

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta Přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**VÝVOJ HPLC/UPLC METODIKY PRO RYCHLÝ SCREENING
SEPARACE FENOLOVÝCH KYSELIN**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor práce:
Studijní obor:

Petra Vystavělová
Ekochemie

Vedoucí práce:
Vedoucí katedry:

RNDr. Barbora Papoušková, Ph.D.
Prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Olomouc 2013

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury. Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 19.2.2013

.....
podpis

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce RNDr. Barboře Papouškové Ph.D. za cenné rady, odborné vedení, poskytnuté informace a za čas, který mi věnovala.

Souhrn

Bakalářská práce podává souhrnné informace o standardních HPLC a UPLC metodách pro stanovení fenolových kyselin. Byla provedená vlastní důsledná optimalizace separace fenolových kyselin, přičemž byl sledován vliv změny teploty, mobilní fáze a stacionární fáze na vlastní separaci fenolových sloučenin. Na základě těchto poznatků byly určeny optimální podmínky pro separaci fenolových kyselin pro HPLC, tak i UPLC. Poslední částí byla extrakce zelených čajů a identifikace jednotlivých fenolových kyselin dle jejich absorpčních maxim a retenčního času. Byla provedena kvantifikace těchto kyselin pomocí odečtení ploch píků a vytvořené kalibraci pro kyselinu vanillovou. Pomocí regresní rovnice se spočítalo množství jednotlivých fenolových kyselin v zelených čajích a přepočítalo na 1 g suché navážky.

Summary

The bachelor work includes summarizing informations about standard methods HPLC and UPLC for identification of the phenolic acids. The consistent separation of phenolic acids was executed, where the influence of temperature mobile phases and stacionary phases was monitored. Based on these observations, the optimal conditions for separation of phenolic acids for both methods were defined, for HPLC and UPLC too. The last part represented the extraction of the green tea and the identification by absorption maximum and retention time of these discovered phenolic acids. The quantification of the phenolic acids was done based on the peak areas and the calibration curve of vanillic acid. The amount of the phenolic acids in the green teas was recalculated using the regress equation per one gram of the dry substance.

Obsah

1. Úvod	1
2. Teoretická část	2
2.1. Teoretické základy chromatografického procesu	2
2.2. Kapalinové chromatografie	3
2.3. Praktické využití a srovnání HPLC a UPLC	3
2.4. Fenolové kyseliny a jejich základní charakteristika	6
2.4.1. Kyselina skořicová	6
2.4.2. Kyselina benzoová	7
2.4.3. Kyselina chlorogenová	7
2.4.4. Kyselina kávová	7
2.5. HPLC a fenolové sloučeniny	8
2.6. UPLC a fenolové kyseliny	10
3. Experimentální část	12
3.1. Pomůcky a chemikálie	12
3.2. Příprava vzorků	12
3.3. Výsledky a diskuse	14
3.3.1. Optimální podmínky separace fenolových kyselin (HPLC)	14
3.3.1.1. Optimalizace HPLC, oktadecilová stacionární fáze, kyselina octová, acetonitril	15
3.3.1.2. Identifikace standardů fenolových kyselin	20
3.3.1.3. Optimalizace HPLC, fenylová stacionární fáze, kyselina octová, acetonitril ..	21
3.3.1.4. Optimalizace HPLC, oktadecilová stacionární fáze, kyselina mravenčí, acetonitril	24
3.3.1.5. Optimalizace HPLC, fenylová stacionární fáze, kyselina mravenčí, acetonitril	25
3.3.2. Optimální podmínky separace fenolových kyselin (UPLC)	28
3.3.2.1. Optimalizace UPLC, oktadecilová stacionární fáze, kyselina octová, acetonitril	28
3.3.2.2. Optimalizace UPLC, fenylová stacionární fáze, kyselina octová, acetonitril ..	31
3.3.2.3. Optimalizace UPLC, oktadecilová stacionární fáze, kyselina octová, metanol	34
3.3.2.4. Optimalizace UPLC, fenylová stacionární fáze, kyselina octová, methanol ...	35
3.3.2.5. UPLC, oktadecilová kolona, 2% kyselina mravenčí, acetonitril	37
3.3.2.6. Optimalizace UPLC, fenylová stacionární kolona, kyselina mravenčí, acetonitril	39
3.3.2.7. UPLC, oktadecilová kolona, 2% kyselina mravenčí, metanol	41
Zkusila jsem jako poslední možnost nakombinovat kyselinu mravenčí a methanol ...	41
3.3.2.8. Optimalizace UPLC, fenylová stacionární kolona, kyselina mravenčí, metanol	42
3.3.2.9. Zhodnocení optimálních podmínek HPLC a UPLC	43
3.3.3. Extrakce zelených čajů	44
3.3.4. Vyhodnocení metodou kalibrační přímky	48
4. Závěr	54
5. Použitá literatura	54
6. Seznam zkratk	58

1. Úvod

Chromatografie je velice významnou analytickou metodou, která umožňuje separaci a stanovení mnoha organických i anorganických látek. V roce 1903 byla chromatografie objevena ruským botanikem M.S.Cvetem, který na sloupci sorbentu separoval listová barviva. Tato původní chromatografie na sloupci uměla separovat i složité přírodní látky, ale provázela ji řada chyb a nedostatků, kvůli kterým byla zapomenuta. Hodně let byla daleko za chromatografií tenkovrstvou, papírovou nebo plynovou. Problém byl s používanými sorbenty, které měly malou účinnost. Průtok kolonou byl způsoben jen gravitační silou. Později se urychlily chromatografické procesy, a to použitím menších částic v koloně. Tímto se však začaly používat HPLC pumpy, které jsou nutné k překonání tlaku na chromatografické koloně^{1,2}.

Teprve vysoká úroveň laboratorních technik a přístrojů zvýšila zájem o sloupcovou (kolonovou) chromatografii. Dnes patří mezi nejdůležitější analytické metody. Obecně všechny metody, které mají základem postupné a opakované dělení látek mezi dvě či více fází, vychází z různých fyzikálních a chemických vlastností, jsou označovány jako chromatografické metody. Separace se rozděluje na dvě základní skupiny. První je založena na rovnovážné distribuci složek daného vzorku mezi dvě dané fáze^{2,3}, další skupinou separačních metod jsou ty, při kterých je třeba použít působení magnetického, elektrického nebo gravitačního pole. Jde o interakce separovaných látek se stacionární a mobilní fází. Stacionární fází je obecně nějaký sorbent, který na sobě zachycuje separované látky a mobilní fází je u kapalinové chromatografie kapalina, která látku unáší přes sorbent^{3,4}.

Vysokou účinnou kapalinovou chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) a ultra účinnou kapalinovou chromatografie (UHPLC, UPLC – Ultra Performance Liquid Chromatography) jsou dnes nejčastěji používané metody, mají vysokou účinnost a reprodukovatelnost.

2. Teoretická část

2.1. Teoretické základy chromatografického procesu

Při chromatografickém procesu se uplatňuje rovnovážná distribuce složek mezi dvě fáze mobilní a stacionární. Zde dochází k rychlému ustalování rovnováhy při separaci složek. Například distribuce složky A mezi dvě fáze lze popsat distribuční (rozdělovací) konstantou K_D ^{1,2}. Vyjadřuje poměr rovnovážných koncentrací dané složky A ve dvou koexistujících fázích. Hodnoty distribuční konstanty nabývají různých velikostí. Pokud je látka zadržována ve stacionární fázi déle, má delší retenční čas a K_D je větší.

Každá separovaná složka má svůj retenční čas t_R a retenční objem V_R ^{1,2}. Retenční neboli eluční čas vyjadřuje dobu, která uběhne od nástřiku analyzované látky do dosažení maximální hodnoty eluční křivky a retenční neboli eluční objem vyjadřuje prošlý objem za tuto dobu retenčního času.

Existují ještě veličiny jako mrtvý objem^{3,5}, který je od nástřiku mobilní fáze přes kolonu až po detektor. Mrtvý objem V_M se zjišťuje experimentálně. Dále pak mrtvý retenční čas, to je čas od nástřiku pro danou látku, která není vůbec zadržována. Na ose x vidíme čas a na ose y intenzitu signálu jako odezvu detektoru, která je funkcí koncentrace složky v mobilní fázi.

Při separaci se mohou používat dva druhy eluce^{5,6}, izokratická a gradientová. Při izokratické eluci jsou u chromatografického procesu konstantní podmínky. Složky vzorku jsou vymývány z kolony za konstantního složení mobilní fáze. Jednotlivé složky vzorku migrují jinou rozdílnou rychlostí, proto má každý jinou eluční rychlost. Tento typ eluce je jednoduchý, ale nikdy nedosáhneme téměř dokonalé separace. Gradientová eluce složky vzorku vymývá postupně, látky se zadržují v koloně kratší dobu díky vysoké eluční síle mobilní fáze B. Při této eluci můžeme měnit poměr mobilních fází, složky se začnou z kolony vymývat, při zvyšování poměru mobilních fází se postupně vymyjí všechny složky vzorku.

2.2. Kapalinové chromatografie

Principem kapalinové chromatografie obecně je rovnovážné dělení látky mezi dvě fáze. Pokud má separovaná složka vyšší afinitu ke stacionární fázi, je na ní déle zachycována. Druhým případem je, že látka je eluována v mrtvém čase, to znamená, že separovaná látka nemá žádnou afinitu ke stacionární fázi^{1,3,4}. Stacionární fázi tvoří chromatografická kolona, která může být naplněna různými absorbenty jako silikagel, oxid hlinitý, používají se také chemicky vázané stacionární fáze na silikagelovém nosiči³. Vzorke jsou dávkovány do mobilní fáze, která složky unáší na kolonu. Mezi stacionární a mobilní fází dochází opakovaně k rovnovážným stavům a k separaci látek. Detekce těchto látek, které jsou stále v mobilní fázi, probíhá v tzv. průtokové cele detektoru. Grafickým záznamem je chromatogram, ve kterém je znázorněna závislost odezvy detektoru na retenčním čase. Kapalinový chromatograf³ se skládá ze zásobníků mobilních fází, odplyňovače, směšovače, který nám vytvoří požadovanou směs mobilních fází a při gradientové eluci dále připravuje nastavené poměry mobilních fází, vysokotlakých čerpadel, vícecestného ventilu, chromatografické kolony, autosampleru (dávkovací zařízení), detektoru, jímače frakcí a záznamového zařízení².

2.3 Praktické využití a srovnání HPLC a UPLC

High Performance Liquid Chromatography^{7,8}, zkratkou HPLC je vysokoúčinná kapalinová chromatografie, která se řadí mezi separační metody. Dokáže rozdělit jak anorganické, tak i organické látky, a to i méně těkavé kapalně látky a pevné látky. Tyto látky jsou rozpustné ve vodě, organických rozpouštědlech nebo ve zředěných kyselinách. Mobilní fáze je ve složení kapalném. Mobilní fází může být voda, organická rozpouštědla.

UPLC⁹ je nově rozvinutá separační metoda, při které se pracuje s velmi vysokým tlakem, širokým rozsahem průtoků a k separaci je potřebná kratší doba. UPLC má řadu výhod oproti HPLC. Mezi nejdůležitější se řadí kratší doba analýzy, snížení nákladů, zvýšení separační účinnosti, zvýšení citlivosti^{8,9}. UPLC kolony se plní za vysokého tlaku, zachová se

stabilita částic sorbentu. Zvýšení citlivosti a účinnosti je způsobeno velikostí částic kolem 1,7 μm .

Autoři Ghasem Haghi¹⁰ *et al.* uvádí tento článek o analýze semen, listů a kořenů lopuchu pomocí HPLC a UPLC s detektorem s diodovým polem. Separace byla provedena na oktadecilové koloně (C18), bylo použito 5% kyseliny octové ve vodě a acetonitrilu při vlnové délce 330 nm. Srovnání obou metod bylo v závěru nakloněno UPLC, protože je metoda rychlejší, přináší přesnější a užší píky, vyšší citlivost a snižuje spotřebu mobilních fází. Tito autoři použili tyto podmínky ke stanovení kyseliny chlorogenové.

HPLC používala C18 kolonu (250 x 4,6mm) při 30 °C. Byla použita gradientová eluce s 5% kyselinou octovou ve vodě jako rozpouštědlo A a rozpouštědlo B byl acetonitril. Startovací podmínky začaly na 8% - 26% A během 40 minut, dále pak během 10 minut z 26%-48%. Průtok byl 1ml/min. Při UPLC byla použita C18 kolona a mobilní fáze byly stejné jako u HPLC. Gradientová eluce začínala na 8-22%. A během 25 minut o průtoku 0,25 ml/min. Každý vzorek měl nástřík celkem třikrát. Výsledky ukázaly, že kyseliny chlorogenové je obsaženo více v kořincích než v listech nebo semenech. Autor¹⁰ vyhodnotil UPLC jako metodu výhodnější. Uvedl, že UPLC je schopná analyzovat 33 sloučenin během 20 minut.

Pomocí UPLC stanovili fenolické kyseliny také španělští vědci¹¹, kteří jsou autory článku o obsahu fenolických kyselin v lidském vylučovacím ústrojí. Celkem se pokoušeli stanovit 47 fenolických sloučenin. Mezi nimi se objevila například kyselina benzoová, syringová, p-kumarová, 4-hydroxybenzoová. Celková analýza trvala 18 minut. Mobilní fáze byla směs acetonitrilu a vody (1:4). Výzkumu se zúčastnili lidé, kteří dodržovali normální stravovací návyky. Autoři Fernando Sánchez *et al.*¹¹ došli k závěrům, že použitá UPLC metoda ve spojení s hmotným spektrometrem má vysokou citlivost a řadí se mezi rychlé analytické metody, při analýze můžeme používat velice vysoké tlaky na kolonách. Autor uvádí, že UPLC ve spojení s MS je vhodnou technikou pro detekci látek fenolického charakteru v biologických tekutinách. UPLC tedy dokázala stanovit 47 fenolických kyselin v lidském vylučovacím ústrojí.

Další autoři Ali Khodami *et al.*¹² vydali článek o různých vývojových technikách pro získání fenolických sloučenin v rostlinách. Jednoduché fenolické sloučeniny jsou součástí rostlin, autoři zmiňují hlavně kyselinu benzoovou, skořicovou, kumarovou a flavonoidy. Pro stanovení fenolických sloučenin použili HPLC, GC nebo jejich spojení s MS, to jsou dvě hlavní metody pro kvantifikaci fenolických sloučenin. HPLC je preferovanou metodou v dnešní době pro separaci a kvantifikaci fenolických sloučenin²⁰. Analýzu pomocí HPLC samozřejmě ovlivňují některé faktory, mezi ně patří složení mobilních fází, typy kolon, detektor¹⁴.

Autoři¹² použili jako hlavní mobilní fáze roztok acetonitrilu, metanolu u HPLC pro stanovení fenolických kyselin. V některých případech použili etanol a tetrahydrofuran (THF). Je také doporučena hodnota pH mobilních fází, je určena mezi 2-4, kyselé pH se musí udržovat kvůli zabránění ionizace fenolických kyselin během jejich identifikace. Proto vodné okyselené roztoky obsahují hlavně kyselinu octovou. Autor však zmiňuje použití i kyseliny mravenčí a fosforečné^{14,15}. Gradientová eluce je více používaná než isokratická. Čas analýzy u HPLC je dalším faktorem ovlivňující detekci fenolických kyselin a může mít rozsah od 10 minut do 150 minut. Rogerro *et al.*¹⁶ vyzdvihuje vysokou produktivitu výsledků, když se analýza dlouho drží při konstantní teplotě.

Autoři¹² shrnují ve svojí práci možné zdroje získání fenolických kyselin a jejich stanovení v rostlinách, jejich vliv na lidský organismus a největší součástí jsou použité metody. Biologie fenolických látek vede řadu výzkumů k objevení, změnám a upotřebením metod pro extrakci, separaci a stanovení těchto sloučenin z přírodních zdrojů. Tyto metody musí být jednoduché, rychlé, neškodné životnímu prostředí a komplexní.

Yong-Jiang Xu, Kenn Foubert, Liene Dhooghe¹⁷ zkoumali rod Rubiaceae pomocí UPLC-MS a HPLC-SPE-NMR. Tyto rostliny mají dobrý účinek na malarii, jak ukázali už předchozí studie. Autoři se v závěru také přiklání k použití UPLC.

Dalšími autory, kteří použili ke stanovení fenolických sloučenin UPLC jsou Nessana Dartora *et al.*¹⁸, zaměřili se ve své práci na čaj Maté, který je oblíbeným nápojem v mnoha státech. Zkoumali jak čaj pěstovat a co v růstu ovlivňuje koncentraci fenolických sloučenin v čaji. Pro analýzu použili UPLC, které razantně snížilo čas analýzy, stanovení jedné celkové

analýzy trvalo 3 minuty. Analýza pomocí HPLC byla u tohoto čaje již provedena v dřívě, ale celkový čas trval déle.

Mehmet Gumustas *et al.*¹⁹ ve své práci popisuje rozdíly mezi UPLC a HPLC ve spojení s analýzou léčiv. HPLC i UPLC jsou metody schopné separovat jednotlivé složky ve vzorku. Autor tvrdí, že UPLC je speciální HPLC.

Hlavní omezení HPLC je špatná účinnost této metody oproti ostatním. Nízká difúze mobilní fáze vnesená do pomalé difúze stacionární fáze má za následek velmi dlouhý čas celkové analýzy. Postupem času dochází k vývoji, ale zároveň upadání HPLC, protože je k analýzám potřebný kratší čas. Použití kolony s menšími částicemi u UPLC má vliv na vysokou citlivost a účinnost separace, na tvar píků a hlavně možnost pracovat s vyššími tlaky. UPLC může dosáhnout dvakrát většího tlaku než HPLC²¹. Autor²⁰ upřednostňuje UPLC díky kratší době analýzy a vyšší citlivosti záznamu. Nástřik vzorku je desetkrát rychlejší než u HPLC, tvary píků jsou lepší, obecně celý chromatogram. Autor²¹ zmiňuje jedinou nevýhodu, a tou je cena UPLC.

