

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Barbora Petránková

ANALÝZA SULFATOVANÝCH FLAVONOIDŮ POMOCÍ
VYSOKOTLAKÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE
S HMOTNOSTNÍ DETEKČÍ (LC-MS)

Analysis of sulfated flavonoids by high performance liquid
chromatography with mass detection (LC-MS)

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. června 2021

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Lucii Petráskové, Ph.D. za odborné vedení, seznámení s danou problematikou, konzultaci, trpělivost a ochotu při práci v laboratoři a při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat vedoucí své práce doc. RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D. za uvedení do laboratoře a pomoc při zpracování práce, prof. Ing. Vladimírovi Křenovi, DrSc., že mi umožnil práci v Laboratoři biotransformací a děkuji Ing. Kristýně Káňové za uvedení do výroby sulfatovaných polyfenolických látek.

Abstrakt

Tato bakalářská práce je zaměřena na nalezení optimálních separačních podmínek ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii pro analýzu sulfatovaných polyfenolických látek, především pak flavonoidů, fenolových kyselin a katecholů. Při vývoji metody byly použity tři chromatografické kolony. Kolona ZIC-HILIC v polárně organické fázi a kolony C18 a Kinetex PFP v reverzní fázi. Cílem optimalizace metody v rámci práce byl krátký čas separace, ostré nedeformující se píky a separace všech složek směsi. Při použití kolony Kinetex PFP se podařilo nalézt optimální metodu pro separaci testovaných směsí. Jako nejvhodnější se ukázalo použití mobilní fáze o složení 10 mM octanu amonného/0,1% kyseliny mravenčí a methanolu, při průtoku mobilní fáze rychlostí 0,6 ml/min. Modifikací gradientu mobilní fáze a teploty se podařilo separovat všechny složky testovaných směsí, píky byly ostré a čas separace se pohyboval ve většině případů do 10 min. Metoda je také přímo použitelná ve spojení s hmotnostním detektorem.

Klíčová slova: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), flavonoidy, polyfenolické látky, sulfatace, separace

Abstract

The aim of this work is to find the optimal separation conditions in high performance liquid chromatography for the analysis of sulfated polyphenolic substances, especially flavonoids, phenolic acids and catechols. Three chromatographic columns were used in the development of the method. ZIC-HILIC column with polar organic phase and C18 and Kinetex PFP columns with reverse phase. We focused in particular on a short time of separation, sharp tailless peaks and separation of all components of the mixture. Using a Kinetex PFP column, the optimal method for separating the test mixtures was found. The use of a mobile phase of 10 mM ammonium acetate/0,1% formic acid and methanol was shown to be the most appropriate, with a mobile phase flow rate of 0,6 ml/min. By modifying the gradient and temperature, all components of the tested mixtures were separated, the peaks were sharp, and the separation time in most cases ranged do not exceed 10 min. The method is also directly applicable in conjunction with a mass detector.

Keywords: High Performance Liquid Chromatography (HPLC), flavonoids, polyphenolic substances, sulfation, separation

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	8
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 Klasifikace polyfenolů	10
1.1.1 Flavonoidy	11
1.1.2 Antoxantiny	11
1.1.3 Antokyany	11
1.1.4 Fenolové kyseliny	12
1.2 Výskyt polyfenolických sloučenin v potravinách a jejich biologické účinky ..	13
1.3 Sulfatace	15
1.3.1 Chemická sulfatace	15
1.3.2 Enzymová sulfatace	16
1.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	16
1.4.1 Princip HPLC	17
1.4.2 Stacionární fáze v HPLC	19
1.4.3 Detekční systémy v HPLC	20
1.4.4 Trendy v HPLC	21
1.4.5 Separace vysoce polárních látek v HPLC	21
1.5 Další chromatografické metody	25
2 CÍL PRÁCE	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Chemikálie	27
3.2 Mobilní fáze, roztoky, média a biologický materiál	28
3.3 Přístroje a pomůcky	28
3.4 Příprava vzorků	29
3.5 Příprava mobilní fáze octanu amonného	32
3.6 Příprava sulfátu kyseliny kávové	33
3.6.1 Příprava enzymu	33
3.6.2 Příprava sulfátu kyseliny kávové	33
3.6.3 Úprava reakční směsi a separace gelovou chromatografií	34
3.7 Podmínky separace na HPLC	34
3.7.1 Kolona C18	34
3.7.2 Kolona ZIC-HILIC	34
3.7.3 Kolona Kinetex PFP	34
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	37

