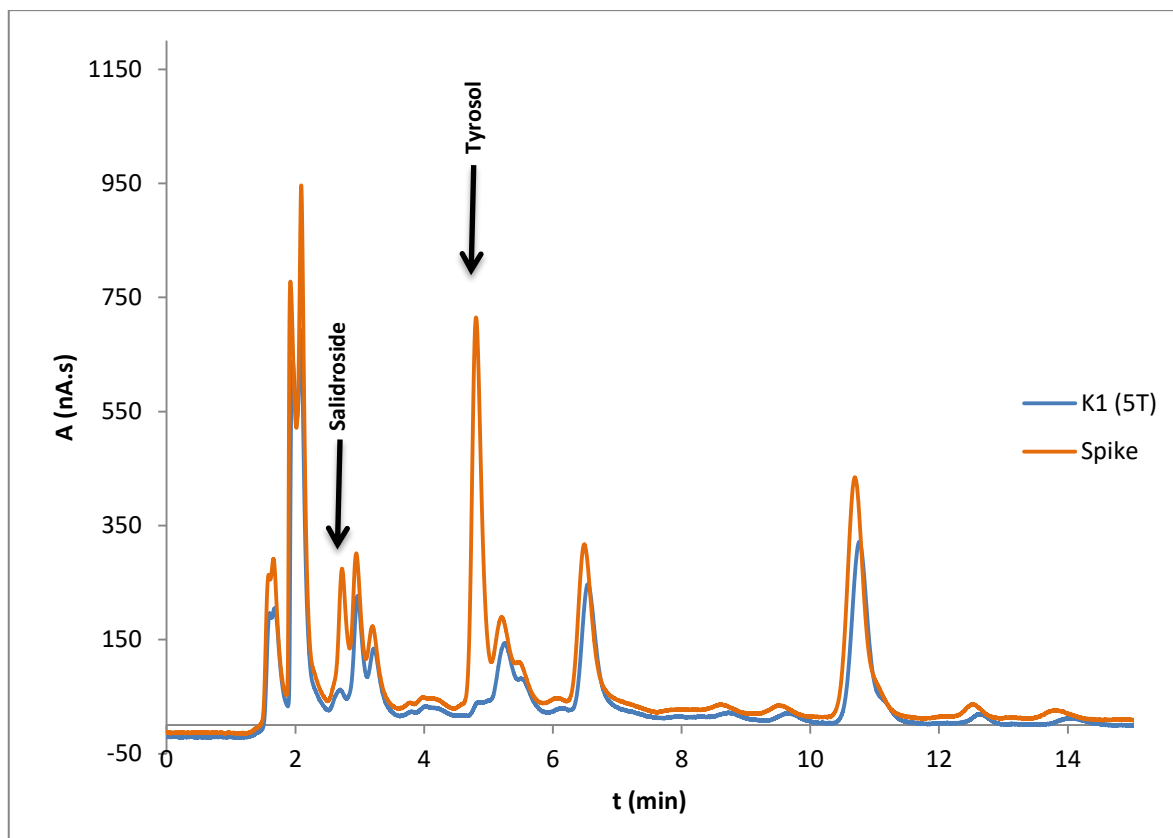
Obr. 26 – Souhrnný chromatogram pro 1000x zředěné vzorky K1 (2T a 5T)



Obr. 27 – Souhrnný chromatogram pro 1000x zředěné vzorky K2 (2T a 5T)



Obr. 28 – Souhrnný chromatogram pro 1000x zředěné vzorky kořene po pěti týdnech macerace



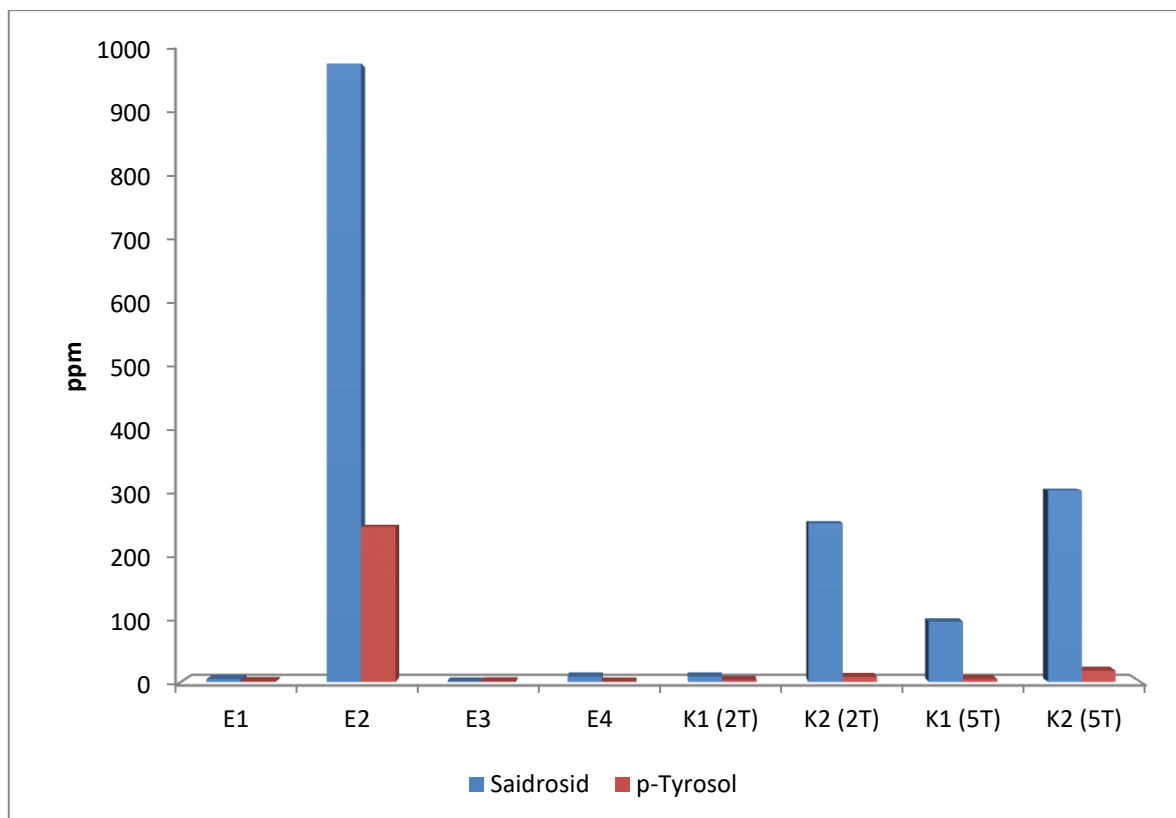
Obr. 29 – Souhrnný chromatogram pro 500x zředěný vzorek K1 (5T) a spikovaný vzorek

Kvantifikace salidrosideu a p-tyrosolu ve vzorcích

Po změření vzorků a získání hodnot ploch a zředovacích koeficientů byly jednotlivé vzorky kvantifikovány. Výpočet množství obou látek byl uskutečněn na základě regresní rovnice uvedené v kap. 4. 2. 7. 4. Výsledky pak lze vidět v Tab. VI. Na závěr byl sestaven sloupcový graf (Obr. 30) reprezentující relativní zastoupení obou látek v daných vzorcích.

Tab. VI – Obsah látek ve vzorcích

Typ vzorku	c_m (ppm)	
	Salidroside	p-Tyrosol
E1	5,21	1,32
E2	981,66	249,11
E3	0,88	1,16
E4	8,80	0,87
K1 (2T)	9,05	3,31
K2 (2T)	254,92	8,35
K1 (5T)	97,03	4,94
K2 (5T)	306,82	18,49



Obr. 30 – Relativní zastoupení salidroside a p-tyrosolu v jednotlivých vzorcích

4.2.8 Shrnutí

Byla vyvinuta HPLC/ED metoda vhodná pro analýzu salidroside a p-tyrosolu v komplexních rostlinných vzorcích, sestrojena kalibrační křivka pro oba analyty a provedeny odhady LOD a LOQ. Hodnota LOD pro salidroside činí $4,99 \cdot 10^{-8}$ mol/l a $4,47 \cdot 10^{-8}$ mol/l pro p-tyrosol. Hodnota LOQ salidroside je $1,66 \cdot 10^{-7}$ mol/l a $1,49 \cdot 10^{-7}$ mol/l pro p-tyrosol. Následně byla daná metoda aplikována na reálné vzorky.

Bylo zjištěno, že zastoupení dvou významných komponent, které jsou klíčové pro vyvození farmakologického účinku, se v jednotlivých tinkturách zásadně liší. Z **Tab. VI** a **Obr. 30** je patrné, že se nejbohatším produktem po stránce obsahové jeví vzorek E2. Zastoupení látek v něm několikanásobně převyšuje ostatní vzorky včetně vlastní připravené tinktury po dvou i pěti týdnech macerace. Naopak nejchudším vzorkem je vzorek E3. Je však třeba brát v potaz, že není znám přesný extrakční postup u zakoupených vzorků tinktur. U vzorků kořene byl s delší dobou macerace zaznamenán nárůst koncentrace obou látek. Vzorek K2 se v porovnání se vzorkem K1 jeví jako koncentrovanější macerát.

4.3 GC/MS

4.3.1 Instrumentální vybavení

Instrumentální vybavení GC/MS se skládalo z plynového chromatografu 7890A a hmotnostního detektoru 5975C, vše Agilent Technologies, Palo Alto, USA. Pro nástřík derivatizovaných vzorků byl použit autosampler G4513A (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) a pro SPME experimenty extraktor s extrakčním vláknem DVB/CAR/PDMS (StableFlex, 2 cm).