2.4. Fenolové kyseliny a jejich základní charakteristika

Sloučeniny fenolického charakteru se mohou vyskytovat samostatně, ale většinou společně i s dalšími fenolickými látkami. Převážně jsou obsaženy v rostlinách. Jde o organické látky. Jsou charakterizovány přítomností minimálně jednoho aromatického cyklu s jednou nebo více hydroxylových skupin. Některé z jejich hydroxylových skupin se běžně oxidují, vážou methylovou skupinu nebo se spojují do cukrů, karboxylových kyselin. Fenolické sloučeniny jsou přítomny v biosyntéze zvířecích pigmentů, v struktuře rostlinných buněk. Některé fenolické sloučeniny se dokážou redukovat na alkoholy, aldehydy, alkany nebo alkeny a jsou součástí květinových výtažků, ovocných a zeleninových pachů a chutí. Mají léčivé účinky, antioxidační, působí proti rakovině²¹.

2.4.1. Kyselina skořicová

Biosyntéza kyseliny skořicové zahrnuje mnoho chemických reakcí. Původní sloučeninou pro biosyntézu kyseliny skořicové je amino kyselina fenylalanin. Všechny rostliny mají schopnost přeměnit fenylalanin na kyselinu skořicovou. Dále je pak známá

přeměna tyrosinu na 4-hydroxyskořicovou kyselinu, triviálním názvem p-kumarovou. Ta je ale velice omezena, protože kyselina 4-hydroxyskořicová se soustředí v rostlinách rodu Poaceae. Rostliny rodu Poaceae zahrnují cukrovou třtinu, bambus, cereálie a rákos. Existují však další kyseliny, které mají společnou kyselinu skořicovou jako základ. Jde o 3,4-dihydroxyskořicovou kyselinu, triviálním názvem kyselina sinapová, 4-hydroxy-3-metoxyskořicová kyselina, triviálním názvem kyselina ferulová. Tyto odvozené kyseliny mohou být získány například hydroxylací a metylací²¹.

2.4.2 Kyselina benzoová

Kyselina benzoová a od ní odvozené kyseliny jsou produkovány z fenylalaninu mikroorganismy a vyššími houbami. Jde o bílé, krystalické látky. Kyselina benzoová je sama o sobě nejjednodušší aromatická kyselina. Od kyseliny benzoové jsou odvozeny 4-hydroxy-3,5-dimetoxybenzoová kyselina, triviálním názvem kyselina swingová, 3,4,5-trihydroxybenzoová kyselina, což je triviálně kyselina gallová, 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, to je kyselina gentisová. Další 4-hydroxy-3-metoxybenzoová kyselina, kyselina vanilová. V těle se odbourává na kyselinu hippurovou, která je vylučována močí z těla ven²⁴.

2.4.3. Kyselina chlorogenová

Kyselina chlorogenová je hlavní fenolická sloučenina vyskytující se v kávě. Malé množství se získává z čajových lístků, kakaových bobů, jablek, hrušek, brambor a samozřejmě dalšího ovoce a zeleniny. Kyselina chlorogenová a od ní odvozené kyseliny jsou velice důležité pro typickou chuť kávy a mají zdraví prospěšné účinky, například antioxidační, hypoglykemické, imunitní. Obsah kyseliny chlorogenové a jejich derivátů závisí na typu kávových zrn. Během pražení kávy se kyselina chlorogenová odbourává. Hlavní sloučeninou pro biosyntézu kyseliny chlorogenové jsou feruloylchininová, 4-hydroxykumarová kyselina²¹.

2.4.4. Kyselina kávová

Kyselina kávová a její deriváty se rozmanitě vyskytují v ovoci, bylinách a jsou důležité pro jejich antioxidační vlastnosti a používají se jako doplněk stravy. Její ester kyselina rozmarýnová jsou známy v rodu Lamiaceae a Boraginaceae, které se využívají

v lékařství a kuchyni. Příkladem je rozmarýn, oregáno, šalvěj, tymián. Objevují se také v nižších rostlinách jako jsou kaprad'orosty²¹.

2.5.HPLC a fenolové sloučeniny

O fenolových sloučeninách je všeobecně známo, že se vyskytují ve všech rostlinách. Zahrnují fenoly, kyselinu benzoovou, kyselinu skořicovou, kumariny a například flavonoidy. Hlavní metodou získání fenolických sloučenin je extrakce organickým rozpouštědlem. Použití spektrofotometrie a chromatografie nám slouží ke stanovení množství a identifikování fenolové sloučeniny, tvrdí ve své práci Ali Khoddami *et al*²⁵. Rostliny jsou velmi bohaté na fenolické sloučeniny, jejich molekuly působí jako antioxidanty, proti srdečním potížím, snížení zánětlivosti, nižší výskyt rakoviny a cukrovky. Proto bychom měli do naší stravy zahrnout více ovoce, zeleniny a luštěnin.

Základní strukturou fenolických sloučenin je aromatický cyklus spojený s nejméně jednou hydroxylovou skupinou. Fenolické kyseliny jsou z rostlin získávány jako estery, amidy, glykosidy a méně často ve volné podobě. Fenolických kyselin je celá řada, jedna od druhé jsou odlišeny počtem a umístěním hydroxy skupiny na aromatickém jádře. Jsou však rozděleny na dvě hlavní skupiny, na kyseliny hydroxybenzoové a kyseliny hydroxyskořicové. Mezi deriváty kyseliny skořicové patří kyselina ferulová, kávová, p-kumarová, sinapová. A mezi deriváty kyseliny benzoové zahrnujeme kyselinu galovou, vanilovou a syringovou.

Nejdůležitějšími kroky je příprava vzorku a jeho vyextrahování. Pro identifikaci jednotlivých kyselin pak může být následně použita GC, HPLC. V naší stravě jsou hlavními zdroji fenolických sloučenin luštěniny, cereálie, ovoce, zelenina, kava, čaj²⁶.

Volbu metody ke stanovení fenolických sloučenin ovlivňuje několik parametrů, například matrice vzorku, struktura molekuly, polarita, koncentrace a počet aromatických jader a hydroxy skupin. Je velice těžké vybrat jednu metodu pro celou škálu fenolických sloučenin u tolika druhů rostlin^{18,20}.

Rostlinné vzorky musí být vysušeny vymrazováním, sušením na vzduchu nebo v peci. Tento autor²⁵ tvrdí, že extrakce je mnohem účinnější při vysoušení vzorku vzduchem ve stínu než při vysoušení vzorku v peci. Vysušené vzorky jsou rozemlety, oproti tomu kapalné vzorky jsou rozděleny centrifugací, filtrací. Procesy zbavování tuků jsou přítomné pokud má rostlina ve struktuře obsažený lipid. Zbavování tuků popsal p.Weidner. Autor Ali Khoddami²⁵ dále

popisuje postup extrakce. Můžeme použít organické nebo anorganické rozpouštědlo. Extrakci ovlivňuje mnoho parametrů, například teplota, čas vyextrahování. Výběr rozpouštědla je také velmi důležitý, ovlivňuje výtěžek celé extrakce. Autor popisuje, že výborného výtěžku se dosáhne při extrakci listu čiroku pomocí vody a na druhé straně k extrakci pšeničných otrub je potřeba 80% etanol. Největší výtěžku extrakce se dosáhlo při extrahování vinné révy, slunečnicového šrotu užitím metanolu a 80% acetonu. Tyto rozdíly mohou přispět k poznání a volbě daného rozpouštědla. Důležitými parametry jsou také čas a teplota. Zvyšování teploty a času se většinou zvyšuje i rozpustnost látek, u fenolických sloučenin to však neplatí²⁵.

Naczka *et al.*²⁷ říká, že na extrakci olejovitých rostlin stačí pouze dvě minuty při pokojové teplotě.

Co se týká určení množství fenolických sloučenin, nejznámějšími metodami jsou HPLC, GC a mohou být v kombinaci s hmotnostním spektrometrem²⁶. Separaci pomocí HPLC ovlivňuje čistota daného vzorku, mobilní fáze, typ použité kolony a detektor. Autor²⁴ uvádí, že čisté separované látky pomocí HPLC byly separovány na koloně C18 a detekovány byly pomocí detektoru s diodovým polem. Byly použity polární organická rozpouštědla kyselého charakteru. Autor používal tedy kolonu C18 Bondapak (300 mm x 3,9 mm ID x 5 μ m)/PDA. Jako rozpouštědlo použil poměr vody : metanolu : kyseliny octové (85:14:1), průtok 1 ml/min. separace proběhla během 45 minut a byla provedena z extraktu mangosteny.

Jako další příklad autor²⁶ uvádí extrakci jablka a identifikoval kyselinu galovou a chlorogenovou. Použita byla opět kolona C18 (250mm x 4,6mm ID x 4 μ m)/PDA.

Jako poslední příklad uvedu extrakci žitného zrna a separovaly ho na koloně Inertsil ODS-3 (150mm x 4mm ID x 3 μ m)/PDA. Takto byla separována kyselina sinapová, vanilová, nerulová, kávová, p-kumarová a p-hydroxybenzoová.

Jako nejčastěji používané mobilní fáze autor²⁶ zmiňuje metanol, acetonitril. Také 2-propanol nebo etanol. Důležitý poznatek je ohledně pH mobilních fází, mělo by se pohybovat mezi 2-4. Mezi vodní okyselené mobilní fáze patří kyselina octová a mravenčí. Častěji využívaná je gradientová eluce.

Výběr kolony je také důležitou součástí nastavení optimálních podmínek separace. Jsou uvedeny C18, reverzibilní C18 o délce 10-30 cm, 3,9-4,6 mm ID, 3-10 μ m velikosti částic sorbentu uvnitř kolony. Jsou zmíněny i nové kolony o rozměrech 3-25 cm, 1-4,6 mm ID, 1,7-10 μ m velikosti částic sorbentu. Ty jsou však užívány novou metodou kapalinové chromatografie, a to UPLC. Fenolové sloučeniny jsou detekovány nejčastěji PDA a UV-VIS při vlnové délce 190-380 nm.

Závěrem se uvádí, že v uvedených potravinách jako cereálie, ovoce, zelenina, čaj atd. jsou obsaženy fenolické sloučeniny a mají pozitivní vliv na zdraví člověka²⁵. Pro získání těchto sloučenin je potřeba zjistit ideální podmínky pro extrakci a následnou identifikaci těchto látek. Tyto zvolené metody nesmí být v rozporu se životním prostředím, musí být ekonomicky výhodné a rychlé¹⁸.

María Elena Cartera *et al.*³⁰ píše ve svém článku o fenolických sloučeninách jako o velmi rozšířené skupině látek vyskytujících se v rostlinné říši. Dle jejich struktury se rozdělují do mnoha skupin. Mají obrannou funkci na rakovinu a srdeční onemocnění díky svým antioxidačním vlastnostem. Autoři se zaměřili hlavně na brukvovité rostliny.

Hydroxyskořicová kyselina a její deriváty jsou charakterizovány strukturou C3-C6. Tyto sloučeniny se hojně vyskytují v rostlinách, buď volně nebo v buněčné stěně rostlin. Konkrétně v brukvovitých rostlinách jsou obsaženy p-kumarová, sinapová, nerulová, často ve spojení s další hydroxyskořicovou kyselinou nebo cukrem. Zajímavým poznatkem je studie Lin C. H. Chang²⁸. Vybranou potravinou byla brokolice, kterou považili a zjistili, že považení zeleniny nemá žádný vliv na antioxidační účinky. Jiná studie říká, že jakékoliv zpracování zeleniny ovlivňuje antioxidační účinky. Studii provedl Sultana *et al.*²⁹ na zelí, květáku a bílém tuřínu.

2.6.UPLC a fenolové kyseliny

Mauritia Flexulosa je palmový strom v Jižní Americe v amazonském deštném lese. Jeho extrakt je součástí potravy, je užíván v kosmetice a medicíně. Tento článek pojednává o antioxidačních vlastnostech a charakterizuje jednotlivé fenolové sloučeniny, které obsahuje.

Autor článku Hector H.F. Koolen *et al.*²⁶ odebral během června vzorky tří různých druhů palmového stromu v Amazonii. Šlo o vzorek kmene, listů a zelených plodů. Vzorky kmene byly extrahovány hexanem : dichlormethanem (1 : 1). Analýza proběhla v kolonách UPLC ve spojení tandemu MS/MS, 0,5 g extraktu bylo rozpuštěno ve vodě s MeCN (1:1) a pH bylo přiblíženo hodnotě 6, a to pomocí 30% NH₄OH.

K analýze pomocí UPLC byl použit přístroj WATER ACQUITY Ultrapformance chromatography systém, vybaven binární pumpou. Autor používal kolonu od firmy Acquity UPLC BEH Column (50 mm x 2,1 mm ID, 1,7 μm velikost částice). Jako mobilní fázi A užil vodu a jako mobilní fázi B použil acetonitril. Tento článek nepojednává přímo o fenolických kyselinách, ale z fenolových sloučenin si vybral flavonoidy, antokyaniny.²⁶

V dalším článku se autor Mohamed A. Farag *et al.*³¹ zmiňuje o kompletním složení polyfenolů v brukvovitých rostlinách. Brukvovité rostliny zahrnují například řepku a další olejovité rostliny. Řepka olejka je velmi důležitým produktem pro výrobu oleje, který je charakteristický nízkým obsahem nasycených mastných kyselin. Současné studie dokázali, že pro charakterizaci a identifikaci fenolových sloučenin v rostlinách je vhodnou metodou HPLC, pro detekci detektor s diodovým polem. Ve srovnání s UPLC je ale metodou méně výhodnou. Píky jsou ostřejší, vyšší citlivost, menší spotřeba roztoků.

Vzorek brukvovité rostliny byl odebrán z výzkumné zemědělské farmy v Egyptě. Rostliny byly sklizeny v dubnu až květnu.

Fenolové sloučeniny byly charakterizovány jejich UV-VIS spektrem při vlnových délkách 220-600 nm. Fenolové kyseliny jsou ve strukturách spojovány s cukry nebo organickými kyselinami. Přítomnost fenolových kyselin přispívá k typické chuti a vůni řepkového šrotu. V této studii byly identifikovány tři kyseliny hydroxyskořicové, a to kyselina sinapová, kyselina ferulová a ester kyseliny jablečné. Závěrem autor uvedl, že podmínky separace na UPLC mohou být použity pro separaci dalších fenolových sloučenin v rostlinné říši³¹.

3. Experimentální část

3.1 Pomůcky a chemikálie

Pracovala jsem s kyselinou mravenčí 95%, kyselinou octovou 99%, acetonitrilem a methanolem. Chemikálie jsou od firmy The Geyer, Im Wesertal 11, 37671 Höxter, Německo. Mobilní fáze byla tvořena 2% kyselinou mravenčí, 2% kyselinou octovou, methanolem a acetonitrilem.

Ke své práci jsem použila Waters Acquity UPLC System - Waters Corporation 34 Maple Street, Milford, MA 01757; PDA detektor (200 – 500 nm), od firmy Elma, ultrazvuk Elmasonic S 40H, Kolpingstr. 1-7, 78224 Singen, Germany a analytické váhy Millipore Toledo, 0,1 mg; Mettler-Toledo s.r.o., Třebohostická 2283/2, 100 00 Praha 10.

Pracovala jsem se dvěma typy kolon. Pro HPLC system jsem používala kolonu oktadecilovou od firmy Agilent Technologies, Zorbax Eclipse XDB – C18, Narrow Bore – 2,1 x 150 mm, 5 – Micron a kolonu fenylovou, také od firmy Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse XDB – Phenyl, Narrow – Bore 2,1 x 150 mm, 5 – Micron. Pro UPLC system jsem používala také dvě kolony. Tyto kolony byly od firmy Acquity Ultra Performance, kolona oktadecilová Acquity UPLC BEH C18 1,7 μm ; 2,1 x 100 mm Column a kolona fenylová, také od firmy Acquity Ultra Performance, UPLC BEH Phenyl 1,7 μm ; 2,1 x 100 mm Column.

3.2 Příprava vzorků

První částí byla příprava standardů fenolových kyselin. Standardy byly připraveny semi-preparativní kapalinovou chromatografií z rostlinných extraktů. Čistota standard je vyšší než 98%, ověřeno pomocí hmotnostní spektrometrie. Navážka standardy byla 1mg, rozpouštěna v 1ml MeOH a doplněna 2% kyselinou octovou nebo 2% kyselinou mravenčí do objemu 10 ml. Všechny vzorky byly filtrovány přes teflonový mikrofiltr PTFE 0,45 μl do vialek o objemu 1 ml od firmy Phenomenex. Fenolových kyselin bylo vybráno celkem 10, a to na základě předpokládaného výskytu v zelených čajích, kterými jsem se ve své práci v

závěru zabývala. Měřené vzorky byly připraveny přidavkem 10 μl dané fenolové kyseliny a doplněny do 1 ml 2% kyselinou octovou nebo 2% kyselinou mravenčí. Pokud jsem měla jako mobilní fázi kyselinu octovou, použila jsem ji i jako rozpouštědlo. Takto bylo vytvořeno deset vzorků a nakonec směs těchto kyselin. Ve vialce tedy bylo obsaženo 10 μl od každé kyseliny a 900 μl kyseliny octové nebo mravenčí. V tabulce 1 jsou uvedeny přesné navážky standard fenolových kyselin a množství MeOH, ve kterém se rozpouštěly.

název kyseliny	navážka	objem MeOH
kyselina gallová	0,00142 g	1420 μl
kyselina chlorogenová	0,00117 g	1170 μl
kyselina gentisová	0,00137 g	1370 μl
kyselina p-kumarová	0,00142 g	1420 μl
kyselina ferullová	0,00105 g	1050 μl
kyselina kávová	0,00105 g	1050 μl
kyselina vanillová	0,00141 g	1410 μl
kyselina syringová	0,00136 g	1360 μl
kyselina skořicová	0,00134 g	1340 μl
kyselina 3-hydroxyskořicová	0,00140 g	1400 μl

Tabulka 1: Navážky fenolových kyselin

V závěru práce byly připraveny měřené vzorky z extrakce zelených čajů. Bylo vybráno pět zelených čajů z pěti různých zemí. U každého byla provedena extrakce horkou vodou (destilovanou) dle postupu přípravy daného čaje. Čtyři z nich se měly zalít horkou vodou v rozmezí 70 – 80 $^{\circ}\text{C}$, nechat louhovat 2 – 3 minuty. Dávkování bylo na 1,5 dcl dát jednu čajovou lžičku. Pátý čaj se připravoval trochu jiným způsobem, dávkování bylo stejné, ale zalít se měl vodou při 90 $^{\circ}\text{C}$ a louhovat pouze 1 minutu. Takto připravené extrakty byly přefiltrovány do vialky přes teflonový mikrofiltr 0,45 μm .