4.1	Výsledky	37
4.1.1	Kolona C18 – metoda A1	37
4.1.2	Kolona ZIC-HILIC – metoda B1	37
4.1.3	Kolona ZIC-HILIC – metoda B2	38
4.1.4	Kolona Kinetex PFP – metoda C1	39
4.1.5	Kolona Kinetex PFP – metoda C2	40
4.1.6	Porovnání t_R a $w_{0,05}$ vybraných analytů dosažených na testovaných kolonách	42
4.1.7	Úprava metody C1 pro separaci směsi kyseliny kávové, katecholu, ampelopsinu, kvercetin, floroglucinolu a silychristinu	43
4.1.8	Enzymová příprava sulfátu kyseliny kávové	47
4.1.9	Purifikace enzymové reakční směsi	47
4.2	Diskuze	50
5	ZÁVĚR	53
	ZDROJE	54
	PŘÍLOHA A	
	PŘÍLOHA B-1	
	PŘÍLOHA B-2	
	PŘÍLOHA C	
	PŘÍLOHA D	
	PŘÍLOHA E	
	PŘÍLOHA F	

Seznam zkratek

- 2D – LC – dvoudimenzionální kapalinová chromatografie
- AcCN – acetonitril
- AM – ampelopsin
- AMS – ampelopsin-4'-*O*-sulfát
- AST – bakteriální aryl-sulfotransferáza
- CAT – katechol
- CATS – katechol-*O*-sulfát
- CAF – kyselina kávová
- CAFS – sulfát kyseliny kávové (směs 3-*O*-sulfátu a 4-*O*-sulfátu kyseliny kávové)
- DCC – *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid
- DHB – 2,3-dihydroxybenzoová kyselina
- DHBS – 3-*O*-sulfát kyseliny 2,3-dihydroxybenzeové
- DHSB – 2,3-dehydrosilybin
- DHSBS – 20-*O*-sulfát 2,3-dehydrosilybinu
- DHSBSS – 7,20-di-*O*-sulfát 2,3-dehydrosilybinu
- DMSO – dimethylsulfoxid
- HILIC – hydrofilní interakční chromatografie
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- IPLC – iontově párová kapalinová chromatografie
- IPTG – isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranosid
- LB medium – Luria-Bertani medium
- LLC – kapalinová rozdělovací chromatografie
- LSC – kapalinová adsorpční chromatografie
- MECAT – 4-methylkatechol
- MECATS – sulfát 4-methylkatecholu (směs 1-*O*-sulfátu a 2-*O*-sulfátu 4-methylkatecholu)
- MeOH – methanol
- MF – mobilní fáze

- NG – naringenin
- NGS – 4'-*O*-sulfát naringenu
- OD – optická denzita
- PAPS – 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
- PFP – pentafluorfenyl
- PHG – floroglucinol
- PHGS – sulfát floroglucinolu
- *p*-NP – *p*-nitrofenol
- *p*-NPS – *p*-nitrofenylsulfát
- Q – kvercetin
- QS – 3'-*O*-sulfát kvercetinu
- QSS – disulfát kvercetinu (směs 3',4'-di-*O*-sulfátu, 7',3'-di-*O*-sulfátu a 7',4'-di-*O*-sulfátu kvercetinu)
- $R_{1,2}$ – rozlišení píků
- SB – silybin
- SBS – 20-*O*-sulfát silybinu
- SEC – gelová permeační chromatografie
- SCH – silychristin
- SCHS – 19-*O*-sulfát silychristinu
- SULTs – sulfotransferázy
- TFA – trifluoroctová kyselina
- TLC – tenkovrstevná chromatografie
- t_R – retenční čas
- Tris-Gly pufr – tris-glycinový pufr
- UHPLC – ultravysokoučinná kapalinová chromatografie
- $w_{0,05}$ – šířka píku v 5 % výšky píku

1 Teoretická část

1.1 Klasifikace polyfenolů

Polyfenolické látky jsou rozmanitou skupinou přirozeně se vyskytujících přírodních látek s různými funkcemi. V rostlinách vznikají jako sekundární metabolit. Běžně se vyskytují v potravinách, ovoci, zelenině, v celozrnných výrobcích, čokoládě a také v čaji. Společným znakem všech skupin je přítomnost alespoň jednoho aromatického jádra, substituovaného hydroxylovou skupinou. Dalším společným znakem těchto skupin je vazba na jiné molekuly jako například sacharidy nebo bílkoviny. V rostlinách se ale polyfenolické látky mohou vyskytovat i volně [1].