4.3.2 Laboratorní vybavení

Bylo využito minimálníku p-23 (FRITSCH, Německo), ultrazvuku (Elmasonic, Německo), centrifugy 5702 (Eppendorf, Německo), analytické váhy (Mettler Toledo, USA). Pro běžné laboratorní úkony bylo využito následujících pomůcek: váženky, automatických pipet a špiček, míchadla, magnetické míchačky, skleněných vialek o objemu 40 ml a skleněných vialek s víčky do autosampleru.

4.3.3 Chemikálie

Hexan (PENTA, Česká republika), pyridin (PENTA, Česká republika), hydroxylamin hydrochlorid (PENTA, Česká republika), nasycený roztok chloridu sodného (PENTA, Česká republika), hexamethyldisilazan (Sigma-Aldrich, Německo), trifluoroctová kyselina (Sigma-Aldrich, Německo), standard p-tyrosolu (Sigma-Aldrich, Německo), standard salidroside (Sigma-Aldrich, Německo), dusík, vazelína.

4.3.4 Zakoupené vzorky

Byly použity stejné vzorky jako v *kap. 4. 2. 4.*

4.3.5 Pracovní postupy

4.3.5.1 Příprava vzorků pro head-space analýzu (HS-SPME)

Zakoupené tinktury

Ke 200 μ l dané tinktury bylo přidáno 800 μ l nasyceného roztoku chloridu sodného. Směs byla zahřívána za stálého míchání na teplotu 50 °C. Po ustálení teploty bylo vsunuto SPME vlákno, které se nechalo po dobu 90 minut sorbovat.

Vzorky kořene

Do půli vialek o objemu 40 ml byly dány rozemleté vzorky kořenů. Vialky byly poté zahřívány a po dosažení teploty 70 °C bylo vneseno SPME vlákno, které bylo sorbováno po dobu 80 minut.

4.3.5.2 Derivatizace pomocí HMDS

Nejdříve byl připraven nový roztok hydroxylaminu navážením 250 mg pevného hydroxylaminu hydrochloridu s 10 ml pyridinu. Tato směs dále sloužila jako činidlo pro vznik oximů. Silanizačním činidlem byl v tomto případě HMDS (hexamethyldisilazan).

Standardy

50 μl zásobních roztoků obou standardů ($c = 1 \text{ mg/ml}$) bylo odpařeno proudem dusíku za teploty 80 °C po dobu jedné minuty. Poté bylo přidáno 300 μl směsi $\text{NH}_2\text{OH/py}$ a tato směs byla dále zahřívána jednu hodinu na teplotu 80 °C. Následně bylo s obezřetností přidáno 20 μl TFA a 680 μl silanizačního činidla HMDS. Po vychladnutí byly vzorky umístěny do centrifugy, čímž došlo k separaci pevné a kapalné fáze. 600 μl horní kapalné fáze bylo odebráno pro analýzu.

Zakoupené tinktury a kořeny

Zakoupené tinktury i vzorky kořene byly připraveny stejným způsobem. Pro výpočet retenčních indexů byl připraven navíc roztok 1 ml hexanu s 5 mg vazelíny.

4.3.5.3 Výpočet retenčního indexu

Výpočet retenčních indexů byl uskutečněn pomocí **Rovnice 5**, kde

$$I_x = 100 Z + 100 \left(\frac{\log(t'_{R,x}) - \log(t'_{R,z})}{\log(t'_{R,z+1}) - \log(t'_{R,x})} \right) \quad (5)$$

R,x představuje zjišťovanou látku, Rz předcházející uhlovodík pro danou látku a $Rz+1$ nadcházející uhlovodík. [15]

4.3.6 Chromatografické podmínky

Byla zvolena kolona HP-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) a mobilní fáze helium (0,9 ml/min, 99,9995 %, SIAD, Bergamo, Itálie).

4.3.6.1 HS-SPME

- teplotní gradient: 40 °C – 1 min – 3 °C/min – 200 °C – 10 °C/min – 300 °C – 5 min
- desorpce: 270 °C, 4 min
- scan: 29 – 520 m/z

4.3.6.2 Derivatizační techniky

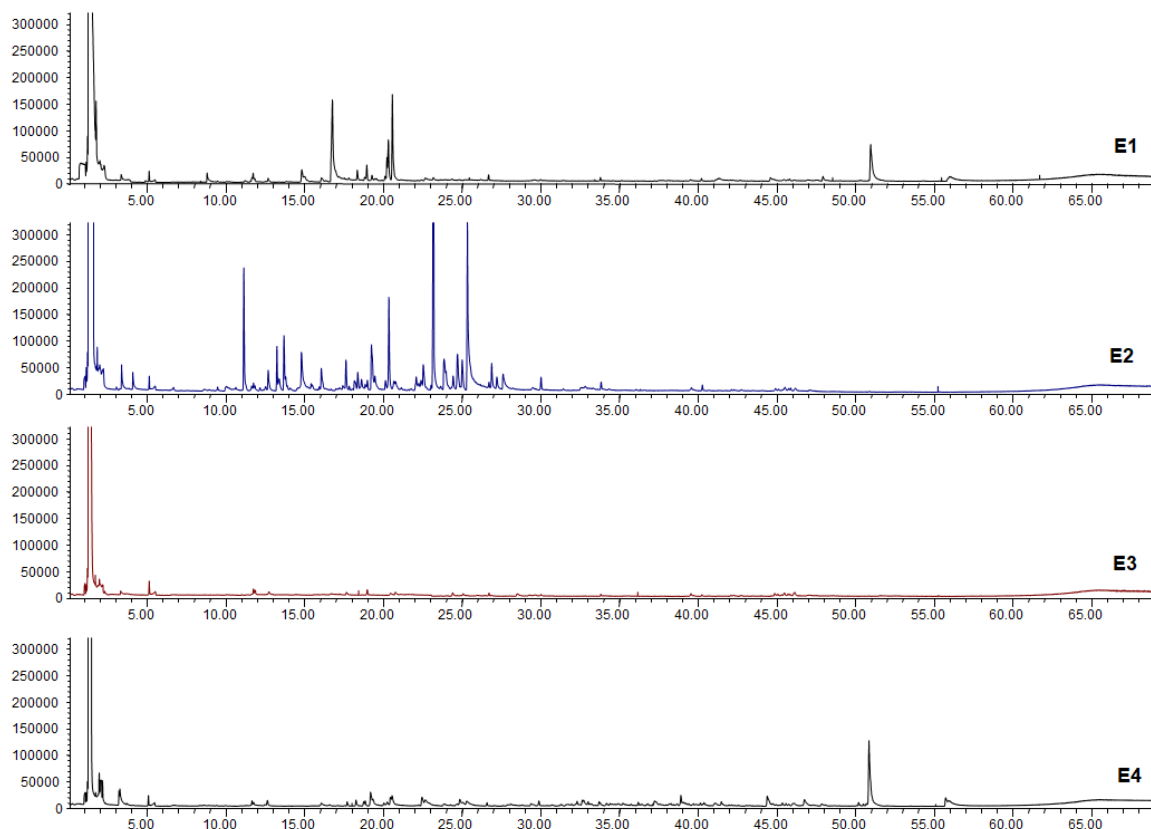
- teplotní gradient: 50 °C – 2 min – 10 °C/min – 320 °C – 15 min
- teplota nástřiku: 280 °C
- nástřik: 1 μl (210 kPa, 0,3 min)

- scan: 29 – 800 m/z

4.3.7 Výsledky a diskuze

4.3.7.1 HS-SPME

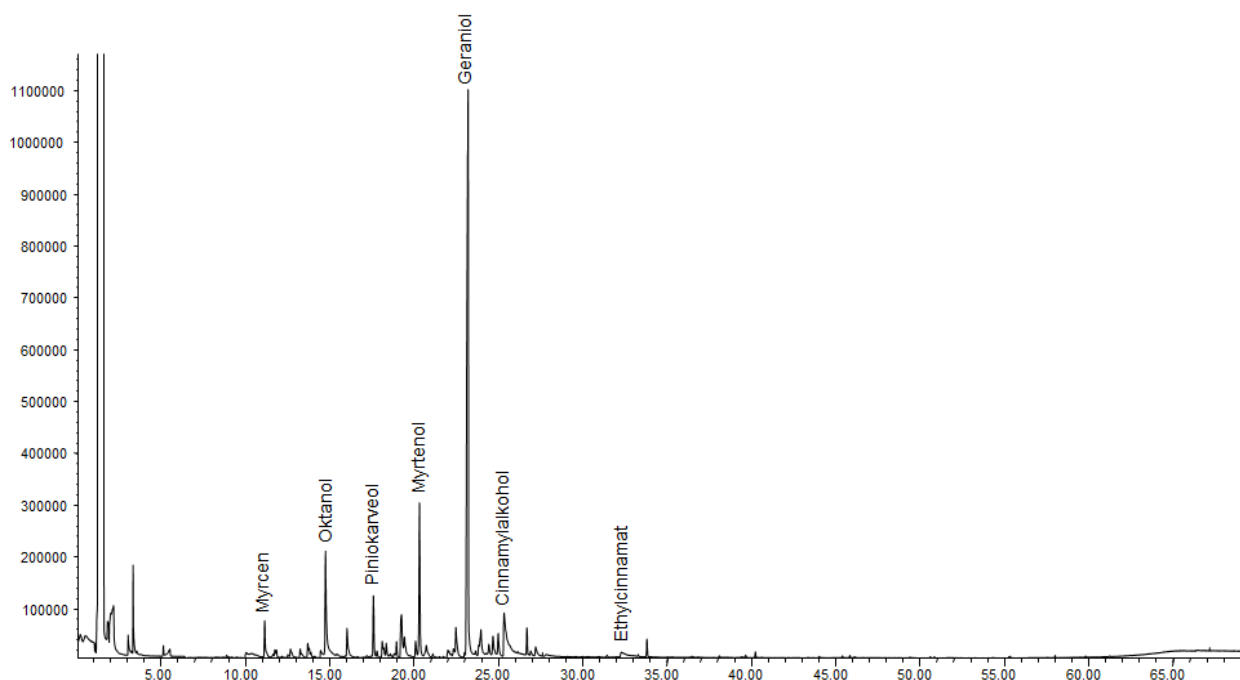
Této technice byly podrobeny všechny zakoupené vzorky. Na **Obr. 31** je možno vidět chromatogramy jednotlivých komerčně zakoupených tinktur (E1 – E4), z nichž je patrné, že vzorek E2 poskytuje nejvíce bohatý chromatogram v porovnání s ostatními vzorky tinktur. Z tohoto důvodu je blíže uveden chromatogram pouze pro tento vzorek.