Kvantifikace obsahu fenolových kyselin v zelených čajích se prováděla na kyselinu vanillovou. Ve své práci jsem pracovala na kalibraci kyseliny vanillové. Koncentrace byly následující: 0,5 mg/l; 2 mg/l; 10 mg/l; 25 mg/l; 50 mg/l. Pro koncentraci 0,5 mg/l jsem do vzorku dala 5 µl standard kyseliny vanillové a 495 µl 2% kyseliny octové. Pro koncentraci 2 mg/l jsem přidala 20 µl standardy kyselin vanillové a 480 µl 2% kyseliny octové, pro koncentraci 10 mg/l jsem přidala 100 µl standardy a 400 µl kyseliny octové, pro koncentraci 25 mg/l jsem dala 250 µl standardy a 250 µl kyseliny octové a nakonce pro 50 mg/l jsem dala 25 µl a 475 µl kyseliny octové. Vzorek jsem opět přefiltrovala přes mikrofiltr PTFE 0,45 µl. V tabulce 2 uvádím ještě jednou vzorky s danou koncentrací kyseliny vanillové.

koncentrace	Přidaný objem kyseliny vanillové
0,5 mg/l	5 µl
2 mg/l	20 µl
10 mg/l	100 µl
25 mg/l	250 µl
50 mg/l	25 µl

Tabulka 2: Příprava vzorků na kalibraci kyseliny vanillové

3.3 Výsledky a diskuse

3.3.1 Optimální podmínky separace fenolových kyselin (HPLC)

Hledání optimálních podmínek separace fenolových kyselin probíhalo ve čtyřech fázích. Separace fenolových kyselin byla vyzkoušena na dvou kolonách o stejných parametrech. První kritérium selektivity tedy představuje stacionární fáze kolony. Dalším kritériem je složení mobilních fází, pracovala jsem s kyselinou octovou, mravenčí, s metanolem a acetonitrilem. Posledním důležitým bodem byla optimalizace teploty na koloně pro separaci fenolových kyselin. První částí bylo použití běžné standardní oktadecilové kolony při složení mobilní fáze 2% kyseliny octové a acetonitrilu. Teplota na koloně byla 25 °C. Pro separaci byla zvolena gradientová eluce, která se samozřejmě taky během mé práce optimalizovala. Pracovalo se v kyselém prostředí, protože fenolové kyseliny jsou obecně při nižším pH nedisociované a tudíž mají vyšší retenci na reverzní fázi a rovněž tedy i vyšší

potenciál pro úspěšnou separaci. Výchozí podmínky byly použity na základě vědeckých článků jiných autorů, které cituji ve své práci. Tito autoři použili mobilní fáze o složení methanol, acetonitril a jednoduché organické kyseliny, mravenčí a octovou.

3.3.1.1 Optimalizace HPLC, oktadecilová stacionární fáze, kyselina octová, acetonitril

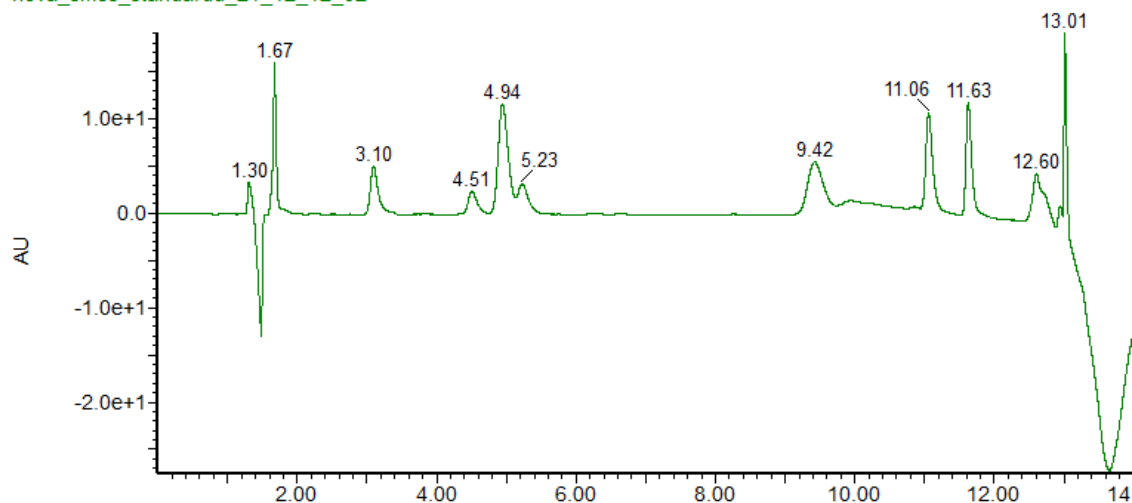
Mobilní fáze A	2% CH ₃ COOH
Mobilní fáze B	ACN
Čas analýzy	15 min
Tlak na koloně	350 bar
Teplota kolony	25 °C

Tabulka 3: Podmínky analýzy

čas	průtok	A%	B%
začátek	0,250 ml	90	10
11.minuta	0,250 ml	70	30
12.minuta	0,250 ml	5	95
13.minuta	0,250 ml	95	5
15.minuta	0,250 ml	95	5

Tabulka 4: Gradientová eluce

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentsic, felluric, cinnamic 3-hydroxycinnamic, syringi, vanillic :
nova_smes_standardu_21_12_12_02



Obrázek 1: Chromatogram směsi fenolových kyselin

Za těchto počátečních podmínek optimalizace, které byly převzaty z publikace, je celkové rozlišení separovaných píků je rovno a větší než 0,61. Problémem byl nedostatečný čas analýzy. Kyselina s retenčním časem 13,01 min se nestačila separovat, je mimo separační okno, které v tomto případě konší ve dvanácté minutě. Proto se nastavil delší čas analýzy, a to dvacet minut a upravila se gradientová eluce. Cílem této optimalizace bylo také odseparování všech deseti standard a jejich následná identifikace.

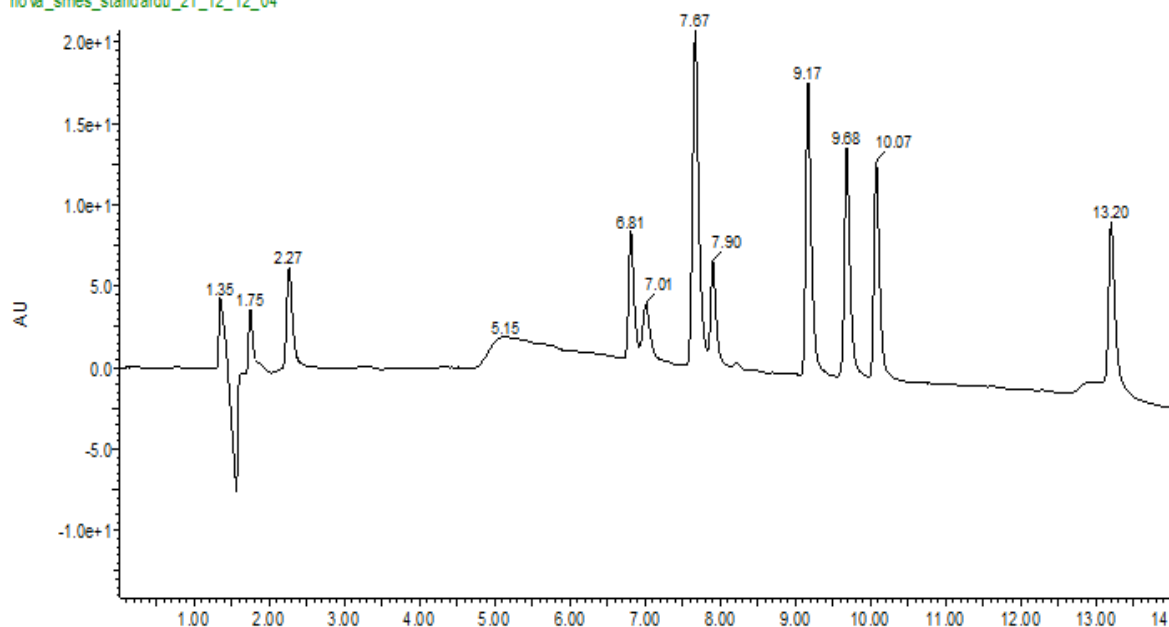
Mobilní fáze A	2% CH ₃ COOH
Mobilní fáze B	ACN
Čas analýzy	20 min
Tlak na koloně	350 bar
Teplota kolony	25 °C

Tabulka 5: Podmínky analýzy

čas	průtok	A%	B%
začátek	0,250 ml	92	8
10.minuta	0,250 ml	76	24
12.minuta	0,250 ml	50	50
16.minuta	0,250 ml	50	50
17.minuta	0,250 ml	5	95
18.minuta	0,250 ml	92	8

Tabulka 6: Gradientová eluce

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentsic, felluric, cinnamic 3-hydroxycinnamic, syringi, vanillic acid, 10 mg l
nova_smes_standardu_21_12_12_04



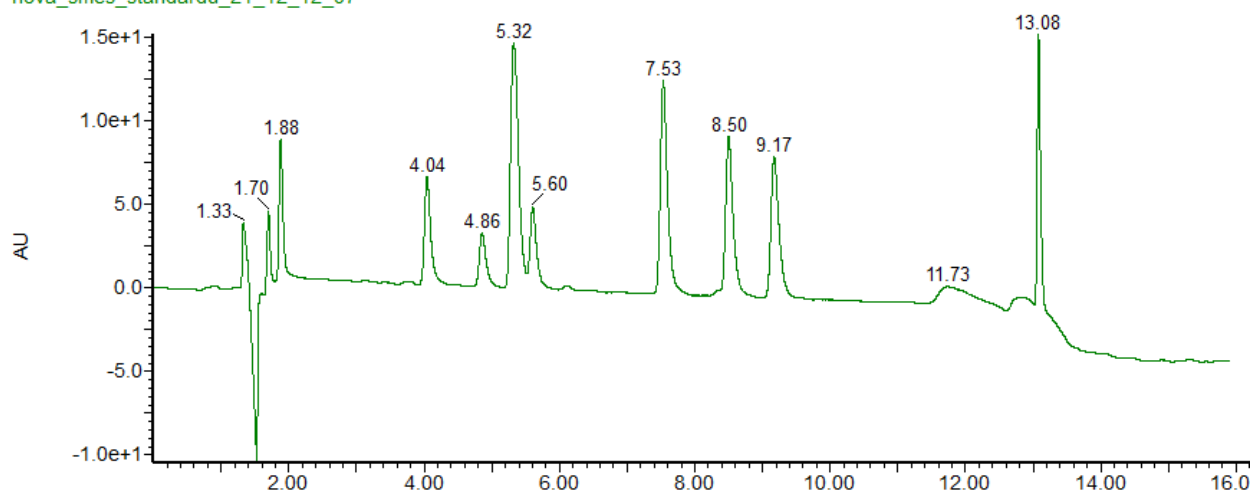
Obrázek 2: Chromatogram směsi fenolových kyselin

Na chromatogramu lze vidět úplně jiný výsledek než v předchozí analýze. Separace je viditelně lepší, chromatografické píky s retenčním časem 7,67 min a 7,90 min mají rozlišení větší a rovno 1,51. Neseparuje se všech deset kyselin obsažených ve směsi. Tato gradientová eluce i čas anýlyzy bude vhodnější než předchozí nastavení podmínek. Za dané teploty bylo v systému ACN – kyselina octová dosaženo nejlepší separace, pro další vylepšení selektivity jsem se pokusila změnou teploty kolony. Takže u další analýzy zůstala gradientová eluce stejná, ale změnila se teplota kolony z 25 °C na 32 °C.

Mobilní fáze A	2% CH ₃ COOH
Mobilní fáze B	ACN
Čas analýzy	20 min
Tlak na koloně	350 bar
Teplota kolony	32 °C

Tabulka 7: Podmínky analýzy

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentisic, fellyric, cinnamic 3-hydroxycinnamic, syringi, vanillic acid, 10 mg/l
nova_smes_standardu_21_12_12_07



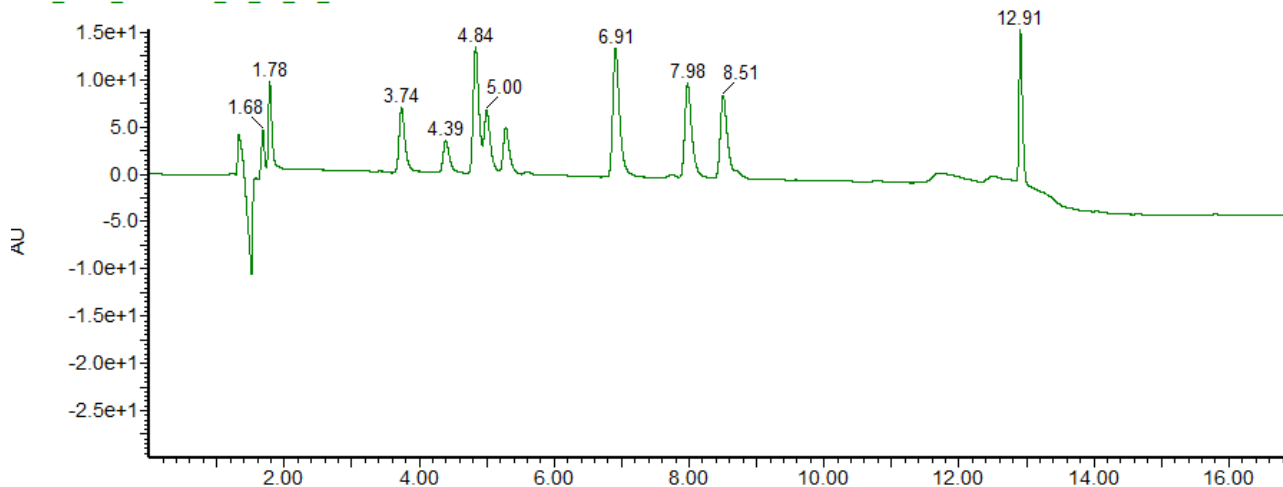
Obrázek 3: Chromatogram směsi fenolových kyselin při první změně podmínek separace

Z důvodu pozitivního vlivu vyšší teploty kolony na výslednou separaci byla testována i teplota 40 °C.

Mobilní fáze A	2% CH ₃ COOH
Mobilní fáze B	ACN
Čas analýzy	20 min
Tlak na koloně	350 bar
Teplota kolony	40 °C

Tabulka 8: Podmínky analýzy

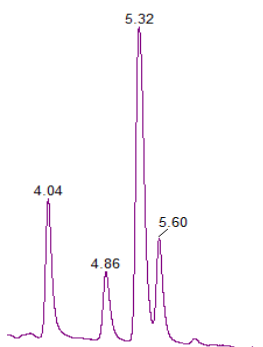
chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentisic, ferulic, cinnamic 3-hydroxycinnamic, syringic, vanillic acid, 10 mg_l
nova_smes_standardu_21_12_12_08



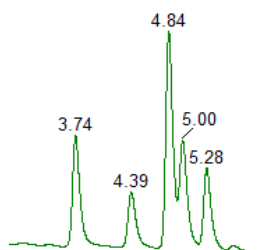
Obrázek 4: Chromatogram směsi fenolových kyselin při změně teploty

Chromatogram na obrázku 4 poskytl nejlepší separaci s rozlišením vyšším a rovno 1,1 pro píky eluující se v časech 4,84 min a 5 min.

Při teplotě 40 °C na koloně bylo dosaženo separace píků v rozmezí páté až šesté minuty téměř až na základní linii. V předchozích chromatogramech není tato separace patrná.



Obrázek 5: Separace píků v rozmezí čtvrté až šesté minuty při teplotě 32 °C



Obrázek 6: Separace píků v rozmezí čtvrté až šesté minuty při teplotě 40 °C

Optimální podmínky separace pro HPLC jsou při teplotě 40 °C, čas analýzy 20 minut, gradientová eluce při začátku 92% A a 8% B, v desáté minutě změna, mobilní fáze A 76% a B 24%, v dvanácté minutě A 50% a B 50%, v šestnácté minutě stejné složení mobilních fází, v sedmnácté minutě 5% A a 95% B a poslední změna proběhla v osmnácté minutě, kdy fáze A byla 92% a B 8%. Složení mobilních je fází kyselina octová 2% a acetonitril.

3.3.1.2 Identifikace standardů fenolových kyselin

Za těchto podmínek separace byla provedena identifikaci standardů fenolových kyselin. Při stanovení jednotlivých kyselin byla použita metoda spikování, kdy se ke směsi kyselin přidá definovaný přídavek jedné kyseliny, což se projeví na ploše píku v chromatogramu. Od této metody bylo upuštěno z důvodu příliš dlouhé a složité přípravy vzorků. Rozhodla jsem se tedy analyzovat vzorek, který se skládal vždy z 990 µl kyseliny octové 2% a 10 µl dané fenolové kyseliny. Podmínky analýzy byly stejné jako v posledním měření, kdy byly určeny jako optimální pro separaci fenolových kyselin. V tabulce 9 jsou uvedeny všechny retenční časy fenolových kyselin. Vzorek s kyselinou vanillovou byl vždy analyzován dvakrát pro srovnání, směrodatná odchylka jejího retenčního času je 0,005 min.

název kyseliny	reteneční čas	absorpční maximum	absorpční maximum 2
kyselina gallová	1,73 min	271 nm	230 nm
kyselina chlorogenová	3,54 min	326 nm	236 nm
kyselina gentisová	4,17 min	234 nm	326 nm
kyselina kávová	4,66 min	324 nm	240 nm
kyselina vanillová	4,82 min	261 nm	293 nm
kyselina syringová	5,13 min	275 nm	229 nm
kyselina p-kumarová	6,61 min	309 nm	235 nm
kyselina ferullová	7,74 min	323 nm	243 nm
kyselina 3-hydroxyokořicová	8,23 min	278 nm	237 nm
kyselina skořicová	12,84 min	276 nm	

Tabulka 9: Retenční časy na oktadecilové koloně

3.3.1.3 Optimalizace HPLC, fenylová stacionární fáze, kyselina octová, acetonitril

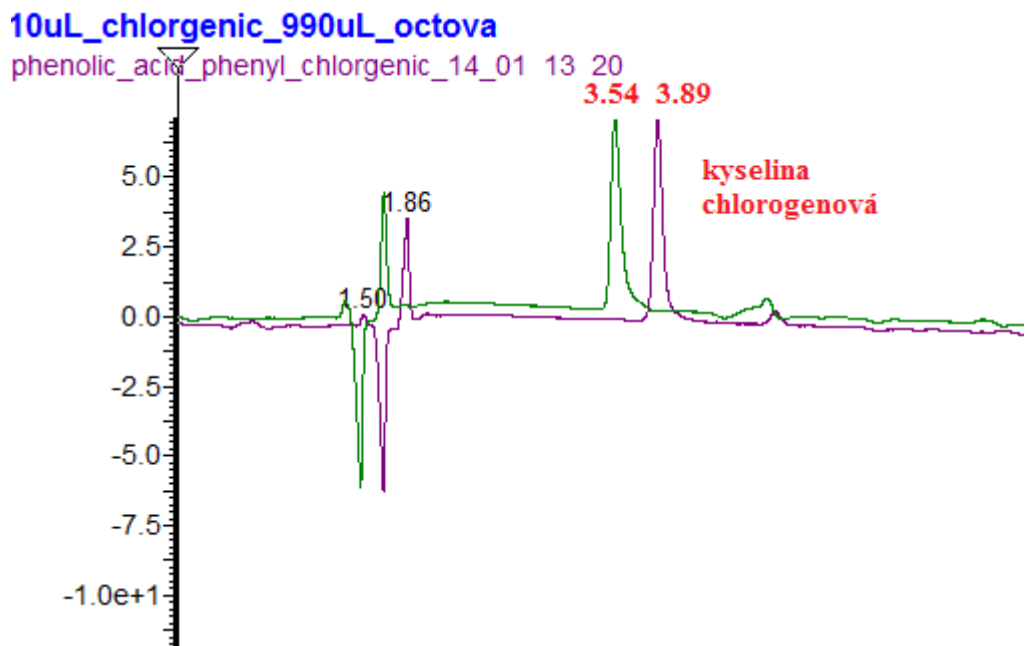
Další částí hledání optimálních podmínek separace fenolových kyselin je záměna oktadecilové kolony za fenylovou. Selektivita fenylových kolon je vysvětlována často vazbou $\pi - \pi$ ve fenylovém cyklu. Jsou vhodné pro vysoce polární sloučeniny a rozsah pH v rozmezí 2 – 8. Gradientová eluce, složení mobilních fází i teplota kolony je stále stejná.