Polyfenoly patří mezi nejpočetnější a nejrozšířenější přírodní látky nacházející se v potravě. Je známo více než 8000 fenolických struktur, do nichž spadá více než 4000 flavonoidů. Skupina polyfenolů je velmi rozmanitá a obsahuje několik podskupin fenolických sloučenin. Polyfenoly jsou klasifikovány podle zdroje původu, biologické funkce a chemické struktury (tabulka 1.1). V rostlinách se obvykle vyskytují jako glykosidy s cukernými jednotkami [1].

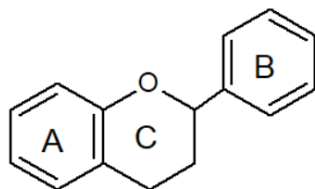
Tabulka 1.1: Dělení polyfenolických sloučenin podle základní struktury [2]

Třída	Podtřída	Skelet	Příklady
Flavonoidy	Flavony	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavon, luteolin, chrysin
	Flavonoly		Rutin, kvercetin
	Isoflavony		Genistein, glycitein
	Flavanony		Hesperidin, flavanon
	Flavanoly		Katechin
	Anthokyany		Kyanidin
Fenolové kyseliny	Deriváty kyseliny benzoové	C ₆ -C ₁	Kyselina gallová
	Deriváty kyseliny hydroxykosořicové	C ₆ -C ₃	Kyselina kumarová
Taniny	Hydrolyzovatelné taniny	C ₆ -C ₃ -C ₆	Gallotaniny
	Kondenzované taniny		Katechin
Stilbeny		C ₆ -C ₂ -C ₆	Resveratrol
Lignany		(C ₆ -C ₃) _n	Matairesinol

1.1.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nejrozšířenější skupinou polyfenolických látek. Oproti jiným mají relativně malou molekulovou hmotnost a jsou rozpustné ve vodných roztocích v závislosti na jejich struktuře a polaritě vazeb. Uhlíkový řetězec má obecnou strukturu C₆-C₃-C₆, přičemž jednotky C₆ mají aromatickou povahu (kruh A a B). Tyto dva kruhy jsou spojeny tříuhlíkatým řetězcem tvořený pyranovým kruhem (kruh C) (obrázek 1.1). Pyranový kruh se vyznačuje strukturálními rozdíly, což umožňuje flavonoidy dále dělit na antoxantiny (flavony, flavonoly, isoflavony, flavanoly, flavanony) a antokyany. Jsou dělené v závislosti na oxidačním stavu pyranového kruhu a methylaci kruhu A a B [1, 3].

Flavonoidy jsou zodpovědné za žluté, červené a modré zbarvení květů a plodů rostlin; tyto rostlinné pigmenty jsou sekundárním metabolitem rostlin. Kromě barvy hrají důležitou roli také v chuti a syntéze enzymů a vitaminů [4].