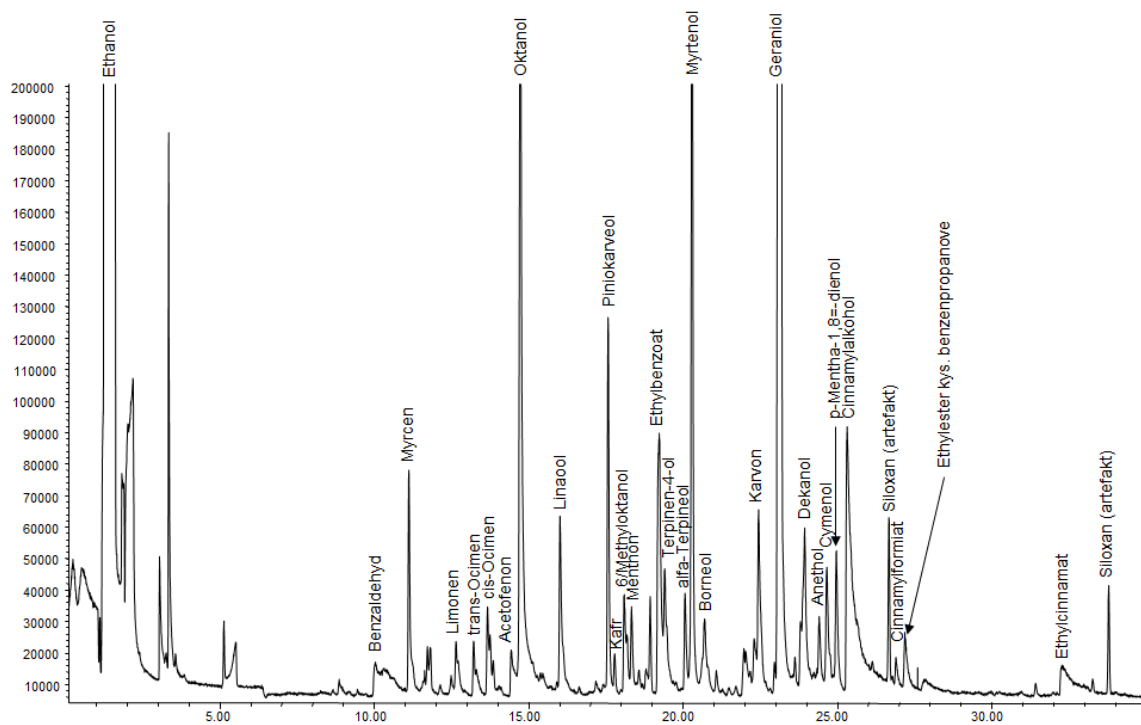
Obr. 31 – Chromatogramy jednotlivých tinktur pomocí HS-SPME

Na **Obr. 32** lze vidět chromatogram vzorku E2 s jednotlivými identifikovanými látkami. Zde stojí za povšimnutí nejvíce intenzivní pík, který byl MS přisouzen látce zvané geraniol. Vědecké články uvádí, že právě geraniol je zodpovědný za charakteristickou vůni rozchodnice připomínající růže, což tento fakt jedině potvrzuje. Ovšem z hlediska subjektivního hodnocení nebyla zaznamenána výrazná vůně, díky které si rostlina nese své druhové jméno růžová. Dále byly detekovány sloučeniny: myrcen, oktanol, pinokarveol, myrtenol, cinnamylalkohol a ethylcinnamát. **Obr. 33** představuje přiblížený chromatogram vzorku E2. Zde je možno si všimnout dalších látek, jako například: benzaldehyd, limonen, acetofenon, kafr, linaool, menthon, ethylbenzoát, borneol, karvon, dekanol, anethol, cymenol, cinnamylformiát a mnoho dalších těkavých látek, které se běžně vyskytují v rostlinách. Výrazný je pík pro ethanol, což jde v souladu s tím, že se

jedná o ethanolický roztok tohoto vzorku. V pravé části chromatogramu jsou vyznačeny siloxany. Jedná se o tzv. artefakty, které nejsou předmětem zájmu. Nepocházejí ze vzorku, nýbrž z kolony, ale přesto poskytují relativně intenzivní píky.