Mobilní fáze A	2% CH ₃ COOH
Mobilní fáze B	ACN
Čas analýzy	20 min
Tlak na koloně	350 bar
Teplota kolony	40 °C

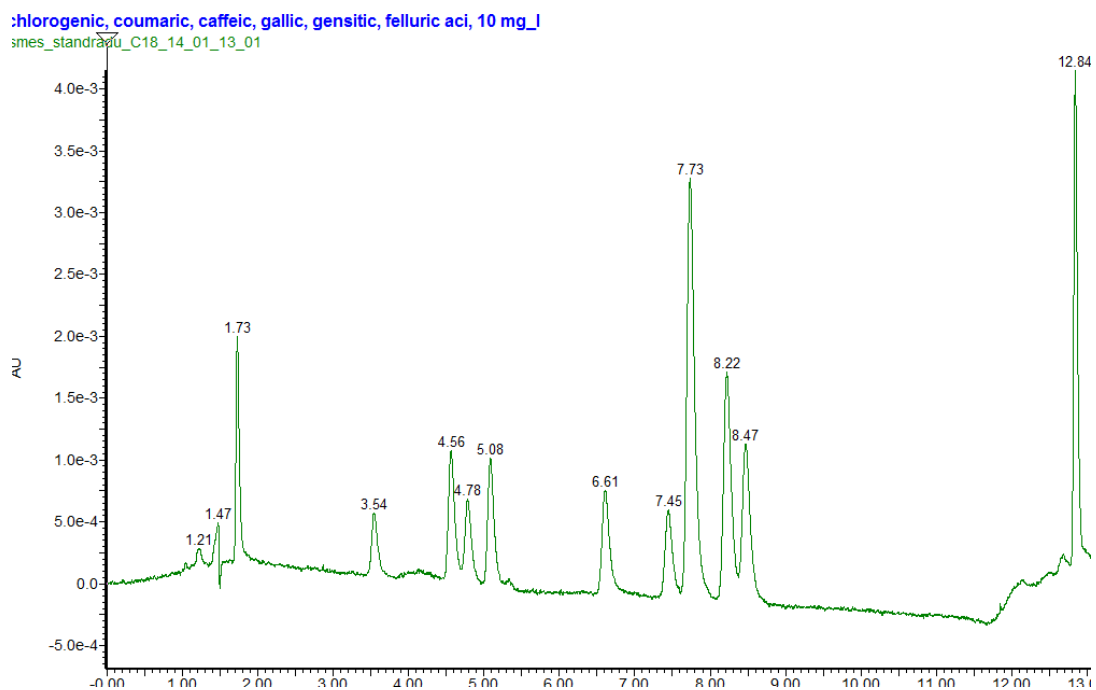
Tabulka 10: Podmínky analýzy

název kyseliny	reteneční čas	absorpční maximum	absorpční maximum 2
kyselina gallová	2 min	271 nm	230 nm
kyselina chlorogenová	3,89 min	326 nm	236 nm
kyselina gentisová	4,09 min	235 nm	326 nm
kyselina kávová	4,74 min	324 nm	240 nm
kyselina vanillová	4,80 min	261 nm	293 nm
kyselina syringová	5,37 min	275 nm	229 nm
kyselina p-kumarová	6,73 min	309 nm	235 nm
kyselina ferullová	7,75 min	323 nm	243 nm
kyselina 3-hydroxyskořicová	7,79 min	278 nm	237 nm
kyselina skořicová	12,37 min	277 nm	

Tabulka 11: Retenční časy kyselin na fenylové koloně

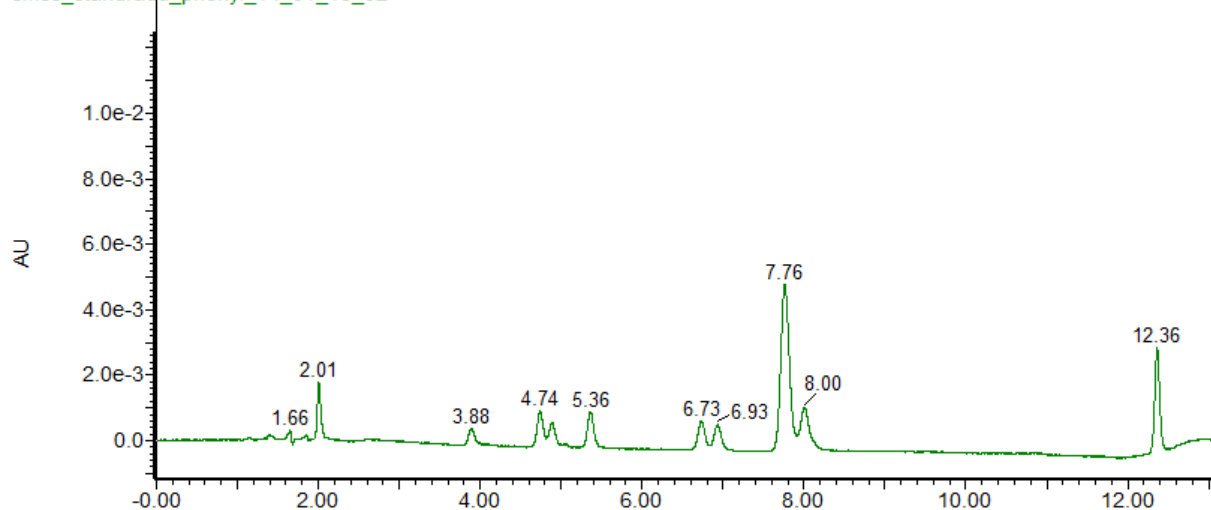


Obrázek 7: Separace kyseliny chlorogenové na fenylové a oktadecilové koloně



Obrázek 8: Chromatogram - oktadecilová kolona

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gensitic, felluric aci, 10 mg_l
smes_standradni_phenyl_14_01_13_02



Obrázek 9: Chromatogram - fenylová kolona

Retenční časy kyselin nejsou stejné. Není ani jednoznačné, že všechny kyseliny se separují dříve nebo později než na koloně oktadecilové. Na obrázku 7. je uvedena chlorogenová kyselina s retenčním čas 3,89 min na fenylové koloně a s retenčním časem 3,54 min na oktadecilové koloně. Redukovaný retenční čas na fenylové koloně je roven 2,03 a na oktadecilové koloně je roven 2,04 min. Na obrázku 8. a 9. jsou zobrazeny chromatogramy u použití oktadecilové kolony a fenylové kolony. Na obrázku 8. je kritický pár separace u fenolových kyselin s retenčním časem 8,22 min a 8,47 min., jejich rozlišení je rovno a vyšší než 1,66. Na obrázku 9. je kritický pár separace u fenolových kyselin s retenčním časem 4,74 min a 4,89 min, jejich rozlišení je vyšší nebo rovno 2,56. Separace fenolových kyselin za podmínek použití acetonitrilu a kyseliny octové je lepší v případě fenylové kolony. Vzorek s kyselinou vanilovou byl opět analyzován dvakrát, její směrodatná odchylka je 0,005.

3.3.1.4 Optimalizace HPLC, oktadecilová stacionární fáze, kyselina mravenčí, acetonitril

V této části byla tedy kyselina octová nahrazena kyselinou mravenčí, také 2%. Kyselina mravenčí je silnější kyselina než octová. Při stejném hmotnostním obsahu bude tedy mobilní fáze kyselejší. Vliv nižšího pH je uveden v následujících tabulkách.

Mobilní fáze A	2% HCOOH
Mobilní fáze B	ACN
Čas analýzy	20 min
Tlak na koloně	350 bar
Teplota kolony	40 °C

Tabulka 12: Podmínky analýzy

název kyseliny	reteneční čas	maximální vlnová délka	absorpční maximum 2
kyselina gallová	1,73 min	272 nm	230 nm
kyselina chlorogenová	3,54 min	326 nm	236 nm
kyselina gentisová	4,56 min	242 nm	326 nm
kyselina kávová	4,78 min	324 nm	240 nm
kyselina vanillová	5,08 min	261 nm	293 nm
kyselina syringová	6,61 min	275 nm	229 nm
kyselina p-kumarová	7,45 min	310 nm	235 nm
kyselina ferullová	8,22 min	323 nm	243 nm
kyselina 3-hydroxyskořicová	8,47 min	278 nm	237 nm
kyselina skořicová	12,84	276 nm	

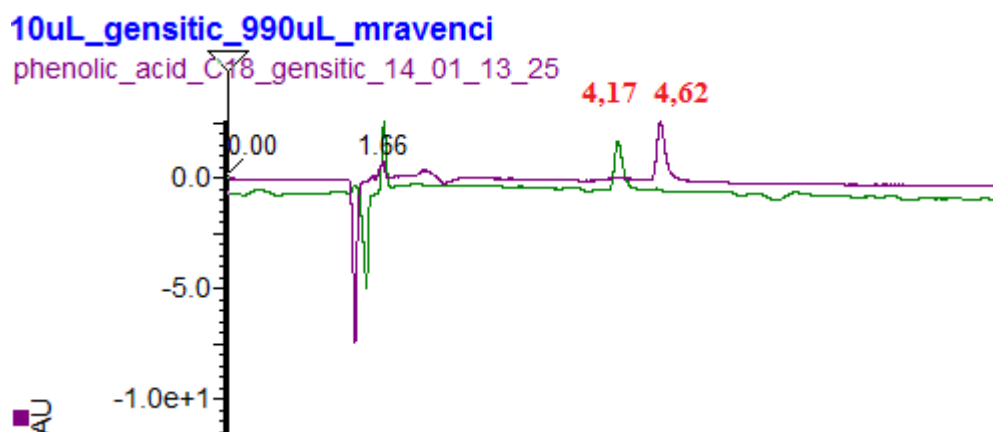
Tabulka 13: Retenční časy kyselin na oktadecilové koloně

3.3.1.5 Optimalizace HPLC, fenylová stacionární fáze, kyselina mravenčí, acetonitril

Ty samé vzorky za stejných podmínek se separovaly na fenylové koloně. V tabulce 14 jsou uvedeny opět retenční časy fenolových kyselin.

název kyseliny	reteneční čas	maximální vlnová délka	absorpční maximum 2
kyselina gallová	2,01 min	271 nm	230 nm
kyselina chlorogenová	2,82 min	326 nm	236 nm
kyselina gentisová	4 min	234 nm	326 nm
kyselina kávová	4,75 min	324 nm	240 nm
kyselina vanillová	4,88 min	261 nm	293 nm
kyselina syringová	5,45 min	275 nm	229 nm
kyselina p-kumarová	6,72 min	309 nm	235 nm
kyselina ferullová	7,78 min	323 nm	243 nm
kyselina 3-hydroxykořicová	8,07 min	278 nm	237 nm
kyselina skořicová	12,37 min	276 nm	

Tabulka 14: Reteneční časy na fenylové koloně

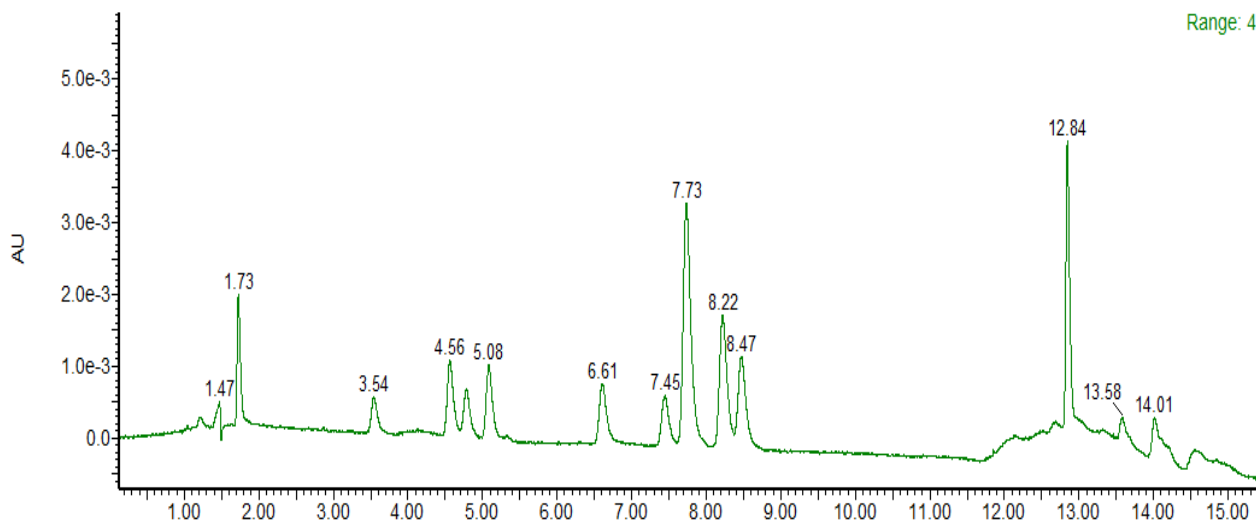


Obrázek 10: Srovnání gentisové kyseliny za použití fenylové a oktadecilové kolony

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentisic, ferulic aci, 10 mg_l
smes_standradu_C18_14_01_13_01

2: Diode

Range: 4.



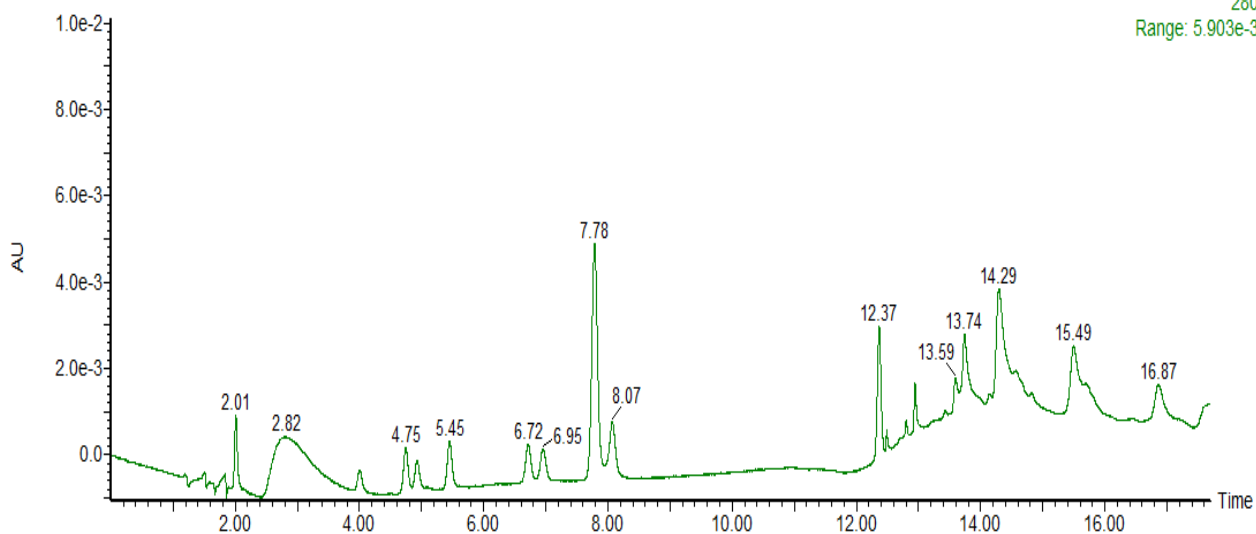
Obrázek 11: Chromatogram - oktadecilová kolona

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentisic, ferulic aci, 10 mg_l
smes_standradu_phenyl_14_01_13_04

2: Diode Array

280

Range: 5.903e-3



Obrázek 12: Chromatogram - fenylová kolona

Rozdíly v retenčních časech byly nepatrné. Na obrázku 10. se kyselina gentisová eluuje v retenčním čase 4,62 min na oktadecilové koloně a na fenylové koloně s retenčním časem 4,17 min. Redukovaný retenční čas na fenylové koloně u kyseliny gentisové je 2,53 min a na oktadecilové koloně je redukovaný retenční čas gentisové kyseliny 2,96 min. Na oktadecilové koloně proběhla separace s rozlišením vyšším a rovno 2,45. Kritickým párem separace je kyselina ferullová s retenčním časem 8,22 min a kyselina 3-hydroxyskořicová s retenčním časem 8,47 min. Na fenylové koloně proběhla separace s rozlišením vyšším a

rovno pouze 1,35. Kritickým párem separace je opět kyselina ferullová s retenčním časem 7,78 min a kyselina 3-hydroxykořičová s retenčním časem 8,07 min. Použití kyseliny mravenčí jako mobilní fáze není tedy vhodné pro separaci fenolových kyselin na fenylové koloně. Kyselina vanillová byla opět analyzována dvakrát. Směrodatná odchylka kyseliny vanillové je 0,155.