Obrázek 1.1: Obecná struktura flavonoidů

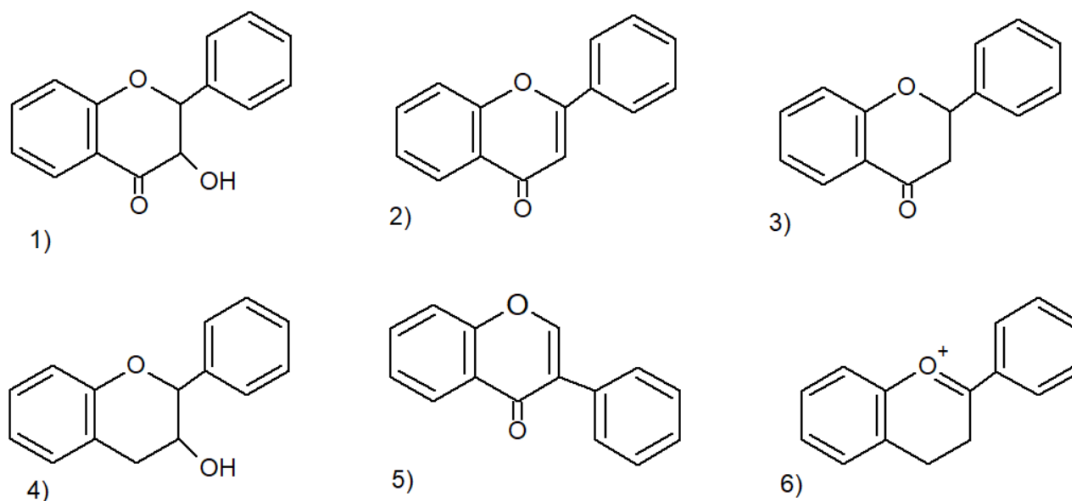
1.1.2 Antoxantiny

Do skupiny antoxantinů patří flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly a isoflavony (obrázek 1.2). Jejich struktury jsou velice rozmanité, liší se zejména pozicí hydroxylové skupiny na aromatickém a pyranovém kruhu. Stejně jako antokyany to jsou rostlinné pigmenty, jejich zbarvení je spíše světlé (žlutá barva), ale mohou být i bezbarvé; barva závisí především na pH. Mezi nejrozšířenější antoxantiny v rostlinách patří flavonoly, např. rutin nebo kvercetin, vyskytující se především v ovoci a zelenině. Mezi významné patří také isoflavony, které mají antikarcinogenní účinky a nacházejí se v sóje. Flavanony jsou přítomné v citrusových plodech. Flavony a flavanoly jsou obsaženy ve víně, čokoládě nebo čaji. Flavanoly se nejčastěji pojí s kyselinou gallovou, existují v monomerní nebo polymerní formě (proantokyanidiny a taniny) [3, 5].

1.1.3 Antokyany

Antokyany jsou přírodní rostlinné pigmenty, které dodávají rostlinám, ovoci, zelenině

a dalším potravinám barevný vzhled, především jsou to barvy červená, modrá a fialová (obrázek 1.2). V přírodě se vyskytují v glykosylované formě. Hlavními antokyany nalezenými v rostlinách jsou např. kyanidin, malvidin či delphinidin. Účinkují proti některým patologickým procesům, jako je rakovina, zánět, obezita nebo kardiovaskulární onemocnění [3].



Obrázek 1.2: Obecné struktury flavonoidů: 1) flavanolů, 2) flavonů, 3) flavanolů, 4) flavanonů, 5) isoflavonů, 6) antokyanů

1.1.4 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny patří mezi další polyfenolické sloučeniny nacházející se přirozeně v ovoci a zelenině. Lze je dále dělit na dvě skupiny podle toho, zda jsou odvozené od hydroxybenzoové kyseliny nebo hydroxyskořicové kyseliny. Uhlíkový řetězec má strukturu C₁-C₆, nebo C₃-C₆ [1].

Hydroxybenzoové kyseliny se vyznačují jednou karboxylovou skupinou (COOH) a jejími nejběžnější deriváty jsou kyselina *p*-hydroxybenzoová, gallová a vanilková. Zatímco sloučeniny odvozené od hydroxyskořicové kyseliny mají dvě uhlíkové kostry (C₆H₅CHCHCOOH) a obsahují alespoň jednu molekulu vodíku nahraditelnou hydroxylovou skupinou, tato skupina je pak nejvíce zastoupena kyselinou *p*-hydroxyskořicová, *p*-kumarovou a kyselinou kávovou [3]. Zatímco v ovoci a zelenině se tyto sloučeniny mohou nacházet volně, v semenech se obvykle nacházejí vázané na další sloučeniny. Fenolové kyseliny mají velký biologický potenciál, můžou působit

jako antidepresivum, mají protizánětlivé a neuroprotektivní účinky [1].

Další skupiny polyfenolických látek, jako jsou taniny, lignany a stilbeny, se v potravinách vyskytují v menší míře a tvoří významnou složku lidské stravy.