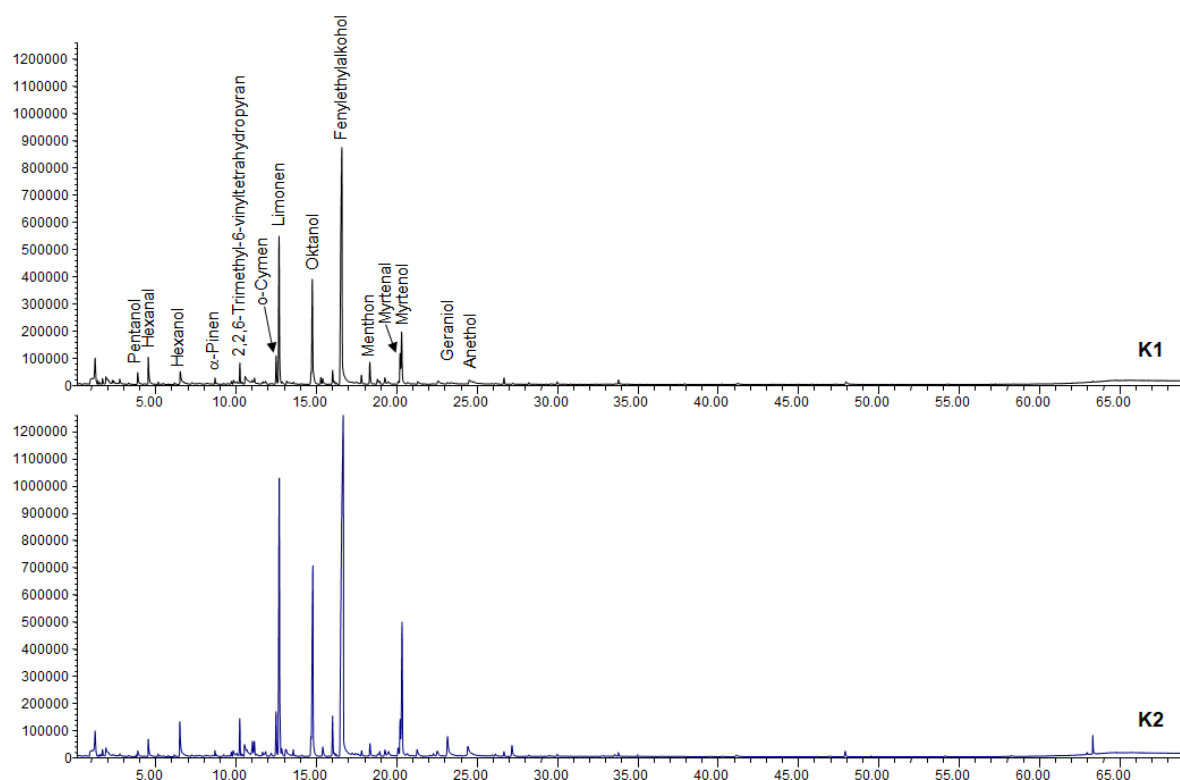


Obr. 32 – Chromatogram vzorku E2

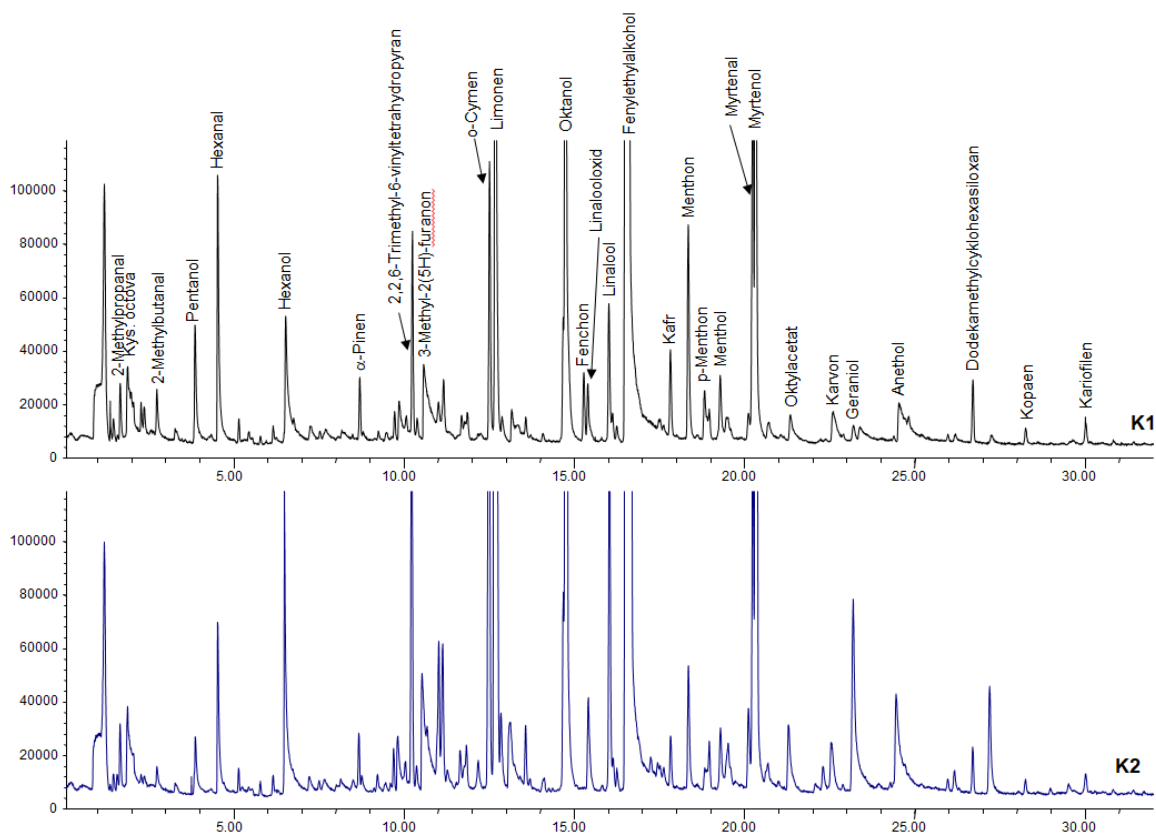


Obr. 33 – Chromatogram vzorku E2 (přiblížený)

Na **Obr. 34** je možno vidět chromatogramy pro vzorky kořene a na **Obr. 35** jejich přibližnou podobu. Je patrné, že se profil obou vzorků kořene dosti prolíná, avšak množství jednotlivých látek je různé, jak je patrné z intenzity jednotlivých píků. Byly identifikovány následující sloučeniny: 2-methylpropanal, octová kyselina, pentanol, hexanal, hexanol, α -pinen, o-cymen, limonen, oktanol, linalooloxid, linalool, fenylethylalkohol, kafr, p-menthon, myrtenal, myrtenol, karvon, geraniol, anethol, kopaen, kariofilen apod. V případě vzorků kořene je intenzita píku geraniolu oproti vzorku E2 výrazně nižší. Mezi jejich nejvíce zastoupené látky patří fenylethylalkohol, limonen, oktanol, myrtenol a o-cymen.



Obr. 34 – Chromatogramy pro vzorky K1 a K2 pomocí HS-SPME



Obr. 35 – Chromatogramy pro vzorky K1 a K2 pomocí HS-SPME (přibližné)

4.3.7.2 Po derivatizaci

Jak již bylo řečeno dříve, aby bylo možné identifikovat salidroside, p-tyrosol a případně další látky jako jsou rosaviny, bylo třeba provést derivatizaci. Ta byla uskutečněna pomocí činidla HMDS (kap. 4. 3. 5. 2).

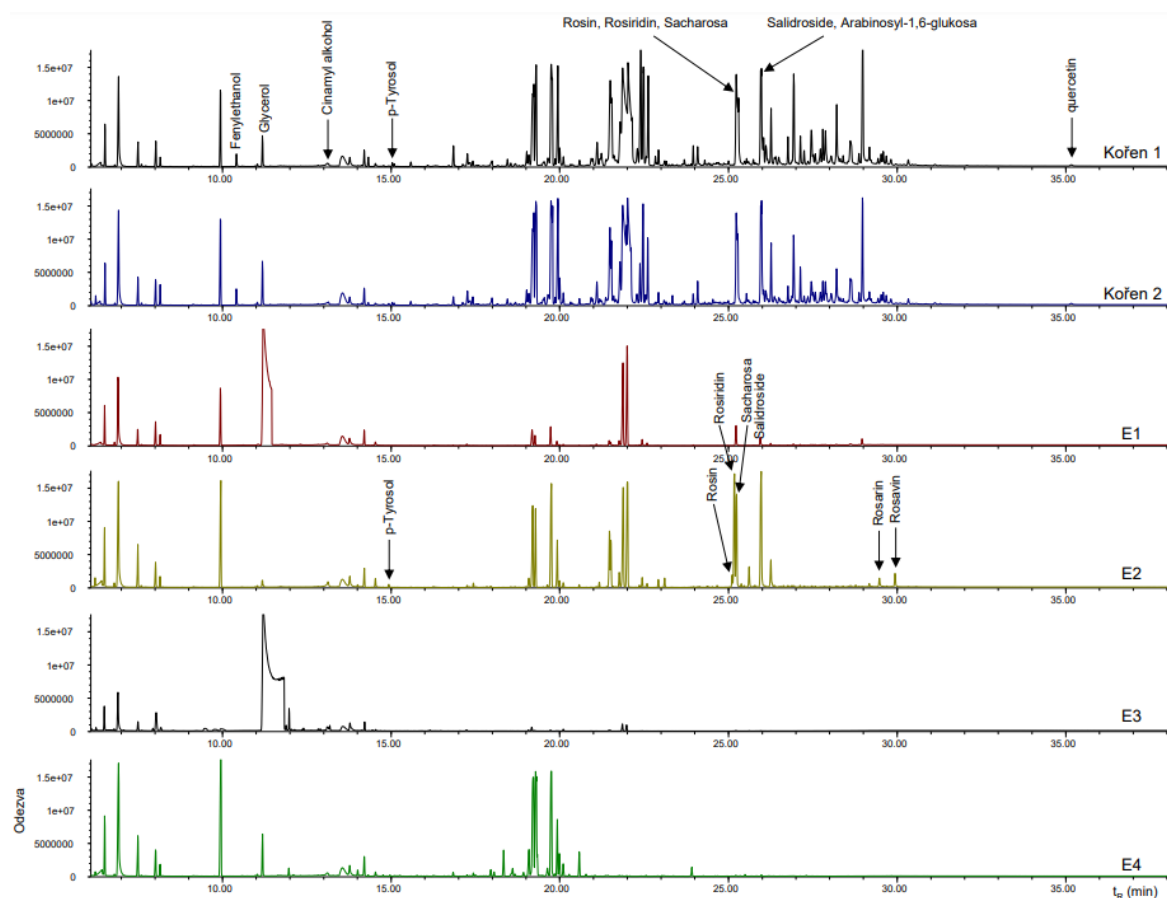
Výsledné chromatogramy vzorků po derivatizaci lze vidět na Obr. 36. Na tomto obrázku spolu s Tab. VIII, IX a Obr. 37 jsou uvedeny hodnoty vzorků kořene bez tradiční macerace. Vzorky byly v tomto případě podrobeny okamžité extrakci alkoholem a následné derivatizaci. Vzorky kořene po dvou a pěti týdnech macerace lze vidět až na Obr. 38, Tab. XI a XII. V Tab. VII a X jsou pak uvedeny hodnoty ploch pro zásobní roztoky salidroside a p-tyrosolu, z nichž se vycházelo při kvantifikaci jednotlivých vzorků. Vzhledem k tomu, že nebyla v sekci GC/MS provedena vícebodová kalibrace, jedná se pouze o hrubé odhady množství jednotlivých látek ve vzorcích.

Z Obr. 36 a Tab. IX je patrné, že vzorky tinktur z obou kořenů spolu se zakoupeným vzorkem E2 obsahují mnohem větší množství látek v porovnání s ostatními vzorky. Naopak nejchudším představitelem je vzorek E3, v němž bylo detekováno naprosté minimum hlavních komponent (p-tyrosolu a salidroside), přičemž některé typy rosavinů dokonce nebyly detekovány (obdobná situace nastala taktéž v případě vzorku E4). Tento fakt také koreluje se vzhledem vzorku E3 – bezbarvost. Ve vzorcích E1 a E3 se nachází

dosti intenzivní pík glycerolu, což je poměrně zajímavý artefakt, který není nijak zásadně pozorován u dalších typů tinktur. p-Tyrosol i salidosid byly detekovány ve všech případech. Jejich největší zastoupení ovšem nabízí vzorky kořene a E2, jak již bylo řečeno dříve. Velkým úspěchem byla detekce početné skupiny rosavinů v rozchodnici. Ty se pomocí kapalinové chromatografie nepodařilo detekovat, ovšem po derivatizaci a následné analýze pomocí GC/MS již ano. Řadí se sem rosin, rosiridin, rosarin a rosavin. Dále se podařilo detekovat látky jako je sacharóza, arabinosyl-1,6-glukosa a gallová kyselina. V případě vzorků kořene lze po 35. minutě vidět jako poslední identifikovanou látku quercetin. Jeho přítomnost byla studována i v kapalinové chromatografii, ale za daných podmínek, při kterých byla prováděna analýza, byl jeho retenční čas nad 50 minut. Z tohoto důvodu již nebyl dále uvažován.

Z **Tab. XI** a **XII** je patrné, že v porovnání s ostatními vzorky mají maceráty vysoké zastoupení salidosidu na rozdíl od p-tyrosolu. Lze vidět, že s delší dobou macerace roste intenzita píků (množství látek). Na druhou stranu koncentrace rosiridinu s delší dobou macerace klesá.

Z **Tab. VIII** a **XI** byly udělány odhady hmotnostních koncentrací pro dané látky v příslušných vzorcích a pro ně sestrojeny sloupcové grafy pro názornost jejich relativních zastoupení v daných vzorcích. (**Obr. 37 a 38**).