3.3.2 Optimální podmínky separace fenolových kyselin (UPLC)

Další fáze byla zaměřena na UPLC kolony. Začalo se s podmínkami, které jsem převzala od HPLC a byly pro HPLC optimální. Čas analýzy jsem zkrátila na 10 minut kvůli vyšší účinnosti UPLC kolon. Tlak se zvýšil na 800 barů z důvodu nižší velikosti částic stacionární fáze. U HPLC kolon je maximální možný tlak 400 bar. Všichni autoři, které jsem ve své práci citovala se přikláněli na stranu UPLC. UPLC je sice dražší metoda, ale mnohem účinnější a citlivější jako HPLC, má užší tvary píků, šetří množství mobilních fází. Takže i z ekonomických důvodů je UPLC výhodnější.

3.3.2.1 Optimalizace UPLC, oktadecilová stacionární fáze, kyselina octová, acetonitril

Hledání optimálních podmínek jsem začala s podmínkami, které byly optimální pro HPLC.

čas	průtok	A%	B%
začátek	0,250 ml	92	8
5.minuta	0,250 ml	76	24
6.minuta	0,250 ml	50	50
8.minuta	0,250 ml	50	50
8,5.minuta	0,250 ml	5	95
9.minuta	0,250 ml	92	8

Tabulka 15: Gradientová eluce

Mobilní fáze A	2% CH ₃ COOH
Mobilní fáze B	ACN
Čas analýzy	10 min
Tlak na koloně	800 bar
Teplota kolony	40 °C

Tabulka 16: Podmínky analýzy UPLC

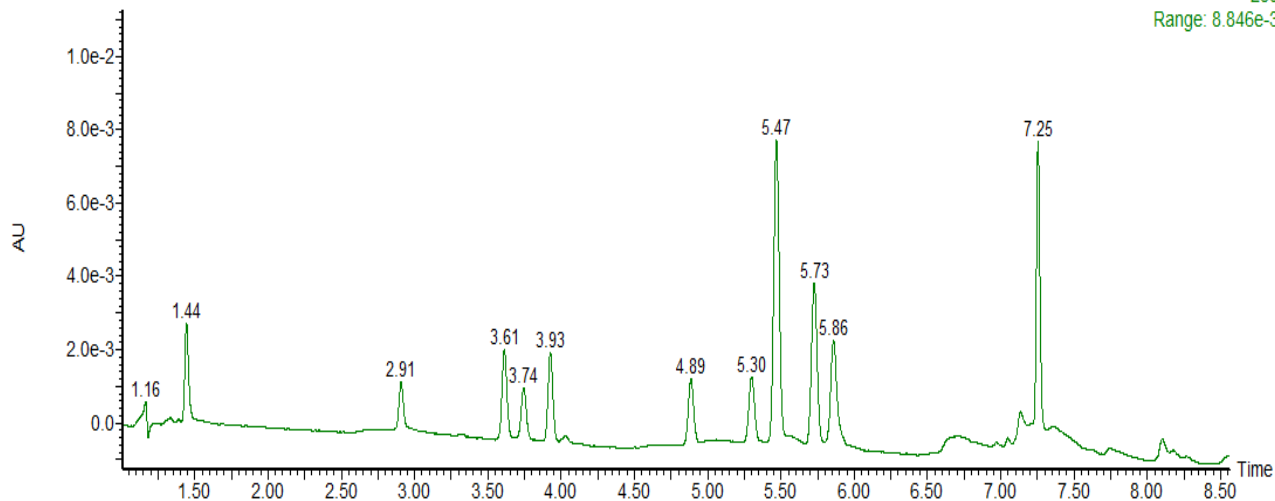
název kyseliny	reteneční čas	absorpční maximum	absorpční maximum 2
kyselina gallová	1,45 min	271 nm	230 nm
kyselina chlorogenová	2,91 min	325 nm	236 nm
kyselina gentisová	3,61 min	237 nm	326 nm
kyselina kávová	3,74 min	323 nm	240 nm
kyselina vanillová	4,85 min	260 nm	293 nm
kyselina syringová	4,93 min	274 nm	229 nm
kyselina p-kumarová	4,89 min	309 nm	235 nm
kyselina ferullová	5,47 min	323 nm	243 nm
kyselina 3-hydroxyskořicová	5,73 min	278 nm	237 nm
kyselina skořicová	7,25 min	277 nm	

Tabulka 17: Retenční časy na oktadecilové koloně (UPLC)

Retenční časy fenolových kyselin se podstatně posunuly, a to díky menšímu času analýzy, vyššímu tlaku na koloně. UPLC má hodně výhod oproti HPLC. Přechodem na UPLC systém došlo k významnému zkrácení doby analýzy, zlepšení rozlišení.

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentsic, felluric aci, 10 mg_l, octova_ACN
smes_standradu_C18_UPLC_ACN_16_01_13_01

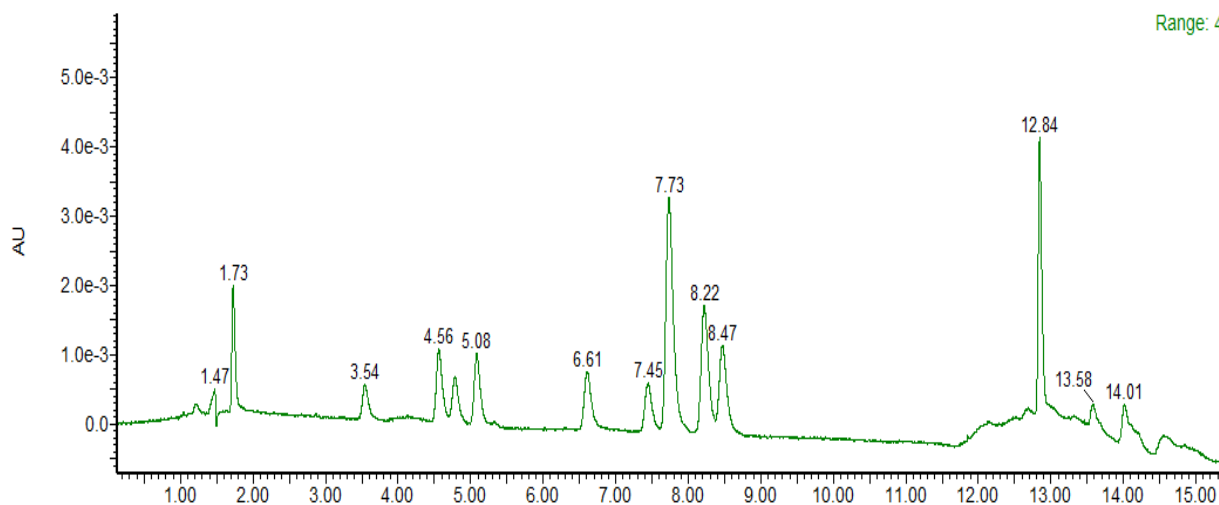
2: Diode Array
280
Range: 8.846e-3



Obrázek 13: Chromatogram - oktadecilová kolona, ACN, kyselina octová, 40 °C, UPLC

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentsic, felluric aci, 10 mg_l
smes_standradu_C18_14_01_13_01

2: Diode
Range: 4.



Obrázek 14: Chromatogram - oktadecilová kolona, ACN, kyselina octová, 40 °C, HPLC

Na obrázku 13. a 14. jsou uvedeny chromatogramy, které jsou získány za stejných podmínek separace, ale s rozdílem použité metody. Při použití UPLC metody se všechny fenolové kyseliny eluují dříve než při metodě HPLC, to je samozřejmě způsobeno i zkrácením času analýzy. Na první pohled jsou lepší tvary píků při použití UPLC metody a viditelná je i

lepší separace. Na HPLC koloně proběhla separace s rozlišením větším nebo rovno 2,35; jednalo se o kritický pár kyselinu gentisovou s retenčním časem 4,56 min a kyselinu kávovou s retenčním časem 4,78 min. Rozlišení u UPLC kolony je větší nebo rovno 3,28 a to opět u kritického páru separace kyseliny gentisové s retenčním časem 3,61 min a kyseliny kávové s retencí 3,74 min. Lepší separace se tedy dosáhlo při použití oktadecilové UPLC kolony než oktadecilové HPLC kolony. Vše bylo dosaženo za stejných průtoků, a to v obou případech, takže použití UPLC kolony je z ekonomického hlediska výhodnější kvůli úspoře mobilní fáze, protože analýza trvá kratší dobu.

3.3.2.2 Optimalizace UPLC, fenylová stacionární fáze, kyselina octová, acetonitril

U HPLC metody byly optimální podmínky separace fenolových kyselin při použití oktadecilové kolony, u UPLC jsem se stejnými podmínkami začala a pro srovnání a ověření, zda je oktadecilová kolona vhodná pro separaci fenolových kyselin i u UPLC, jsem také vyzkoušela fenylovou kolonu pro separaci fenolových kyselin.

Mobilní fáze A	2% CH ₃ COOH
Mobilní fáze B	ACN
Čas analýzy	10 min
Tlak na koloně	800 bar
Teplota kolony	40 °C

Tabulka 18: Podmínky analýzy UPLC

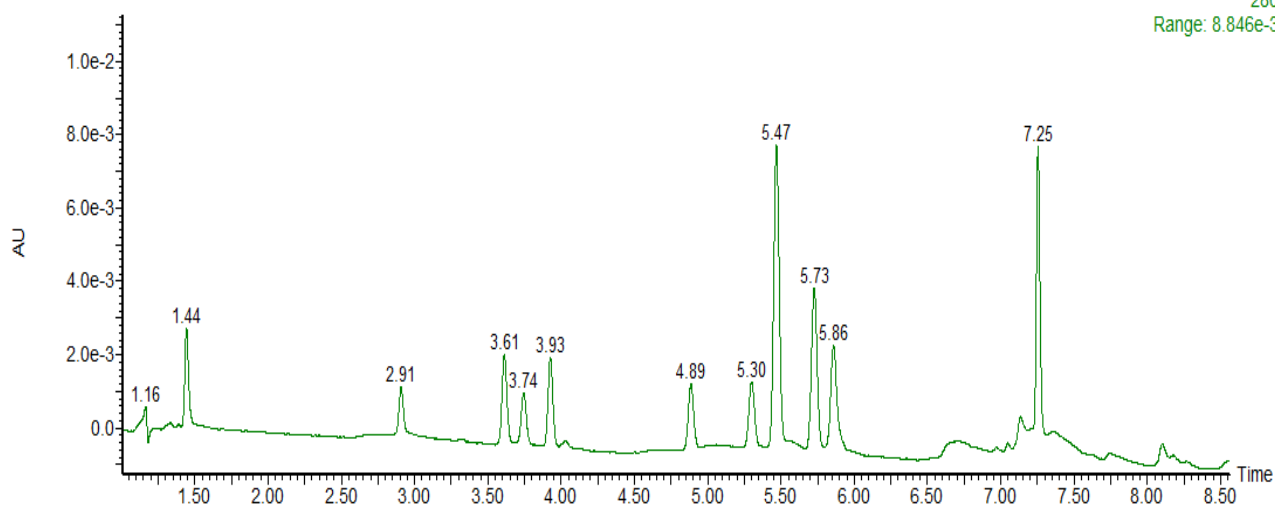
název kyseliny	reteneční čas	absorpční maximum	absorpční maximum 2
kyselina gallová	1,41 min	271 nm	230 nm
kyselina chlorogenová	3,60 min	325 nm	236 nm
kyselina gentisová	3,78 min	237 nm	326 nm
kyselina kávová	3,89 min	323 nm	240 nm
kyselina vanillová	4,41 min	260 nm	293 nm
kyselina syringová	5,47 min	274 nm	229 nm
kyselina p-kumarová	5,87 min	309 nm	235 nm
kyselina ferullová	6,33 min	323 nm	243 nm
kyselina 3-hydroxykoičová	6,57 min	278 nm	237 nm
kyselina skořicová	6,72 min	276 nm	

Tabulka 19: Reteneční časy

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentisic, ferulic aci, 10 mg_l, octova_ACN

smes_standradu_C18_UPLC_ACN_16_01_13_01

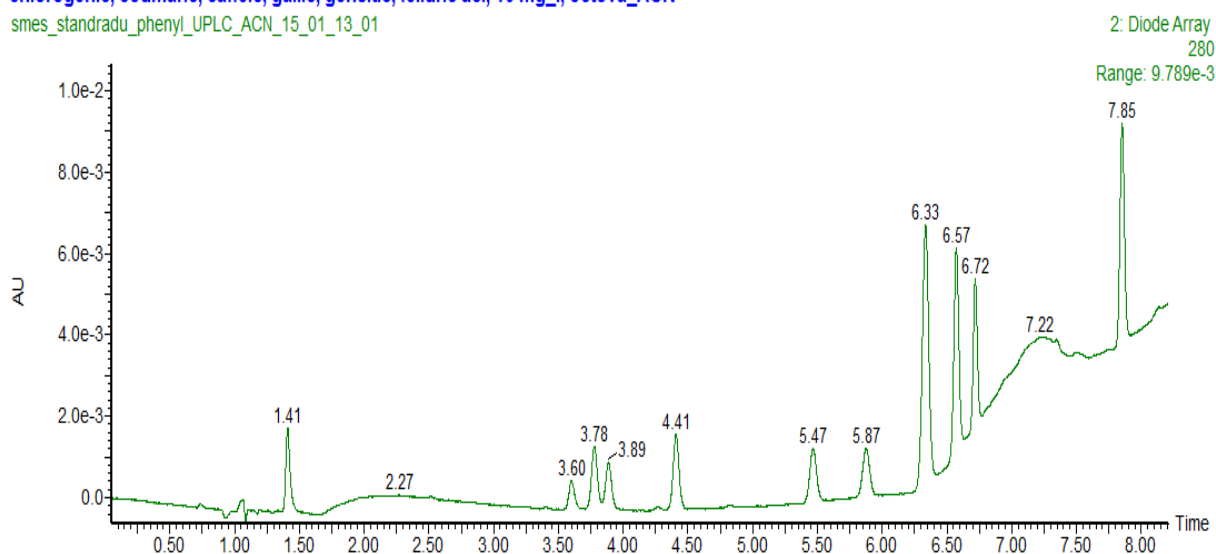
2: Diode Array
280
Range: 8.846e-3



Obrázek 15: Chromatogram - oktadecilová kolona UPLC

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentic, ferrulic aci, 10 mg_l, octova_ACN

smes_standradu_phenyl_UPLC_ACN_15_01_13_01



Obrázek 16: Chromatogram - fenylová kolona UPLC

Na obrázku 15. a 16. je vidět srovnání dvou chromatogramů, které se separovaly za stejných podmínek, ale na různých kolonách, v prvním případě je to oktadecilová kolona, v druhém jde o fenylovou kolonu. Pořadí eluovaných kyselin zůstává zachované, změnily se u všech kyselin retenční časy. Je zřejmé, že separace na oktadecilové koloně proběhla lépe, nebyl pozorován drift základní linie. Píky mají lepší tvar, rozlišení je větší a rovno 2,15; kritický pár separace jsou kyseliny gentisová s retenčním časem 3,61 min a kávová s retenčním časem 3,74 min. Na fenylové koloně proběhla separace s rozlišením větším nebo rovno 1,31; jednalo se opět o kyselinu gentisovou s retenčním časem 3,78 min a kyselinu kávovou s retenčním časem 3,89 min. Použití UPLC oktadecilové kolony je tedy pro separaci fenolových kyselin optimálnější než použití kolony fenylové, stejně jako u HPLC.

Protože acetonitril jako mobilní fáze se velmi osvědčil u HPLC metody i u UPLC metody, rozhodla jsem se vyzkoušet ještě methanol jako mobilní fázi, zda nejde dosáhnout ještě lepší separace fenolových kyselin.

3.3.2.3 Optimalizace UPLC, oktadecilová stacionární fáze, kyselina octová, metanol

Mobilní fáze A	2% CH ₃ COOH
Mobilní fáze B	MeOH
Čas analýzy	10 min
Tlak na koloně	800 bar
Teplota kolony	40 °C

Tabulka 20: Podmínky analýzy UPLC

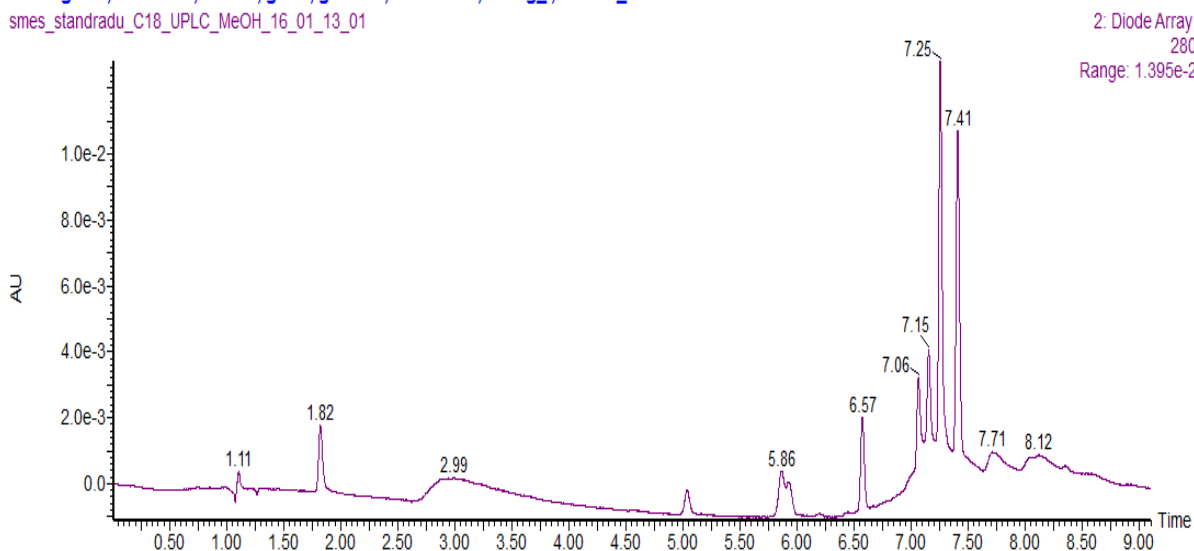
název kyseliny	reteneční čas	absorpční maximum	absorpční maximum 2
kyselina gallová	1,82 min	271 nm	230 nm
kyselina chlorogenová	5,03 min	325 nm	236 nm
kyselina gentisová	5,86 min	237 nm	326 nm
kyselina kávová	5,92 min	323 nm	240 nm
kyselina vanillová	nelze identifikovat	260 nm	293 nm
kyselina syringová	6,57 min	274 nm	229 nm
kyselina p-kumarová	7,06 min	309 nm	235 nm
kyselina 3-hydroxyskořicová	7,15 min	323 nm	243 nm
kyselina ferullová	7,25 min	278 nm	237 nm
kyselina skořicová	7,41 min	276 nm	

Tabulka 21: Retenční časy fenolových kyselin

Retenční časy fenolových kyselin se hodně změnily, kyselina 3-hydroxyskořicová se začala eluovat dříve než kyselina ferullová. Nepodařilo se identifikovat kyselinu vanillovou, myslím si, že je skrytá v nějakém jiném píku. Tvary píků nejsou špatné, spíše dochází k

významné koeluci. Lze vidět, že aby bylo možno s metodou pracovat, byla by nutná reoptimalizace gradientové eluce. Separace proběhla s rozlišením větším nebo rovno 0,38. Kritický pár separace je opět kyselina gentisová (5,86 min) a kyselina kávová (5,92 min). Na obrázku 17. lze vidět jak je významná koeluce chromatografických píků za daných podmínek.