Obr. 36 – Soubor chromatogramů jednotlivých tinktur (E1 – E4, K1 a K2)

Tab. VII – Hodnoty ploch pro zásobní roztoky salidroside a p-tyrosolu I

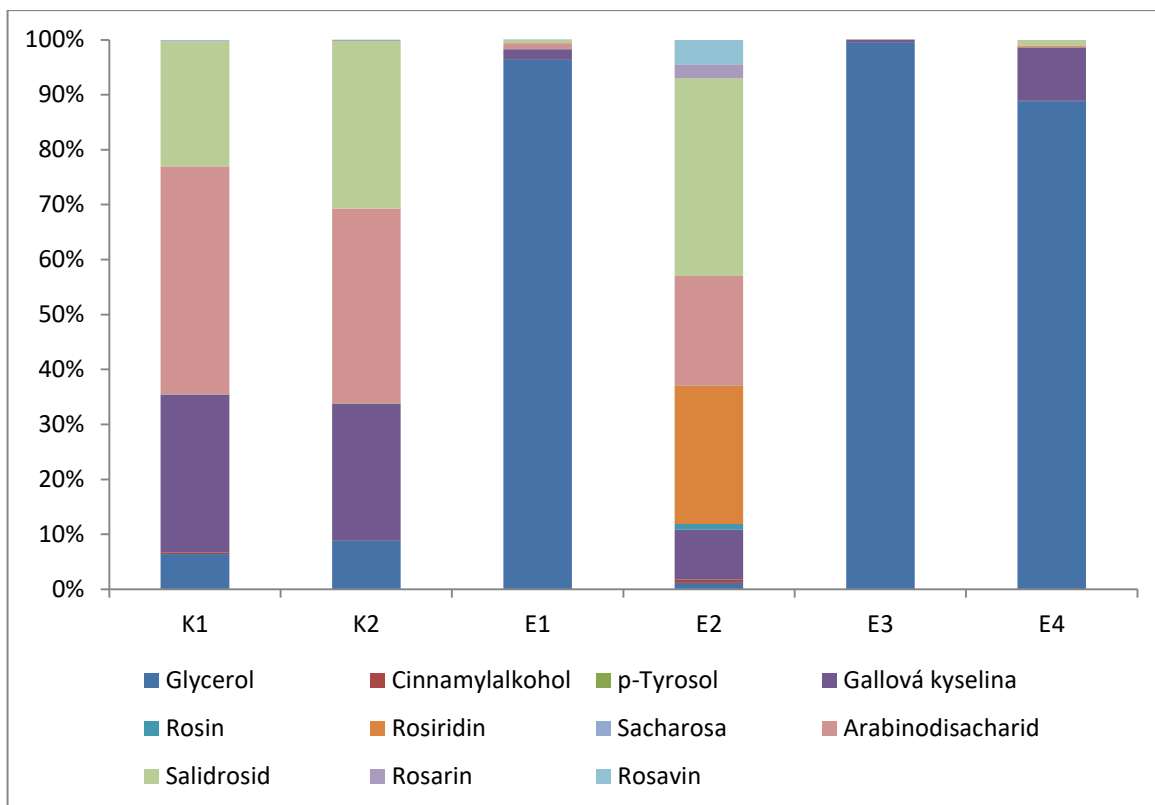
Salidroside		p-Tyrosol	
c (mg/ml)	A (nA.s)	c (mg/ml)	A (nA.s)
1	49512089	1	15116917

Tab. VIII – Získané plochy látek ve vzorcích K1, K2 a tinktur (ND – nedetekováno)

	A (nA.s)					
	K1	K2	E1	E2	E3	E4
Glycerol	7064552	10552528	2,02E+08	1697239	3,17E+08	10005939
Cinnamylalkohol	343024	6119	1262	972229	93795	4888
p-Tyrosol	631506	1461572	52927	2577753	55681	28051
Gallová kyselina	31870526	29438836	3762788	13264185	1174173	1088593
Rosin	30171	16278	832	1526344	284	1567
Rosiridin	ND	56767	ND	37183207	15943	11548
Sacharosa	96651998	83545888	8354032	49148509	281633	423895
Arabinodisacharid	46016661	42170724	2339760	29309370	71726	32727
Salidroside	25248528	36189688	959654	53072729	49068	286096
Rosarin	231857	213743	10534	3649457	ND	ND
Rosavin	88934	57498	4921	6577123	ND	ND

Tab. IX – Vypočtené hodnoty hmotnostních koncentrací pro dané látky ve vzorcích K1, K2 a tinktur

	c _m (ppm)					
	K1	K2	E1	E2	E3	E4
Glycerol	142,6834	213,1303	4082,756	34,27928	6400,168	202,0908
Cinnamylalkohol	6,928086	0,123586	0,025489	19,63619	1,894386	0,098723
p-Tyrosol	41,77479	96,68453	3,501177	170,5211	3,683357	1,855603
Gallová kyselina	643,6918	594,5788	75,99736	20067,8979	23,71487	21,98641
Rosin	0,609366	0,328768	0,016804	30,8277	0,005736	0,031649
Rosiridin	ND	1,146528	ND	750,9925	0,322002	0,233236
Sacharosa	1952,089	1687,384	168,7271	992,6567	5,688166	8,561444
Arabinodisacharid	929,4025	851,7258	47,25634	591,9639	1,448656	0,66099
Salidroside	509,9467	730,9263	19,38222	1071,915	0,991031	5,778306
Rosarin	4,682836	4,316986	0,212756	73,7084	ND	ND
Rosavin	1,796208	1,161292	0,09939	132,8387	ND	ND



Obr. 37 – Relativní zastoupení jednotlivých látek ve vzorcích tinktur (E1 – E4, K1 a K2)

Tab. X – Hodnoty ploch pro zásobní roztoky salidroside a p-tyrosolu II

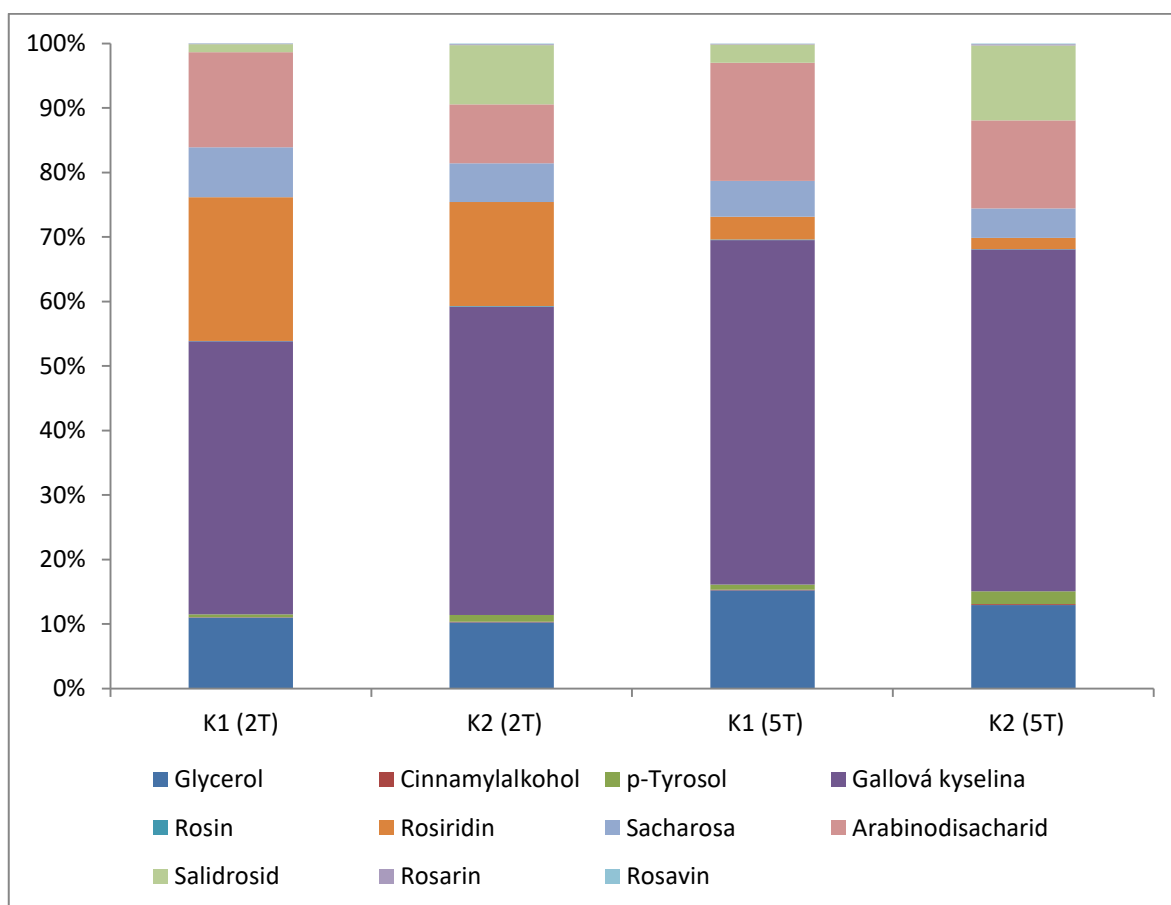
Salidroside		p-Tyrosol	
c (mg/ml)	A (nA.s)	c (mg/ml)	A (nA.s)
1	10361939	1	20441658

Tab. XI – Získané plochy látek ve vzorcích kořene po dvou a pěti týdnech macerace

	A (nA.s)			
	K1 (2T)	K2 (2T)	K1 (5T)	K2 (5T)
Glycerol	1899820	1630795	2544097	2027786
Cinnamylalkohol	11343	15980	23327	23036
p-Tyrosol	161030	329915	247403	612459
Gallová kyselina	7318468	7583318	8934556	8301953
Rosin	8347	11616	12330	11456
Rosiridin	3850476	2558667	595183	269942
Sacharosa	1341678	959378	926552	716980
Arabinodisacharid	2541088	1441885	3065810	2133647
Salidroside	221444	1461003	469620	1816844
Rosarin	13549	24319	16533	34249
Rosavin	9708,5	18307	14595	19686

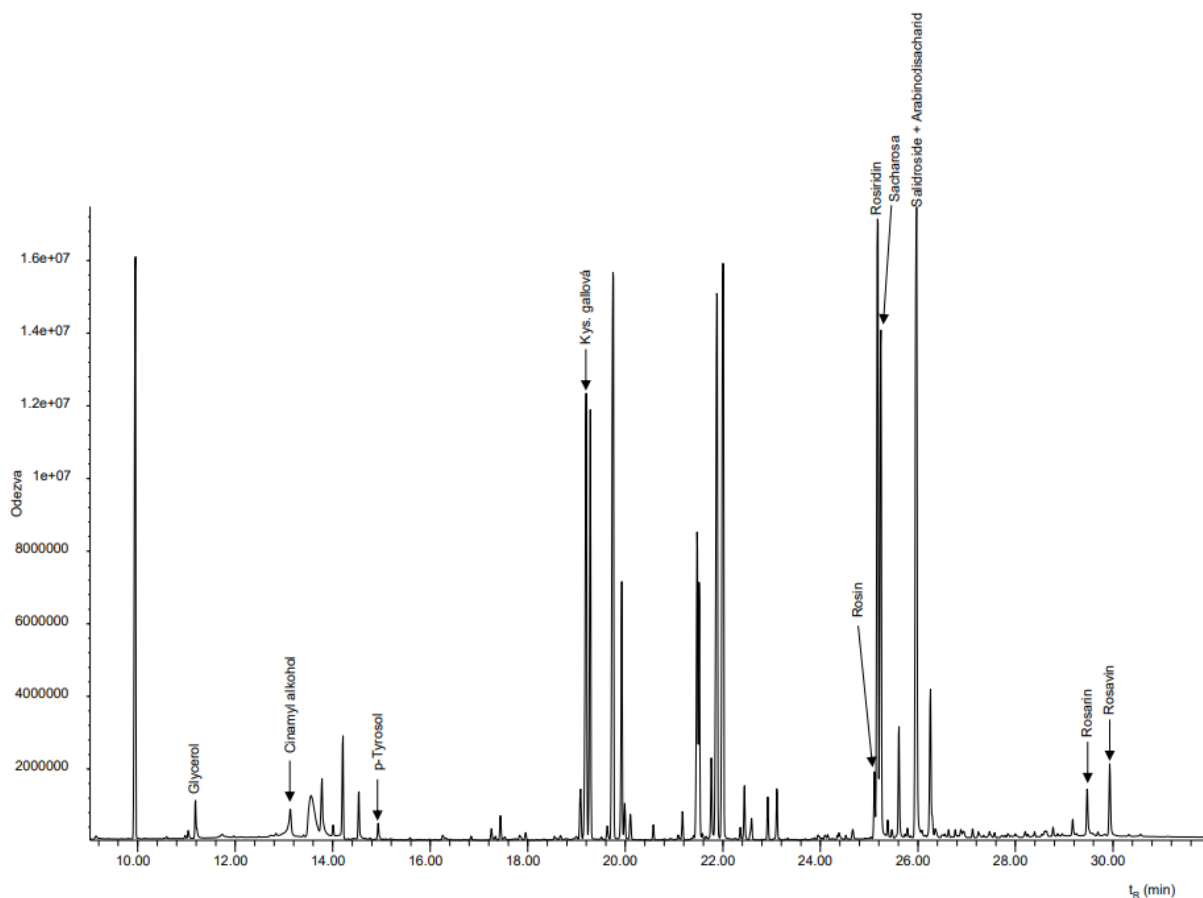
Tab. XII – Vypočtené hodnoty hmotnostních koncentrací pro dané látky ve vzorcích kořene po dvou a pěti týdnech macerace

c_m (ppm)				
	K1 (2T)	K2 (2T)	K1 (5T)	K2 (5T)
Glycerol	183,35	157,38	245,52	195,70
Cinnamylalkohol	1,09	1,54	2,25	2,22
p-Tyrosol	7,88	16,14	12,10	29,96
Gallová kyselina	706,28	731,84	862,25	801,20
Rosin	0,81	1,12	1,19	1,11
Rosiridin	371,60	246,93	57,44	26,05
Sacharosa	129,48	92,59	89,42	69,19
Arabinodisacharid	245,23	139,15	295,87	205,91
Salidrosid	21,37	141,00	45,32	175,34
Rosarin	1,31	2,35	1,60	3,31
Rosavin	0,47	1,77	1,29	1,90

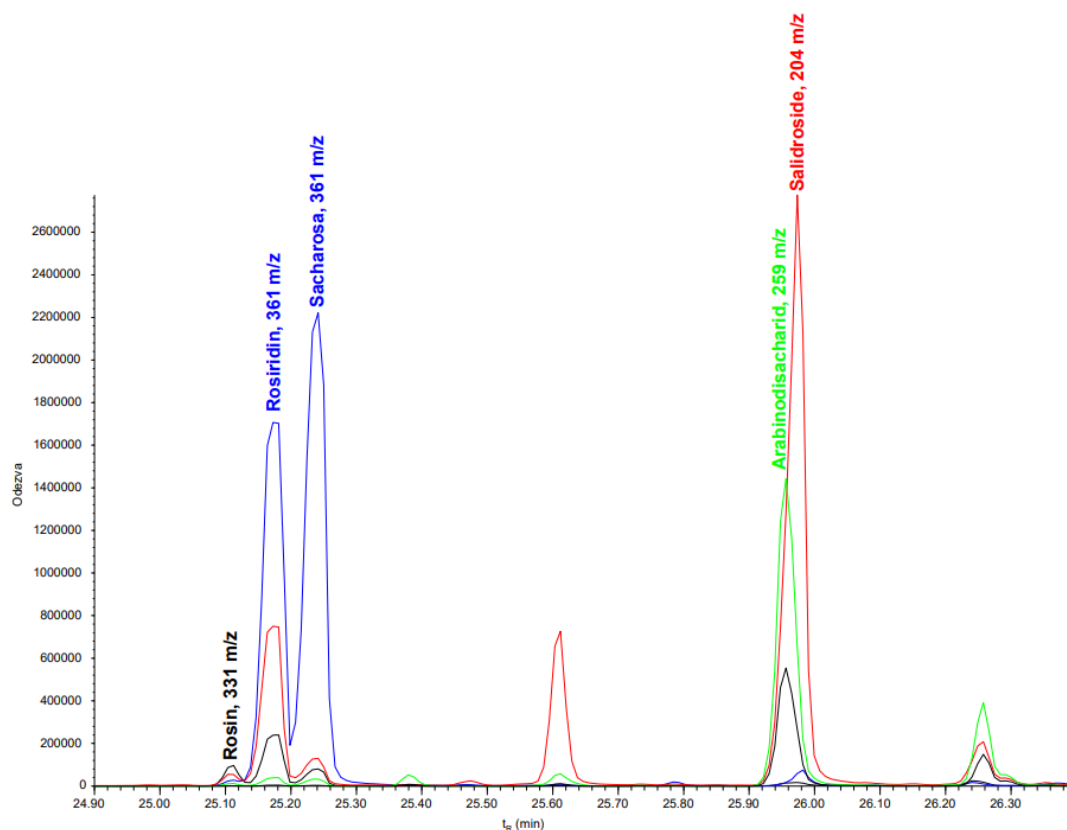


Obř. 38 – Relativní zastoupení jednotlivých látek ve vzorcích macerovaného kořene

Na **Obr. 39** lze vidět chromatogram derivatizovaného vzorku E2. Nyní je možno vidět p-tyrosol, salidroside a další látky jako jsou rosaviny. Největší zastoupení má gallová kyselina, rosiridin, sacharóza a salidroside spolu s arabinosyl-1,6-glukosou. p-Tyrosol je tedy oproti salidroside skoro v zanedbatelném množství. Identifikace salidroside však nebyla ze začátku zcela jednoznačná. Zjistilo se, že salidroside má stejný retenční čas jako arabinosyl-1,6-glukosa. Kvůli jejich překryvu bylo třeba provést selekci iontů, kde se následně přítomnost těchto dvou látek potvrdila. Kritická byla i trojice rosinu, rosiridinu a sacharózy. Tam nedocházelo sice k jejich překryvu, ale aby byla identifikace jednoznačná, byla zde selekce iontů zcela žádoucí. Výsledek pak lze vidět na **Obr. 40**.



Obr. 39 – Chromatogram vzorku E2 po derivatizaci



Obr. 40 – Výřez z chromatogramu vzorku E2 po derivatizaci a selekci iontů

Vzhledem k tomu, že nebyly k dispozici standardy pro všechny uvedené látky (mimo salidroside a p-tyrosol), bylo potřeba jistého ověření jejich identity. K tomu posloužil výpočet retenčních indexů (I_x) dle **Rovnice 5** (kap. 4. 3. 5. 3). Výsledky lze vidět v **Tab. XIII**. Hodnota mrtvého retenčního času činila 1,45 min. Hodnoty retenčních indexů byly zaokrouhleny na celá čísla. V tabulce jsou taktéž vypsány hodnoty retenčních indexů ze článku [70]. Závěrem této části lze říci, že se podařilo spolehlivě přiřadit píky problematicky určeným látkám.