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentisic, ferulic aci, 10 mg_l, octova_MeOH
smes_standradu_C18_UPLC_MeOH_16_01_13_01



Obrázek 17: Chromatogram - změna acetonitrilu za methanol

3.3.2.4 Optimalizace UPLC, fenylová stacionární fáze, kyselina octová, methanol

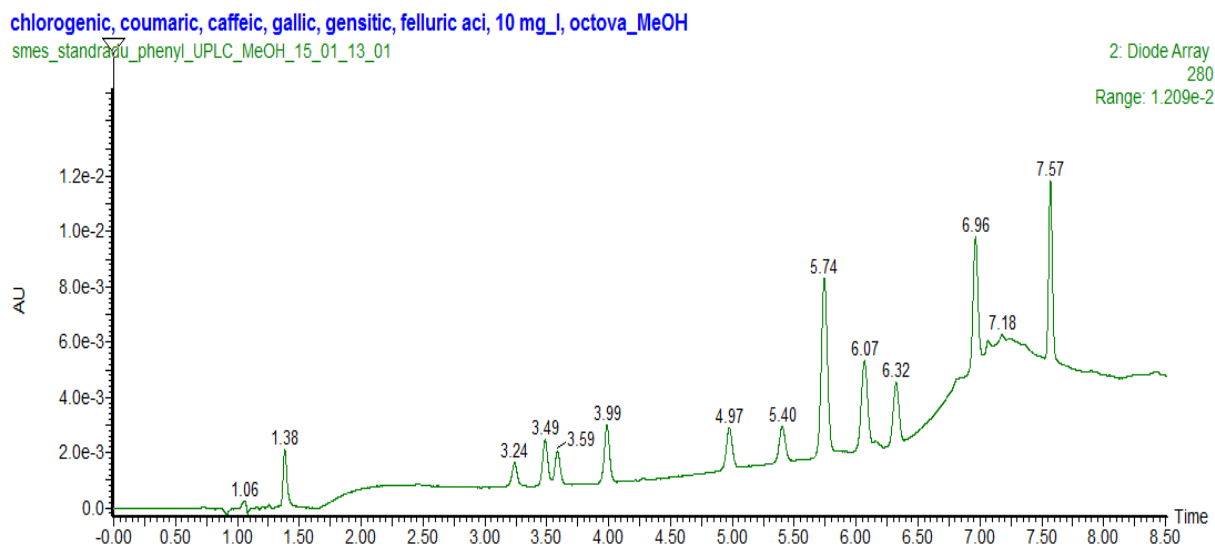
Pro srovnání byl experiment zopakován za stejných podmínek na fenylové stacionární fázi a výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Mobilní fáze A	2% CH ₃ COOH
Mobilní fáze B	MeOH
Čas analýzy	10 min
Tlak na koloně	800 bar
Teplota kolony	40 °C

Tabulka 22: Podmínky analýzy

název kyseliny	reteneční čas	absorpční maximum	absorpční maximum 2
kyselina gallová	1,38 min	271 nm	230 nm
kyselina chlorogenová	3,24 min	325 nm	236 nm
kyselina gentisová	3,49 min	237 nm	326 nm
kyselina kávová	3,59 min	323 nm	240 nm
kyselina vanillová	3,99 min	260 nm	293 nm
kyselina syringová	4,97 min	274 nm	229 nm
kyselina p-kumarová	5,40 min	309 nm	235 nm
kyselina ferullová	5,74 min	323 nm	243 nm
kyselina 3-hydroxyskořicová	6,07 min	278 nm	237 nm
kyselina skořicová	7,57 min	276 nm	

Tabulka 23: retenční časy fenolových kyselin



Obrázek 18: Chromatogram - změna ACN za MeOH - fenylová kolona

Použití metanolu jako mobilní fáze na fenylové koloně proběhlo lépe než na oktadecilové, ale s rozlišením větším nebo rovno 1,27. Separace s rozlišením větším nebo rovno 1,5 je výborná separace na základní linii.

Retenční časy se hodně posunuly ve srovnání s použitím metanolu jako mobilní fáze na oktadecilové koloně.

Zatím jsou tedy optimální podmínky pro separaci fenolových kyselin na UPLC kolonách stejné jako u použití HPLC kolon. Složení mobilních fází je kyselina octová a acetonitril, použitá kolona je oktadecilová a teplota kolony 40 °C. U HPLC jsem ještě zkoušela zaměnit kyselinu octovou za kyselinu mravenčí, pro ucelení výsledků jsem se rozhodla udělat tuto změnu i u UPLC.

3.3.2.5 UPLC, oktadecilová kolona, 2% kyselina mravenčí, acetonitril

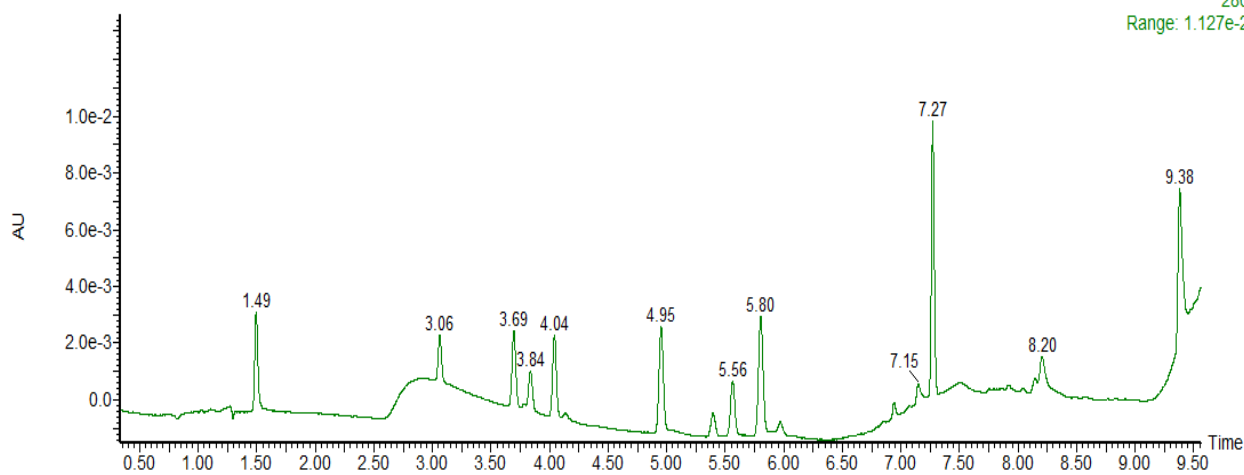
Mobilní fáze A	2% HCOOH
Mobilní fáze B	ACN
Čas analýzy	10 min
Tlak na koloně	800 bar
Teplota kolony	40 °C

název kyseliny	reteneční čas	absorpční maximum	absorpční maximum 2
kyselina gallová	1,49 min	271 nm	230 nm
kyselina chlorogenová	3,06 min	325 nm	236 nm
kyselina gentisová	3,69 min	237 nm	326 nm
kyselina kávová	3,84 min	323 nm	240 nm
kyselina vanillová	4,04 min	260 nm	293 nm
kyselina syringová	4,95 min	274 nm	229 nm
kyselina p-kumarová	5,40 min	309 nm	235 nm
kyselina ferullová	5,56 min	323 nm	243 nm
kyselina 3-hydroxyskořicová	5,80 min	278 nm	237 nm
kyselina skořicová	7,27 min	276 nm	

Tabulka 24: Reteneční časy fenolových kyselin

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentisic, ferulic aci, 10 mg/l, mravenci_ACN
smes_standradu_C18_UPLC_ACN_16_01_13_02

2: Diode Array
280
Range: 1.127e-2



Obrázek 19: Chromatogram - kyselina mravenčí za kyselinu octovou - kolona C18

Použití kyseliny mravenčí jako mobilní fáze se neosvědčilo. Rozlišení sice bylo větší nebo rovno 2,54; ale ve čtvrté minutě se opět objevuje drift základní linie před píkem kyseliny chlorogenové s retenčním časem 3,06 min. Při použití kyseliny octové na oktadecilové koloně za stejných podmínek byly tvary píků lepší a rozlišení také lepší, 3,28.

3.3.2.6 Optimalizace UPLC, fenyllová stacionární kolona, kyselina mravenčí, acetonitril

Pro srovnání byly stejné podmínky použity in a fenyllové koloně.

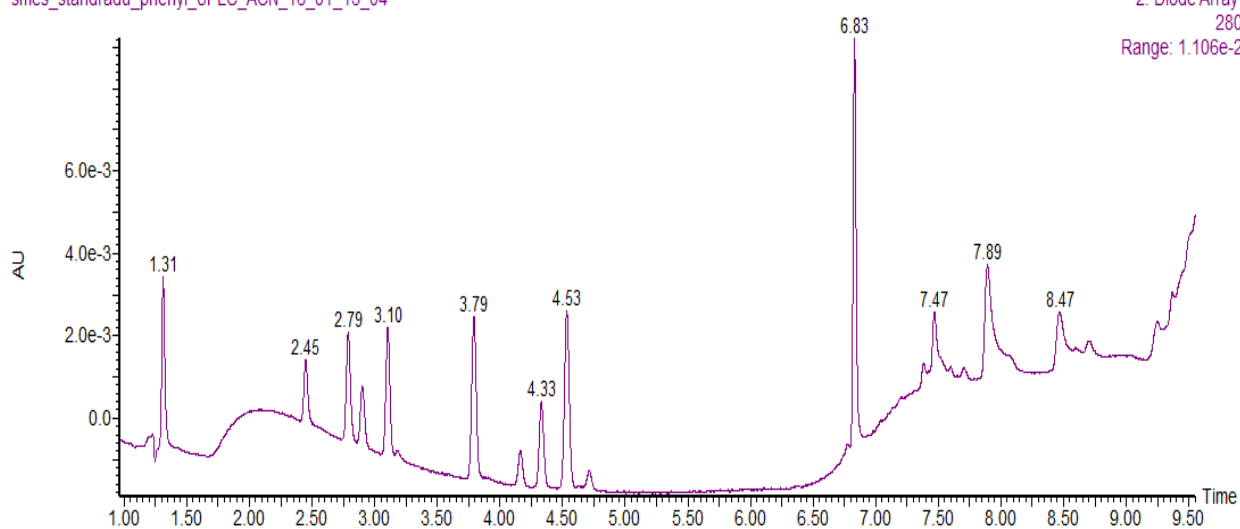
Mobilní fáze A	2% HCOOH
Mobilní fáze B	ACN
Čas analýzy	10 min
Tlak na koloně	800 bar
Teplota kolony	40 °C

Tabulka 25: Podmínky analýzy

název kyseliny	reteneční čas	absorpční maximum	absorpční maximum 2
kyselina gallová	1,31 min	270 nm	230 nm
kyselina chlorogenová	2,03 min	325 nm	236 nm
kyselina gentisová	2,90 min	237 nm	326 nm
kyselina kávová	3,10 min	324 nm	240 nm
kyselina vanillová	3,79 min	260 nm	293 nm
kyselina syringová	4,17 min	274 nm	229 nm
kyselina p-kumarová	4,33 min	309 nm	235 nm
kyselina ferullová	4,53 min	323 nm	243 nm
kyselina 3-hydroxyskořicová	8,83 min	278 nm	237 nm
kyselina skořicová	7,47 min	276 nm	

Tabulka 26: Reteneční časy

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentisic, ferulic aci, 10 mg_l, mravenci_ACN
smes_standradu_phenyl_UPLC_ACN_16_01_13_04



Obrázek 20: Chromatogram - kyselina mravenčí za kyselinu octovou - kolona fenylová

Na fenylové koloně vše proběhlo podobně jako za stejných podmínek na oktadecilové koloně. Píky se separovaly, ale ve třetí minutě je zase stejný kopeček před kyselinou chlorogenovou. Tvary píků nevypadají lépe než při použití kyseliny octové jako mobilní fáze. Separace proběhla s rozlišením 1,91. Kritický pár separace jsou kyseliny syringová s retenčním časem 4,17 min a p-kumarová s retenčním časem 4,33 min.

Nejlepší rozlišení tedy zůstává za těchto podmínek: kyselina octová 2%, ACN, oktadecilová kolona a teplota 40 °C.

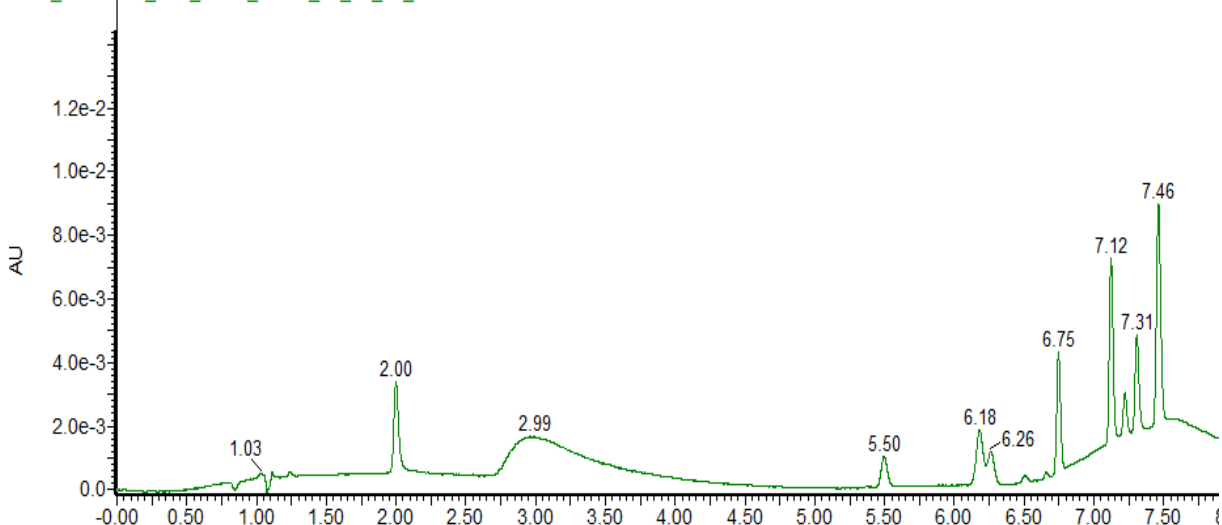
3.3.2.7 UPLC, oktadecilová kolona, 2% kyselina mravenčí, metanol

Zkusila jsem jako poslední možnost nakombinovat kyselinu mravenčí a methanol.

Mobilní fáze A	2% HCOOH
Mobilní fáze B	MeOH
Čas analýzy	10 min
Tlak na koloně	800 bar
Teplota kolony	40 °C

Tabulka 27: Podmínky analýzy

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentic, ferric aci, 10 mg_l, mravenci_MeOH
smes_standardu_C18_UPLC_MeOH_16_01_13_02



Obrázek 21: Chromatogram - HCOOH, MeOH a C18 kolona

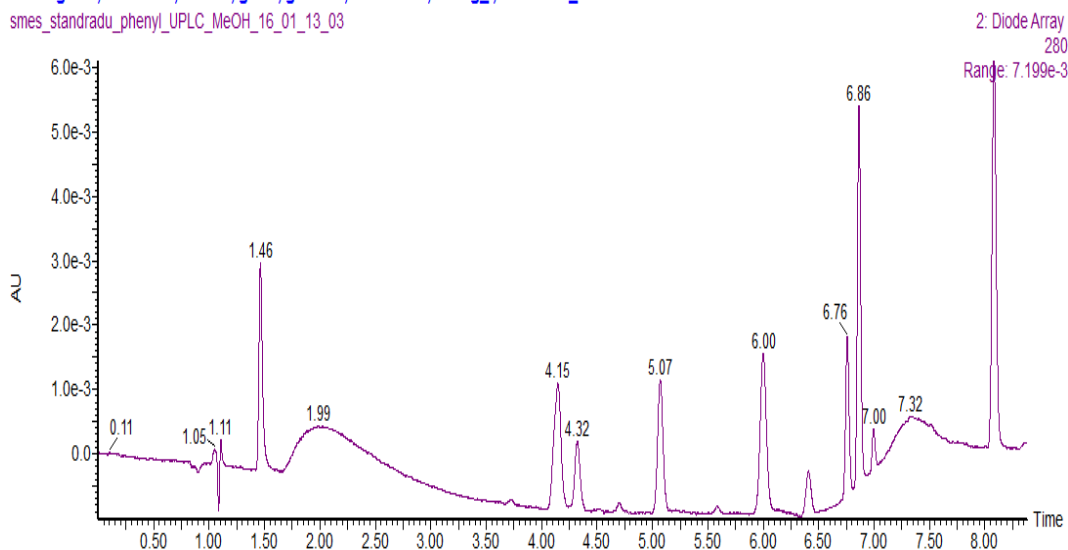
Vlivem nižší eluční síly metanolu se za daných podmínek zvýšila retence a zhoršila separace analytů. Opět se objevuje drift základní linie v čase 2,99 min. Retenční časy fenolových kyselin nejsou uvedeny, protože separace nebyla dostatečná. Rozlišení kritického páru kyselin s retenčním časem 6,18 a 6,26 min je vyšší nebo rovno 1,03. Analogický experiment byl za stejných podmínek proveden na koloně s fenyllovou fází.

3.3.2.8 Optimalizace UPLC, fenyllová stacionární kolona, kyselina mravenčí, metanol

Mobilní fáze A	2% HCOOH
Mobilní fáze B	MeOH
Čas analýzy	10 min
Tlak na koloně	800 bar
Teplota kolony	40 °C

Tabulka 28: Podmínky analýzy

chlorogenic, coumaric, caffeic, gallic, gentisic, ferulic aci, 10 mg_l, mravenci_MeOH
smes_standradu_phenyl_UPLC_MeOH_16_01_13_03



Obrázek 22: Chromatogram – HCOOH, MeOH a fenylová kolona

Separace proběhla i na fenylové koloně podobně jako na oktadecilové za stejných podmínek. Drift základní linie v čase 1,99 min se opět objevuje. Předpokládám, že se jedná o kyselinu chlorogenovou, která pravděpodobně koeluje. Kritický pár separace je kyseliny s retenčním časem 6,76 min a 6,86 min. Separace proběhla s rozlišením 1,25. Rozlišení je lepší než při použití oktadecilové kolony, ale není dostačující a tvary píků nejsou pěkné.

3.3.2.9 Zhodnocení optimálních podmínek HPLC a UPLC

Optimalizace podmínek dopadla stejně pro HPLC i UPLC. Lepší bylo použití oktadecilové kolony. Mobilní fáze je složená z acetonitrilu a 2% kyseliny octové. Zkoušela jsem tři různé teploty na koloně. Ta poslední, 40 °C, se osvědčila nejlépe.

U HPLC kolony bylo rozlišení piků větší nebo rovno 2,35, kritickým párem separace byly kyselina gentisová s retenčním časem 4,56 min a kyselina kávová s retenčním časem 4,78 min (obrázek 14). U UPLC kolony bylo dosaženo lepšího rozlišení, a to většího nebo rovno 3,28; kritický pár separace je opět kyselina gentisová s retencí 3,61 min a kyselina kávová s retencí 3,74 min (obrázek 15). Kyselina gentisová a kávová se separovaly vždy s nejnižším rozlišením. U těchto kyselin bylo nejlepší rozlišení 3,28; a to za optimálních podmínek pro UPLC. Pro separaci fenolových kyselin je tedy nejbhodnější použít UPLC

oktadecilovou kolonu, kyselinu octovou a acetonitril jako mobilní fáze, teplotu na koloně 40 °C a následující gradientovou eluci, v začátku 92% mobilní fáze A – 2% kyselina octová a 8% mobilní fáze B – acetonitril, v páté minutě 76% mobilní fáze A a 24% mobilní fáze B, v šesté minutě je složení mobilních fází 50% a 50%, v osmé minutě je složení stejné, v 8,5 minutě je složení mobilních fází 5% A a 95% B a nakonec v deváté minutě 92% mobilní fáze A a 8% mobilní fáze B.

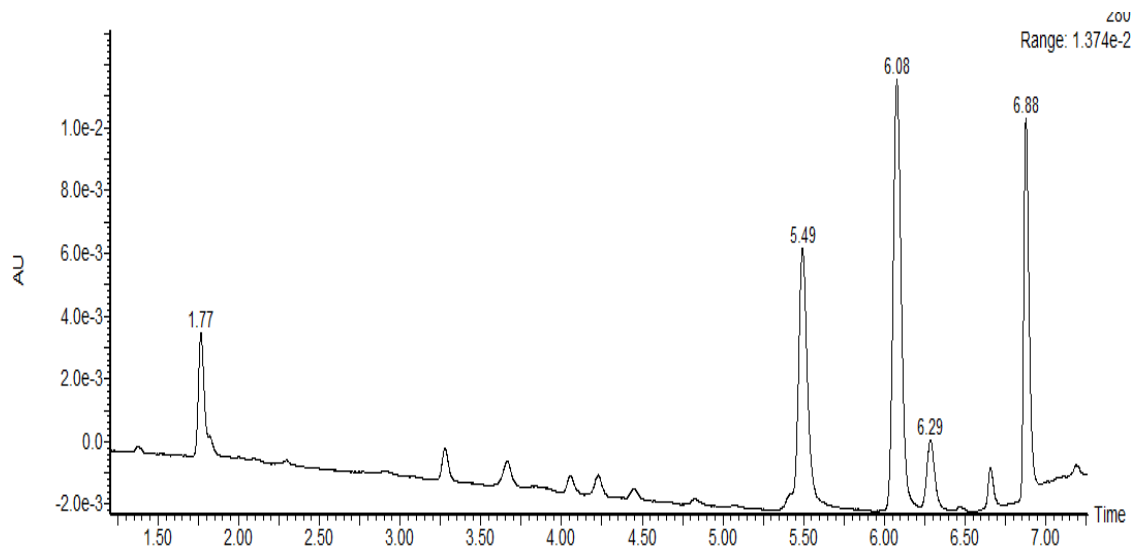
3.3.3 Extrakce zelených čajů

Optimalizovaná metodika UPLC byla aplikována na zelené čaje. Bylo vybráno pět zelených čajů z pěti různých zemí. Z Cejlonu Ceylon Sencha. Fog Green z Číny, Assam Green z Indie, Nepal Green z Nepálu a Bancha z Japonska. Vzorky byly připraveny extrakcí horkou vodou. Pro analýzu byly použity optimální podmínky separace pro fenolové kyseliny, a to UPLC systém, oktadecilovou kolonu, mobilní fáze složené z kyseliny octové a acetonitrilu. Teplota kolony 40 °C. Řadu pěti vzorků byla analyzována třikrát. V tabulce 29 uvádím jednotlivé vzorky a co obsahovaly za fenolové kyseliny.

název kyseliny	průměr - retenční čas	průměr - plocha píku	směrodatná odchylka
kyselina gallová	1,76 min	164	23,17
neidentifikovatelná fenolová kyselina	5,49 min	491	25,98
kyselina kávová	6,08 min	795	31,08
neidentifikovatelná fenolová kyselina	6,29 min	119	6,55
kyselina syringová	6,88 min	447	16,78

Tabulka 29: Obsah fenolových kyselin ve vzorku č.1

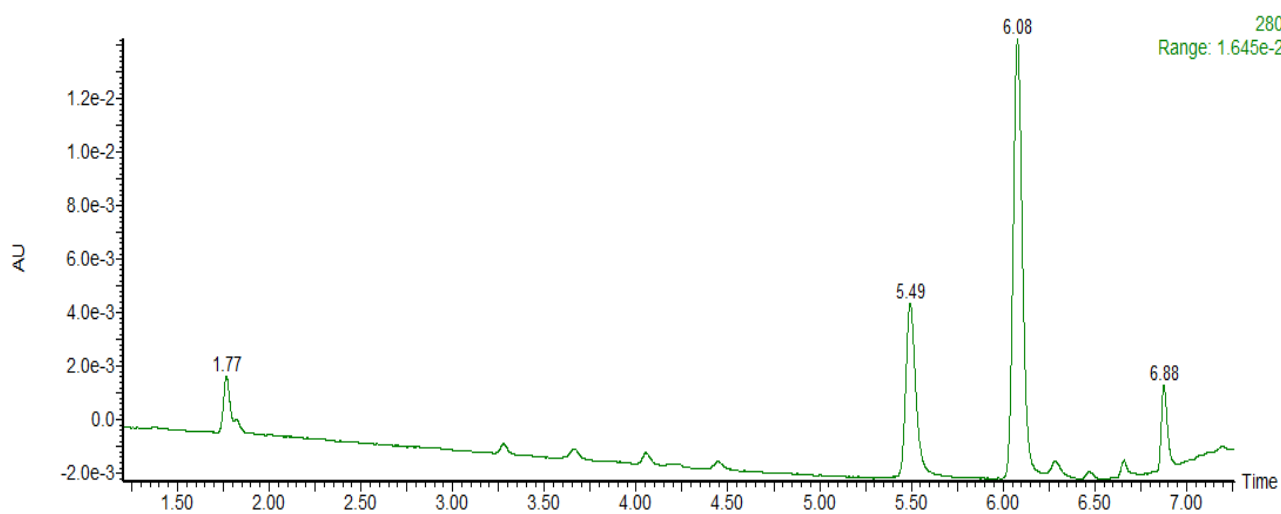
Retenční časy 5,49 min a 6,29 min patří neidentifikovatelným fenolovým kyselinám. Zelené čaje obsahují například kyselinu sinapovou, nerulovou, p-hydroxybenzoovou a další. Tyto standardy však nebyly k dispozici.



Obrázek 23: Chromatogram vzorek čaje č.1

název kyseliny	průměr - retenční čas	průměr - plocha píku	směrodatná odchylka
kyselina gallová	1,76 min	66	2,05
neidentifikovatelná fenolová kyselina	5,49 min	404	11,15
kyselina kávová	6,08 min	976	51,33
kyselina syringová	6,88 min	118	2,62

Tabulka 30: Obsah fenolových kyselin ve vzorku č.2

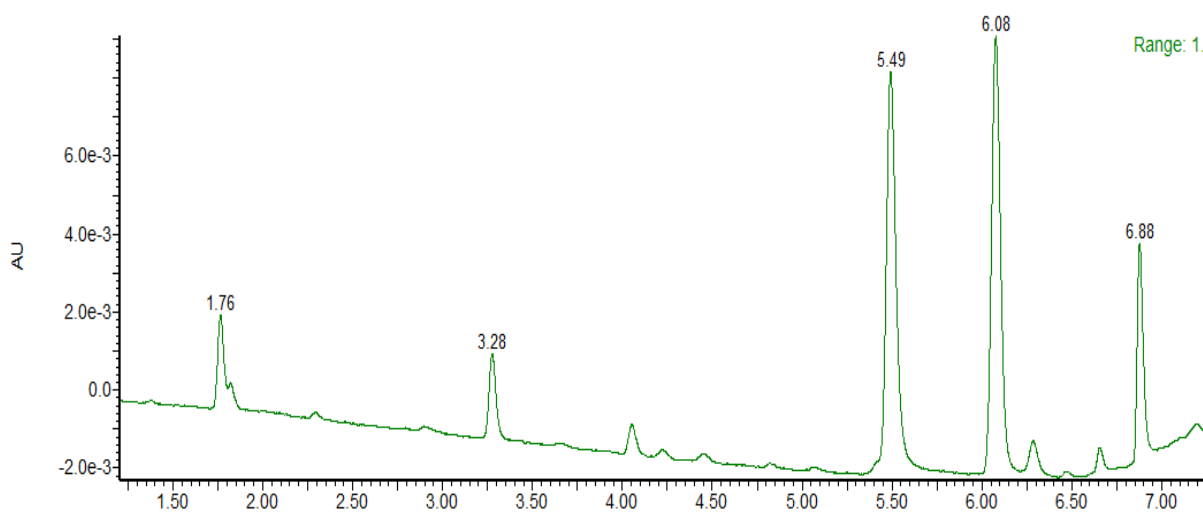


Obrázek 24: Chromatogram - vzorek č.2

Opět se ve vzorku č.2 objevuje neidentifikovatelná fenolová kyselina s retenčním časem 5,49 min.

název kyseliny	průměr - retenční čas	průměr - plocha píku	směrodatná odchylka
kyselina gallová	1,76 min	80	8,18
neidentifikovatelná fenolová kyselina	3,28 min	105	10,50
neidentifikovatelná fenolová kyselina	5,49 min	698	60,31
kyselina kávová	6,09 min	692	66,40
kyselina syringová	6,88 min	231	15,69

Tabulka 31: Obsah fenolových kyselin ve vzorku č.3

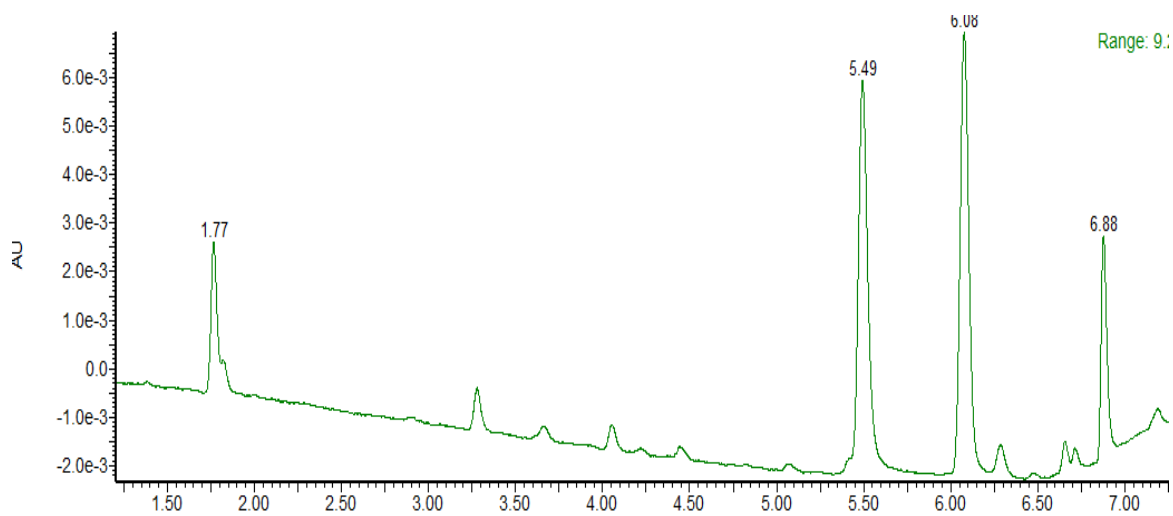


Obrázek 25: Chromatogram - vzorek č.3

Ve vzorku č.3 se objevuje neidentifikovatelná fenolová kyselina s retenčním časem 3,28 min a 5,49 min.

název kyseliny	průměr - retenční čas	průměr - plocha píku	směrodatná odchylka
kyselina gallová	1,76 min	99	4,92
neidentifikovatelná fenolová kyselina	5,49 min	536	16,11
kyselina kávová	6,08 min	533	19,60
kyselina syringová	6,88 min	175	4,88

Tabulka 32: Obsah fenolových kyselin ve vzorku č.4

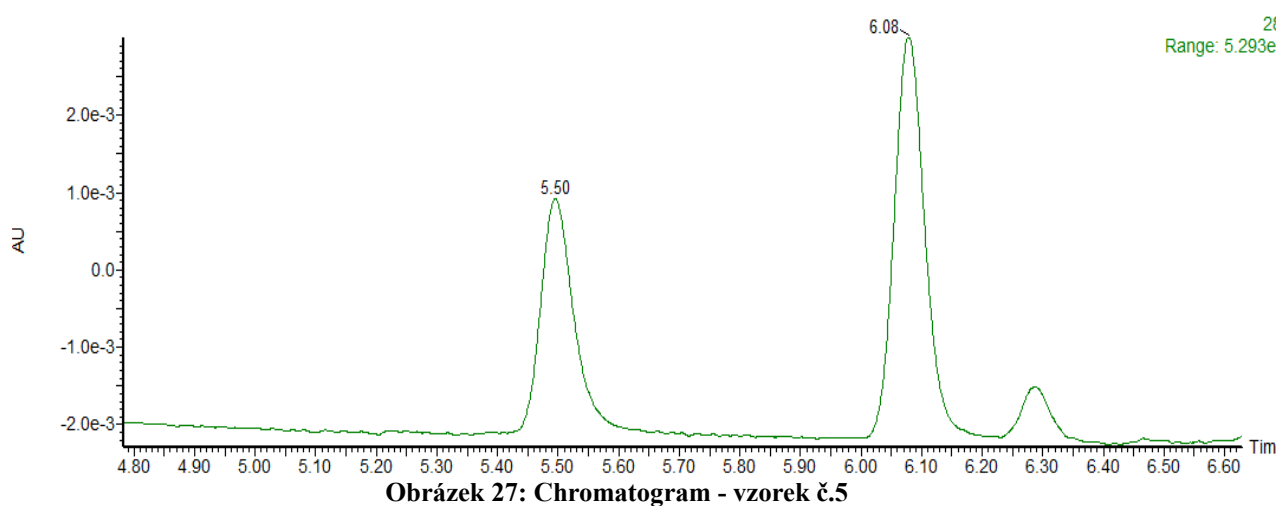


Obrázek 26: Chromatogram - vzorek č.4

Ve vzorku č.4 se objevila zase neidentifikovatelná fenolová kyselina s retenčním časem 5,49 min.

název kyseliny	průměr - retenční čas	průměr - plocha píku	směrodatná odchylka
neidentifikovatelná fenolová kyselina	5,50 min	191	7,79
kyselina kávová	6,08 min	298	8,18

Tabulka 33: Obsah fenolových kyselin ve vzorku č.5



Obrázek 27: Chromatogram - vzorek č.5

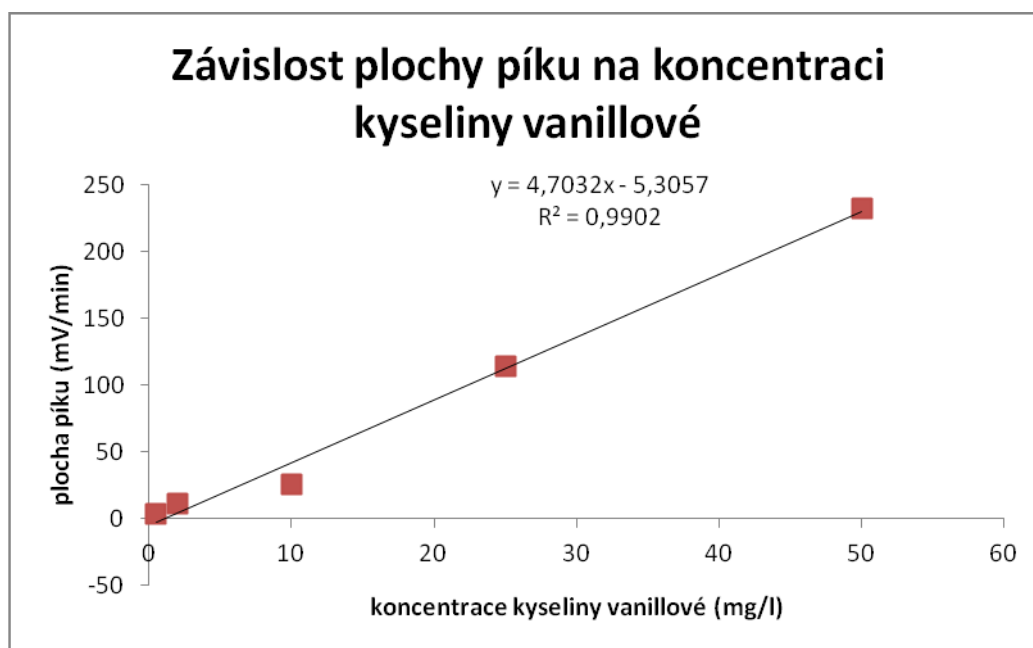
Poslední vzorek obsahoval pouze dvě fenolové kyseliny, z nichž jedna je opět neidentifikovatelná s retenčním časem 5,50 min. Tato kyselina se vyskytovala ve všech pěti čajích.