Tab. XIII – Retenční charakteristiky a vypočtené retenční indexy pro vybrané látky

	Ion (m/z)	t_R	t'_R	RI	RI [70]
C26	-	24,457	23,0108	-	-
Rosin	331	25,109	23,6628	2689	2690
Rosiridin	361	25,177	23,7308	2698	2700
C27	-	25,194	23,7478	-	-
Sacharosa	361	25,239	23,7928	2706	2707
C28	-	25,903	24,4568	-	-
Arabinodisacharid	259	25,956	24,5098	2808	2812 (2852)

Salidroside	204	25,974	24,5278	2811	2815
C29	-	26,587	25,1408	-	-
C30	-	27,247	25,8008	-	-
C31	-	27,886	26,4398	-	-
C32	-	28,505	27,0588	-	-
C33	-	29,107	27,6608	-	-
Rosarin	259	29,475	28,0288	3358	3364
C34		29,741	28,2948		
Rosavin	259	29,937	28,4908	3427,854	3436
C35		30,451	29,0048		

4.3.8 Shrnutí

Sekce GC/MS zde měla funkci doplňkovou, která původně sloužila pro kvalitativní zhodnocení jednotlivých vzorků. Nakonec se podařilo vzorky kvantifikovat a mimo dvou významných bioaktivních komponent (salidroside a p-tyrosolu) byla detekována taktéž početná skupina rosavinů, kterou nebylo možno za daných podmínek pomocí HPLC/ED detekovat. Vzhledem k jinému použitému kalibračnímu modelu oproti HPLC/ED se zde jedná pouze o hrubé odhady množství jednotlivých látek. Faktem však je, že trend v jednotlivých vzorcích zůstal zachován, což vede k poznání, že dvě odlišné metody mohou poskytovat tentýž závěr a být si vzájemně doplňkovými.

Pomocí metody HS-SPME se podařilo identifikovat těkavé látky ve všech vzorcích. I zde bylo potvrzeno, že vzorek E2 je nejvíce bohatým představitelem ze zakoupených vzorků tinktur. Potvrdila se přítomnost geraniolu, který je zodpovědný za charakteristickou vůni po růžích. Dále byly identifikovány látky, jako jsou například: oktanol, myrcen, myrtenol, cinnamylalkohol, ethanol, benzaldehyd, limonen, linaol, menthon, karvon, anethol a mnoho dalších zástupců uvedených výše. Chromatogramy vzorků nemacerovaného kořene byly taktéž bohaté na nejrůznější látky, ovšem zajímavým faktem je, že geraniol v tomto případě není tou nejvíce zastoupenou látkou, jako je tomu v případě vzorku E2. Podařilo se ovšem identifikovat další látky, jako jsou například: linaoloxid, kopaen, kariofilen, myrtenal a například fenylethylalkohol.

Pro možnost detekce významných bioaktivních látek byla provedena derivatizace. Bylo opět zjištěno, že vzorky E1, E3 a E4 jsou obecně chudými vzorky tinktur obsahující v drtivé většině pouze alkohol. Na druhou stranu vzorky nemacerovaného kořene a E2 mají vyšší zastoupení salidroside, arabinodisacharidu, rosavinu a rosarinu. Ve vzorku E2 bylo detekováno relativně četné zastoupení rosiridinu. Dále bylo zjištěno, že s délkou

doby macerace roste koncentrace hlavních bioaktivních komponent, vyjma rosiridinu, který s délkou doby macerace klesá. Na závěr byly vypočteny retenční indexy pro vybrané látky, které dále byly porovnány s literárním zdrojem. Tento postup sloužil k ověření totožnosti jednotlivých píků.

5 ZÁVĚR

Látky solidrosid i p-tyrosol byly kvantifikovány ve všech reálných vzorcích, přestože se jejich množství výrazně liší. Vyvinutou metodou HPLC/ED bylo zjištěno nejvyšší zastoupení těchto dvou významných elektroaktivních komponent ve vzorku E2 a ve vlastních tinkturách. Naopak nejchudším představitelem po stránce obsahové pro tyto dvě látky se jeví vzorek E3. Dále bylo zjištěno, že roste koncentrace látek s délkou doby macerace a tato fakta byla navíc nezávisle potvrzena technikou GC/MS. Metoda GC/MS poskytla dále přehled nejvýznamnějších těkavých látek v rozchodnici, kde se mj. podařilo detekovat látku geraniol, zodpovědnou za charakteristickou vůni připomínající růže. Po derivatizaci vzorků bylo možné touto technikou analyzovat i velmi početnou skupinu v rozchodnici – rosaviny, které nebylo možné detekovat pomocí HPLC/ED za definovaných podmínek.

6 SEZNAM LITERATURY

- [1] A. Marvanová, Rozchodnice růžová (*Rhodiola rosea*) a její využití ve fytotherapii, 2021.
- [2] S. Pacheco, R. G. Borguini, M. C. P. A. Santiago, L. S. M. do Nascimento, R. L. O. Godoy, History of Liquid Chromatography, *Revista Virtual de Química* 7 (2015) 1225-1271.
- [3] K. R. Williams, Colored Bands: History of Chromatography, *Journal of Chemical Education* 79 (2002) 922-923.
- [4] J. Farradane, History of Chromatography, *Nature* 167 (1951) 120-120.
- [5] <https://www.3pol.cz/cz/rubriky/biografie/2356-sto-let-od-umrti-ruskeho-botanika-fyziologa-biochemika-a-zakladatele-chromatografie>, staženo 17. dubna 2023.
- [6] J. Sobotníková, Z. Bosáková, Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na katedře analytické chemie přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, *Chemické Listy* 104 (2010) 1226-1231.
- [7] G. A. Guiochon, Chromatography, today and tomorrow, *Analytica Chimica Acta* 283 (1993) 309-319.
- [8] L. Nováková, M. Douša, P. Česla, Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., 2. přepracované a rozšířené vydání, Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, Brno 2021.
- [9] O. Coskun, Separation Techniques: Chromatography, *Northern Clinics of Istanbul* (2016) 156-160.
- [10] Z. Holzbecher, Analytická chemie, SNTL, Praha 1987.
- [11] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Analytická chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2019.
- [12] R. P. W. Scott, J. A. Perry, Introduction to analytical gas chromatography, 2nd ed., CRC Press, New York 1998.
- [13] J. Churáček, P. Jandera, J. Krupčík, J. Polonský, M. Popl, F. Vláčil, Analytická separace látek, SNTL, Praha 1990.
- [14] H. M. McNair, J. M. Miller, Basic gas chromatography, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken 2009.
- [15] O. D. Sparkman, Z. Penton, F. G. Kitson, Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide, 2nd ed, Elsevier, Boston 2011.
- [16] W. Jennings, E. Mittlefehldt, P. P. Stremple, Analytical gas chromatography, 2nd ed., Academic Press, San Diego 1997.

- [17] <https://cs.weblogographic.com/what-is-difference-between-gas>, staženo 17. dubna 2023.
- [18] S. Fanali, *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*, Elsevier, Waltham 2013.
- [19] <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/1%20HPLC%202019%20teorie.pdf>, staženo 17. dubna 2023.
- [20] R. J. Flanagan, D. Perrett, R. Whelpton, *Electrochemical Detection in HPLC: Analysis of Drugs and Poisons*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 2005.
- [21] D. Corradini, *Handbook of HPLC*, 2nd ed., Taylor & Francis, Boca Raton 2010.
- [22] J. Barek, F. Opekar, K. Štulík, *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha 2005.
- [23] K. Kalcher, R. Metelka, I. Švancara, K. Vystřa, *Sensing in electroanalysis*, University of Pardubice, Pardubice 2005.
- [24] J. Čáslavský, J. G. K. Ševčík, *Organická analýza*, 2 Theta, Český Těšín 2022.
- [25] Y. Zhang, Y. Xia, H. Ling, Label-free diagnosis of ovarian cancer using spoof surface plasmon polariton resonant biosensor, *Sensors and Actuators: B. Chemical* 352 (2022) 1-10.
- [26] P. Bothammal, S. Michelraj, G. Venkatachalam, A. Verma, K. Natarajaseenivasan, Electrochemical biosensor for serogroup specific diagnosis of leptospirosis, *Bioelectrochemistry* 144 (2022) 1-10.
- [27] S. Bunyarataphan, T. Prammananan, D. Japrun, Ratiometric Electrochemical Biosensor Based on Internally Controlled Duplex PCR for Detection of Mycobacterium Tuberculosis, *Journal of The Electrochemical Society* 169 (2022) 1-10.
- [28] https://www.researchgate.net/figure/5-cyclic-voltammetry-involves-the-imposition-of-a-triangular-waveform-as-the-potential_fig8_348416345, staženo 17. dubna 2023.
- [29] https://www.researchgate.net/figure/Hydrodynamic-voltammogram-obtained-by-plotting-the-peak-current-values-average-of-3_fig3_277674102, staženo 17. dubna 2023.
- [30] <https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography/what-is-gas-chromatography>, staženo 17. dubna 2023.
- [31] B. L. Milman, General principles of identification by mass spektrometry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 69 (2015) 24-33.
- [32] V. Milata, P. Segľa, V. Brezová, *Aplikovaná molekulová spektroskopía*, Slovenská technická univerzita, Bratislava 2008.