3.3.4 Vyhodnocení metodou kalibrační přímky

Pro kalibraci byla vybrána kyselina vanillová, protože splňovala náležité parametry tvaru píku a retence a její přítomnost byla ve vzorku předpokládána.

koncentrace mg/l	kalibrace 1 plocha píku	kalibrace 2 plocha píku	kalibrace 3 plocha píku	průměr plocha	smodch
0,5	3	2	4	3	0,8
2	11	12	10	11	0,8
10	25	26	24	25	0,8
25	113	114	116	114	1,2
50	230	231	236	232	2,6

Tabulka 34: Závislost plochy píku na koncentraci



Obrázek 28: Graf závislosti plochy píku na koncentraci kyseliny vanillové pro oktadecilovou kolonu

Na základě regresní rovnice jsem vypočítala obsahy fenolových kyselin v jednotlivých vzorcích čajů. Neuváděla jsem výpočty u neidentifikovatelných složek ve vzorku. Koeficient determinace rovnice přímky je roven 0,9902. Dosazovala jsem plochy píků do této rovnice $y = 4,7032x - 5,3057$

Výsledná hodnota x představuje koncentraci dané kyseliny v mg v litru, výsledek jsem přepočítala na 150 ml, protože tento objem byl uveden na každém postupu přípravy zeleného čaje, jedna čajová lžička na 150 ml vody. Tato hodnota tedy byla výsledná koncentrace a odpovídala mojí navážce zeleného čaje. Poslední krok byl přepočet mojí navážky na 1g čaje.

3.3.4.1 Výpočty pro vzorek č.1 Ceylon Sencha z Cejlonu

Výpočet pro retenční čas 1,76 min, ted pro kyselinu gallovou. Průměrná plocha píku je 164.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 164 \qquad \text{SMODCH} = 23,17$$

$$164 = 4,7032x - 5,3057$$

$$164 + 5,3057 = 4,7032 x$$

$$x = 35,998 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 5,373 \text{ mg}$$

5,373 mg kyseliny gallové odpovídá navážce čaje 1,5987 g
3,361 mg kyseliny gallové odpovídá 1g čaje

Výpočet pro retenční čas 6,08 min, kyselinu káвовou, plocha píku je rovna 491.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 491 \qquad \text{SMODCH} = 31,08$$

$$491 = 4,7032x - 5,3057$$

$$491 + 5,3057 = 4,7032 x$$

$$x = 105,525 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 15,75 \text{ mg}$$

15,75 mg kyseliny káвовé odpovídá navážce čaje 1,5987 g
9,852 mg kyseliny káвовé odpovídá 1g čaje

Výpočet pro retenční čas 6,88 min, kyselinu syringovou. Plocha píku je 447.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 447 \qquad \text{SMODCH} = 16,78$$

$$447 = 4,7032x - 5,3057$$

$$447 + 5,3057 = 4,7032 x$$

$$x = 96,17 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 14,354 \text{ mg}$$

14,354 mg kyseliny syringové odpovídá navážce čaje 1,5987 g
8,978 mg kyseliny syringové odpovídá 1g čaje

3.3.4.2 Výpočty pro vzorek č.2 Fog Green z Číny

Výpočet pro retenční čas 1,76 min, kyselinu gallovou, plocha píku je 66.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 66 \qquad \text{SMODCH} = 2,05$$

$$66 = 4,7032x - 5,3057$$

$$66 + 5,3057 = 4,7032 x$$

$$x = 15,161 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 2,263 \text{ mg}$$

2,263 mg kyseliny gallové odpovídá navážce čaje 1,5799 g
1,432 mg kyseliny gallové odpovídá 1g čaje

Výpočet pro retenční čas 6,08 min, kyselinu kávovou, plocha píku je rovna 976.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 976 \qquad \text{SMODCH} = 51,33$$

$$976 = 4,7032x - 5,3057$$

$$976 + 5,3057 = 4,7032 x$$

$$x = 208,646 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 31,141 \text{ mg}$$

31,141 mg kyseliny kávové odpovídá navážce čaje 1,5799 g
19,711 mg kyseliny kávové odpovídá 1g čaje

Výpočet pro retenční čas 6,88 min, kyselinu syringovou. Plocha píku je 118.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 118 \qquad \text{SMODCH} = 2,62$$

$$118 = 4,7032x - 5,3057$$

$$x = 26,217 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 3,913 \text{ mg}$$

3,913 mg kyseliny syringové odpovídá navážce čaje 1,5799 g
2,477 mg kyseliny syringové odpovídá 1g čaje

3.3.4.3 Výpočty pro vzorek č.3 Assam Green z Indie

Výpočet pro retenční čas 1,76 min, kyselinu gallovou, plocha píku je 80.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 80 \qquad \text{SMODCH} = 8,18$$

$$80 = 4,7032x - 5,3057$$

$$x = 18,138 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 2,707 \text{ mg}$$

2,707 mg kyseliny gallové odpovídá navážce čaje 1,6548 g

1,636 mg kyseliny gallové odpovídá 1g čaje

Výpočet pro retenční čas 6,09 min, kyselinu kávovou, plocha píku je rovna 692.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 692 \qquad \text{SMODCH} = 66,40$$

$$692 = 4,7032x - 5,3057$$

$$x = 148,262 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 22,129 \text{ mg}$$

22,129 mg kyseliny kávové odpovídá navážce čaje 1,6548 g

13,372 mg kyseliny kávové odpovídá 1g čaje

Výpočet pro retenční čas 6,88 min, kyselinu syringovou. Plocha píku je 231.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 231 \qquad \text{SMODCH} = 15,69$$

$$231 = 4,7032x - 5,3057$$

$$x = 50,244 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 7,499 \text{ mg}$$

7,499 mg kyseliny syringové odpovídá navážce čaje 1,6548 g

4,532 mg kyseliny syringové odpovídá 1g čaje

3.3.4.4 Výpočty pro vzorek č.4 Nepal Green z Nepálu

Výpočet pro retenční čas 1,76 min, kyselinu gallovou, plocha píku je 99.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 99 \qquad \text{SMODCH} = 4,92$$

$$99 = 4,7032x - 5,3057$$

$$x = 22,178 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 3,31 \text{ mg}$$

3,31 mg kyseliny gallové odpovídá navážce čaje 1,4099 g
2,348 mg kyseliny gallové odpovídá 1g čaje

Výpočet pro retenční čas 6,08 min, kyselinu kávovou, plocha píku je rovna 533.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 533 \qquad \text{SMODCH} = 19,60$$

$$533 = 4,7032x - 5,3057$$

$$x = 114,455 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 17,083 \text{ mg}$$

17,083 mg kyseliny kávové odpovídá navážce čaje 1,4099g
12,116 mg kyseliny kávové odpovídá 1g čaje

Výpočet pro retenční čas 6,88 min, kyselinu syringovou. Plocha píku je 175.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 175 \qquad \text{SMODCH} = 4,88$$

$$175 = 4,7032x - 5,3057$$

$$x = 38,337 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 5,722 \text{ mg}$$

5,722 mg kyseliny syringové odpovídá navážce čaje 1,4099 g
4,058 mg kyseliny syringové odpovídá 1g čaje

3.3.4.5 Výpočty pro vzorek č.5 Bancha z Japonska

Výpočet pro retenční čas 6,08 min, kyselinu kávovou, plocha píku je rovna 298.

$$y = 4,7032x - 5,3057 \qquad y = 298 \qquad \text{SMODCH} = 8,18$$

$$298 = 4,7032x - 5,3057$$

$$x = 64,489 \text{ mg/l} \qquad \text{ve 150 ml } x = 9,625 \text{ mg}$$

9,625 mg kyseliny kávové odpovídá navážce čaje 1,5612g
6,165 mg kyseliny kávové odpovídá 1g čaje

fenolová kyselina	vzorek č.1		smodch
	1,5987g	1g	
kyselina gallová	5,4 mg	3,4 mg	23,17
kyselina kávová	15,8 mg	9,9 mg	31,08
kyselina syringová	14,4 mg	9,0 mg	16,78

Tabulka 35: Množství fenolových kyselin ve vzorku č.1

fenolová kyselina	vzorek č.2		smodch
	1,5799g	1g	
kyselina gallová	2,3 mg	1,4 mg	2,05
kyselina kávová	3,9 mg	2,5 mg	51,33
kyselina syringová	31,1 mg	19,7 mg	2,62

Tabulka 36: Množství fenolových kyselin ve vzorku č.2

fenolová kyselina	vzorek č.3		smodch
	1,6548g	1g	
kyselina gallová	2,7 mg	1,6 mg	8,18
kyselina kávová	22,1 mg	13,4 mg	66,40
kyselina syringová	7,5 mg	4,5 mg	15,69

Tabulka 37: Množství fenolových kyselin ve vzorku č.3

fenolová kyselina	vzorek č.4		smodch
	1,4099g	1g	
kyselina gallová	3,3 mg	2,3mg	4,92
kyselina kávová	17,1 mg	12,1 mg	19,60
kyselina syringová	5,7 mg	4,1 mg	4,88

Tabulka 38: Množství fenolových kyselin ve vzorku č.4

fenolová kyselina	vzorek č.5		smodch
	1,5612g	1g	
kyselina gallová			
kyselina kávová	9,6 mg	6,1 mg	8,18
kyselina syringová			

Tabulka 39: Množství fenolových kyselin ve vzorku č.5

4. Závěr

Ve své práci jsem optimalizovala podmínky separace UPLC/HPLC pro fenolové kyseliny. V hledání optimálních podmínek jsem byla důsledná. Zkoušela jsem kombinace čtyř mobilních fází, dvou typů kolon u HPLC i UPLC a měnila jsem i teplotu kolony. Optimální podmínky pro separaci fenolových kyselin byly nakonec při použití UPLC oktadecilové kolony, mobilních fází kyseliny octové a acetonitrilu a teploty na koloně 40 °C. Tyto optimální podmínky jsem aplikovala na extrakty zelených čajů, kde jsem fenolové kyseliny kvantifikovala pomocí kalibrace kyseliny vanillové, která byla vybrána na základě předpokládaného výskytu ve vzorcích zelených čajů. Mé výsledky korelují s výsledky ostatních autorů. Získaná data byla diskutována s výsledky publikovanými v časopisech věnujících se chromatografické separaci.

5. Použitá literatura

1. HOLZBECHER, Závěš a Jaroslav CHURÁČEK. Analytická chemie. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 663 s.
2. DOUŠA, Michal a Jaroslav CHURÁČEK. Základy separačních metod se zaměřením na HPLC. 1. vyd. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Laboratorní odbor, 2002, 129 s. Učební texty pro pracovníky ÚKZÚZ. ISBN 80-865-4809-0.
3. CHURÁČEK, Jaroslav a Jaroslav CHURÁČEK. Analytická separace látek. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. Učební texty pro pracovníky ÚKZÚZ. ISBN 80-030-0569-8.
4. CHURÁČEK, Jaroslav a KOTRLÝ, Stanislav. Analytická chemie: určeno pro posl. VŠCHT v Pardubicích. [Část] 2. 1. vyd. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická, 1983. 189 s.
5. DOUŠA, Michal. Www.hplc.cz. CREATIVE COMMONS. [online]. 4.4.2013. [cit. 2013-12-08]. Dostupné z: <http://generator.citace.com/dok/FKmAzuHf5RY9b9U?kontrola=1>.

6. COUFAL, Pavel. [online]. 2.3.1996. [cit. 2013-12-08]. Dostupné z: .
<http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>.
7. [online]. [cit. 2013-12-08]. Dostupné z: . <http://labmet.zshk.cz/vyuka/hplc.aspx>.
8. HITACHI HIGH-TECHNOLOGIES CORPORATION. [online]. [cit. 2013-12-08].
 Dostupné z: http://www.hitachi-hitec.com/global/science/lc/lc_basic_1.html.
9. HÁKOVÁ, Eva. Pokroky v moderních separačních metodách [online]. 2012 [cit. 2013-08-08]. Dostupné z: <http://www.natur.cuni.cz/chemie/analchem/cabala/ke-stazeni/pokroky-v-modernich-separacnich-metodach/ultra-performance-liquid-chromatography-uplc>.
 Masarykova Univerzita.
10. HAGHI, Ghasem, Alireza HATAMI a Mehdi MEHRAN. UPLC and HPLC of caffeoyl esters in wild and cultivated *Arctium lappa* L. [online]. 2012 [cit. 2013-12-02]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612015671>.
11. - -
 . Determination of Microbial Phenolic Acids in Human Faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011-03-23, vol. 59, issue 6, s. 2241-2247 [cit. 2013-12-08]. DOI: 10.1021/jf104574z. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf104574z>.
12. PALAFOX-CARLOS, Hugo, Joana GIL-CHÁVEZ, Rogerio SOTELO-MUNDO, Jacek NAMIESNIK, Shela GORINSTEIN a Gustavo GONZÁLEZ-AGUILAR. Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in 'Ataulfo' Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids. *Molecules* [online]. 2012, vol. 17, issue 12, s. 12657-12664 [cit. 2013-12-08]. DOI: 10.3390/molecules171112657. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/11/12657/>.

13. NACZK, Marian a Fereidoon SHAHIDI. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, vol. 1054, 1-2, s. 95-111 [cit. 2013-11-11]. DOI: /10.1016/j.chroma.2004.08.059. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967304014098>
14. STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, vol. 30, issue 18, s. 3268-3295 [cit. 2013-11-15]. DOI: 10.1002/jssc.200700261. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700261>
15. LEE, Jungmin, Christopher RENNAKER a Ronald E. WROLSTAD. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* [online]. 2008, vol. 110, issue 3, s. 782-786 [cit. 2013-11-15]. DOI: /10.1016/j.foodchem.2008.03.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460800304X>
16. ROGGERO, J.P., P. ARCHIER, S. COEN a T.R. WATKINS. Chromatography of phenolics in wine. [online]. 1997, vol. 661, s. 6-11 [cit. 2013-11-15]. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=27&SID=P1J6aMEjd48RgBwZyG8&page=3&doc=23
17. XU, Yong-Jiang, Kenn FOUBERT, Liene DHOOGHE, Filip LEMIÈRE, Kanyanga CIMANGA, Kahunu MESIA, Sandra APERS a Luc PIETERS. Chromatographic profiling and identification of two new iridoid-indole alkaloids by UPLC–MS and HPLC-SPE-NMR analysis of an antimalarial extract from *Nauclea pobeguinii*. *Phytochemistry Letters* [online]. 2012, vol. 5, issue 2, s. 316-319 [cit. 2013-12-08]. DOI: 10.1016/j.phytol.2012.02.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390012000419>.
18. DARTORA, Nessana, Lauro M. DE SOUZA, Arquimedes P. SANTANA-FILHO, Marcello IACOMINI, Alice T. VALDUGA, Philip A.J. GORIN a Guilherme L. SASSAKI. UPLC-PDA–MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. *Food Chemistry* [online]. 2011, vol. 129,

issue 4, s. 1453-1461 [cit. 2013-12-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.112. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611008156>.

19. GUMUSTAS, Mehmet, Sevinc KURBANOGLU, Bengi USLU a Sibel A. OZKAN. UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia* [online]. 2013, vol. 76, 21-22, s. 1365-1427 [cit. 2013-12-08]. DOI: 10.1007/s10337-013-2477-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10337-013-2477-8>.

20. JERKOVICH A.D. , MELLORS J.S. , JORGENSON J.W. (2003) *LCGC* 21:vol. 600–610.

21. VELÍŠEK, Jan a Karel CEJPEK. *Biosynthesis of food components*. 1st ed. Tábor: OSSIS, 2008, xii, 497 s. ISBN 978-80-86659-12-1.

22. NEUE U. 1997. *HPLC columns: theory, technology and practice*. Wiley, New York.

23. SHAO, Yafang, Feifei XU, Xiao SUN, Jinsong BAO a Trust BETA. Phenolic acids, anthocyanins, and antioxidant capacity in rice (*Oryza sativa* L.) grains at four stages of development after flowering. *Food Chemistry* [online]. 2014, vol. 143, s. 90-96 [cit. 2013-12-08]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.07.042. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613009709>.

24. [online]. [cit. 2013-08-31]. Dostupné z: <http://ecka-database.doktorka.cz/konzervanty/kyselina-benzoova-e-210>, 5.8.2013.

25. KHODDAMI, Ali, Meredith WILKES a Thomas ROBERTS. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules* [online]. 2013, vol. 18, issue 3, s. 2328-2375 [cit. 2013-12-08]. DOI: 10.3390/molecules18022328. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/2/2328/>.

26. KOOLEN, Hector H. F., Filip M. A. DI SILVA a Fábio C. GOZZO. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia*

flexuosa L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. [online]. [cit. 2013-08-31]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913000665>.

27. NACZK, Marian, Ryszard AMAROWICZ, Ryszard ZADERNOWSKI a Fereidoon SHADIDI. Antioxidant capacity of crude phenolic extracts from canola hulls. [online]. 2003, s. 226 [cit. 2013-02-15]. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=44&SID=P1J6aMEjd48RgBwZyG8&page=6&doc=51

28. LIN, C.H.; CHANG, C.Y. Textural change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. Food Chem., 2005, vol. 90, s. 9-15.

29. SULTANA, B.; ANWAR, F.; IQBAL, S., Effect of different cooking methods on the antioxidant activity of some vegetables from Pakistan. Int. J. Food Sci. Technol., 2008, 43, s. 560-567.

30. Molecules [online]. 2011, vol. 16, issue 1 [cit. 2013-12-08]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/1/251/>.

31. Phytochemical Analysis [online]. 2013, vol. 24, issue 3 [cit. 2013-12-08]. ISSN 09580344. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pca.2408>.

6. Seznam zkratk

K_D – distribuční konstanta

V_M – mrtvý objem

V_R – retenční objem

C18 – oktadecilová kolona

nm – nanometr

μm – mikrometr

ml – mililitr

min – minuta

mm – milimetr

MS – hmotnostní spektrometr

GC – plynová chromatografie

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

UPLC – ultraúčinná kapalinová chromatografie

NMR – nukleární magnetická resonance

TMF – tetrahydrofuran

MeOH – methanol

ACN – acetonitril

SMODCH – směrodatná odchylka

MeCN – acetonitril