- [33] E. Christaki, E. Bonos, I. Giannenas, P. Florou-Paneri, Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds, *Agriculture* 2 (2012) 228-243.
- [34] S. H. S. Santos, Plants and their Phytochemicals Bioactive Compounds: Characterization and Role in Chronic Diseases, *Protein & Peptide Letters* 28 (2021) 723-724.
- [35] J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 117 (2013) 426-436.
- [36] M. Banožić, J. Babić, S. Jokić, Recent advances in extraction of bioactive compounds from tobacco industrial waste: A review, *Industrial Crops and Products*, 144 (2020)1-11.
- [37] F. B. Peixoto, A. C. Raimundini Aranha, D. a. Nardino, R. O. Defendi, R. M. Suzuki, Extraction and encapsulation of bioactive compounds: A review, *Journal of Food Process Engineering* 45 (2022) 1-17.
- [38] M. Kurek, N. Benaida-Debbache, I. Elez Garofulić, K. Galić, S. Avallone, A. Voilley, Y. Waché, Antioxidants and Bioactive Compounds in Food: Critical Review of Issues and Prospects, *Antioxidants* 11 (2022) 1-23.
- [39] F. Chemat, M. A. Vian, G. Cravotto, Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles, *International Journal of Molecular Sciences* 13 (2012) 8615-8627.
- [40] T. Pinto, A. Aires, F. Cosme, Bioactive (Poly)phenols, Volatile Compounds from Vegetables, Medicinal and Aromatic Plants, *Foods* 10 (2021) 1-29.
- [41] A. A. Ramazanova, G. I. Yernazarova, S. K. Turasheva, N. T. Ablaihanova, Determination of the content of biologically active substances found in some aquatic higher plants, *Pakistan Journal of Botany* 53 (2021) 1-8.
- [42] S. Subramaniam, K. R. Selvaduray, A. K. Radhakrishnan, Bioactive Compounds: Natural Defense Against Cancer?, *Biomolecules* 9 (2019) 1-15.
- [43] X. Ji, S. Shi, B. Liu, Bioactive compounds from herbal medicines to manage dyslipidemia, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 118 (2019) 1-12.
- [44] L. Diniz do Nascimento, A. A. B. de Moraes, K. S. da Costa, Bioactive Natural Compounds and Antioxidant Activity of Essential Oils from Spice Plants: New Findings and Potential Applications, *Biomolecules* 10 (2020) 1-35.
- [45] B. Kaufmann, P. Christen, Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, *Phytochemical Analysis* 13 (2002) 105-113.

- [46] J. L. Hedrick, L. J. Mulcahey, L. T. Taylor, Supercritical fluid extraction, *Mikrochim Acta* 108 (1992) 115–132.
- [47] J. A. Brinckmann, A. B. Cunningham, D. E. V. Harter, Running out of time to smell the roseroots: Reviewing threats and trade in wild *Rhodiola rosea* L., *Journal of Ethnopharmacology* 269 (2021) 1-17.
- [48] H. Tao, X. Wu, J. Cao, *Rhodiola* species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study, *Medicinal Research Reviews* 39 (2019) 1779-1850.
- [49] A. Durazzo, M. Lucarini, A. Nazhand, A. G. Coêlho, E. B. Souto, D. D. R. Arcanjo, A. Santini, *Rhodiola rosea*: main features and its beneficial properties, *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali* 33 (2022) 71-82.
- [50] K. Khanna, K. P. Mishra, L. Ganju, S. B. Singh, Golden root: A wholesome treat of immunity, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 87 (2017) 496-502.
- [51] G. G. Yousef, M. H. Grace, D. M. Cheng, I. V. Belolipov, I. Raskin, M. A. Lila, Comparative phytochemical characterization of three *Rhodiola* species, *Phytochemistry* 67 (2006) 2380-2391.
- [52] X. Zhang, L. Xie, J. Long, Q. Xie, Y. Zheng, K. Liu, X. Li, Salidroside: A review of its recent advances in synthetic pathways and pharmacological properties, *Chemico-Biological Interactions* 339 (2021) 1-20.
- [53] A. Cuerrier, K. Ampong-Nyarko, *Rhodiola rosea*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2015.
- [54] D. Chung, S. Y. Kim, J.-H. Ahn, Production of three phenylethanoids, tyrosol, hydroxytyrosol, and salidroside, using plant genes expressing in *Escherichia coli*, *Scientific Reports* 7 (2017) 1-8.
- [55] M. B. Plotnikov, T. M. Plotnikova, Tyrosol as a Neuroprotector: Strong Effects of a “Weak” Antioxidant, *Current Neuropharmacology* 19 (2021) 434-448.
- [56] N. Guo, Z. Hu, X. Fan, Simultaneous Determination of Salidroside and Its Aglycone Metabolite p-Tyrosol in Rat Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Molecules* 17 (2012) 4733-475.
- [57] S. V. Sysolyatin, Y. A. Kryukov, V. V. Malykhin, p-Tyrosol: a new synthetic method and new types of pharmacological activity, *Russ Chem Bull* 64 (2015), 2210–2214.
- [58] Q. G. Chen, Y. S. Zeng, Z. Q. Qu, J. Y. Tang, Y. J. Qin, P. Chung, R. Wong, U. Hägg, The effects of *Rhodiola rosea* extract on 5-HT level, cell proliferation and quantity of neurons at cerebral hippocampus of depressive rats, *Phytomedicine*

16 (2009) 830-831.

- [59] Ł. Sęczyk, D. Sugier, G. Derviřođlu, F. A. Özdemir, V. Kołodziej, Phytochemical profile, in vitro bioaccessibility, and anticancer potential of golden root (*Rhodiola rosea* L.) extracts, *Food Chemistry* 404 (2023) 1-10.
- [60] W. Peschel, J. M. Prieto, C. Karkour, E. M. Williamson, Effect of provenance, plant part and processing on extract profiles from cultivated European *Rhodiola rosea* L. for medicinal use, *Phytochemistry* 86 (2013) 92-102.
- [61] A. Booker, B. J. D. Frommenwiler, E. Reich, L. Zhai, Z. Kulic, M. Heinrich, The authenticity and quality of *Rhodiola rosea* products, *Phytomedicine* 23 (2016) 754-762
- [62] F. Masi, G. Chianese, R. K. Hofstetter, A. L. Cavallaro, A. Riva, O. Werz, O. Tagliatalata-Scafati, Phytochemical profile and anti-inflammatory activity of a commercially available *Rhodiola rosea* root extract, *Fitoterapia* 166 (2023) 1-6.
- [63] H. Nikolaichuk, R. Typek, S. Gnat, M. Studziński, I. M. Choma, Effect-directed analysis as a method for quality and authenticity estimation of *Rhodiola rosea* L. preparations, *Journal of Chromatography A* 1649 (2021) 1-8.
- [64] K. Khokhlova, O. Zdoryk, Authentication of *Rhodiola rosea*, *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola rosea* liquid extract from the Ukrainian market using HPTLC chromatographic profiles, *Natural Product Research* 34 (2020) 2842-2846.
- [65] A. Kucinskaite, L. Pobłocka-Olech, M. Krauze-Baranowska, M. Sznitowska, A. Savickas, V. Briedis, Evaluation of biologically active compounds in roots and rhizomes of *Rhodiola rosea* L. cultivated in Lithuania, *Medicina (Kaunas)*, 43 (2007) 487-94.
- [66] A. Tolonen, M. Pakonen, A. Hohtola, J. Jalonen, Phenylpropanoid Glycosides from *Rhodiola rosea*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 51 (2003) 467-470.
- [67] Y. Ding, K. Morozova, S. Imperiale, L. Angeli, U. Asma, G. Ferrentino, M. Scampicchio, HPLC-Triple detector (Coulometric array, diode array and mass spectrometer) for the analysis of antioxidants in officinal plants, *LWT* 162 (2022) 1-9.
- [68] M. Z. Zhumagul, M. S. Kurmanbayeva, N. O. Kudrina, K. D. Tolenova, A. S. Seilkhan, M. Höhn, GC-MS analysis of the lipophilic compounds of medicinal plant *Rhodiola rosea* L., *International Journal of Biology and Chemistry* 12 (2019) 103-111.
- [69] J. Rohloff, Volatiles from rhizomes of *Rhodiola rosea* L. *Phytochemistry* 59 (2002) 655-661.
- [70] C. Carrero-Carralero, S. Rodríguez-Sánchez, I. Calvillo, I. Martínez-Castro, A. C.

- Soria, L. Ramos, M. L. Sanz, Gas chromatographic-based techniques for the characterization of low molecular weight carbohydrates and phenylalkanoid glycosides of *Sedum roseum* root supplements, *Journal of Chromatography A* 1570 (2018) 116-125.
- [71] M. Todorova, D. Antonova, J. Staneva, L. Evstatieva, Chemical composition of the essential oils of *Rhodiola rosea* L. of three different origins, *Pharmacognosy Magazine* 6 (2010) 1-3.
- [72] L. Zhong, L. Peng, J. Fu, L. Zou, G. Zhao, J. Zhao, Phytochemical, Antibacterial and Antioxidant Activity Evaluation of *Rhodiola crenulata*, *Molecules* 25 (2020) 1-14.
- [73] Y. Z. Jin, Y. D. Cheng, Y. S. Jin, Y. H. Xuan, Identification of Tocopherols from *Rhodiola sachalinensis* by Using GC/MS, *Advanced Materials Research* 781-784 (2013) 818-821.
- [74] Y. Jin, X. Li, D. Li, K. H. Row, Primary study of sterols composition of *Rhodiola sachalinensis* by using GC/MS, *Analytical Science and Technologies*, 22 (2009) 219-227.
- [75] T. Wang, L. Peng, Y. Ai, R. Zhang, Q. Lu, Pyrolytic behaviors of decocting residues of *Rhodiola rosea*, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 129 (2018) 61-65.
- [76] <https://antecscientific.com/products/flow-cells/flexcell/>, staženo 17. dubna 2023.
- [77] L. Nováková, M. Douša, P. Česla, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.*, 2. přepracované a rozšířené vydání, Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, Brno 2021.