1.2 Výskyt polyfenolických sloučenin v potravinách a jejich biologické účinky

Hlavními zdroji polyfenolů jsou především nejrůznější druhy ovoce (jahody, borůvky), zelenina (mrkev, brokolice, cibule), obiloviny a luštěniny; jsou také přítomny v bylinkách a koření (bazalka, pepř, tymián). Významným zdrojem jsou nápoje (víno, káva, čaj, ovocné džusy) a čokoláda. Flavonoidy se v rostlinách vyskytují především jako β -glykosidy, sacharidovou složkou může být glukóza nebo rhamnóza. Nejčastěji vyskytující se flavonoidy v potravě jsou oligomerní proantokyanidiny a flavanoly. Oligomerní proantokyanidiny jsou přítomné v ovoci čokoládě, a červeném víně, flavanoly pak v čaji, ovoci a čokoládě. Antokyany jsou barevné pigmenty ovoce a červeného vína. Flavonoly můžeme najít v ovoci, zelenině (cibuli) a v nápojích (čaj). Isoflavonoidy se nacházejí především v sóje. Mezi fenolové kyseliny se řadí kyselina kávová, ferulová (součást vlákniny) a gallová, které se nacházejí v rostlinách jako estery. V kávě můžeme nalézt kyselinu chlorogenovou, jež se kromě kávy nachází také v bramborách a jiných druzích zeleniny a ovoce [5].

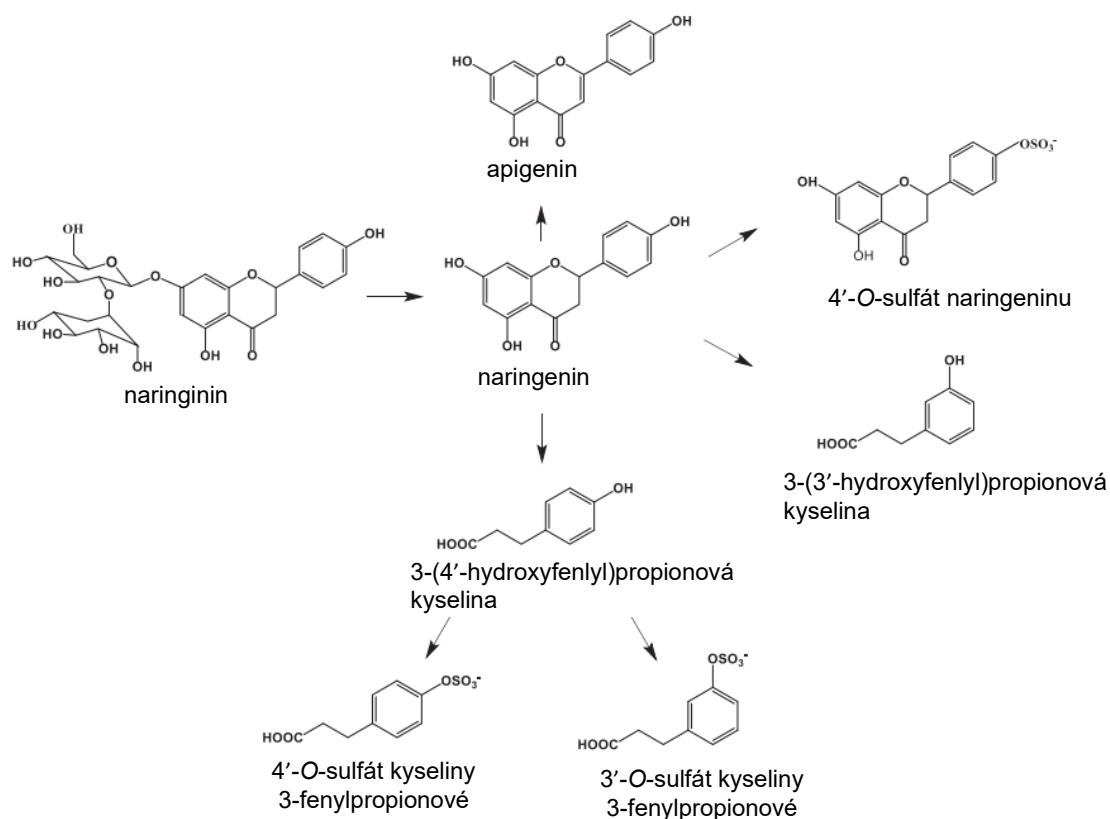
Antokyaniny jsou přítomné především v červeném víně, borůvkách nebo jahodách. Vysoký obsah fenolických kyselin mají nejrůznější bobule jako brusinky, borůvky a maliny. Flavony můžeme najít v bylinkách a koření jako řebíček nebo heřmánek. Černý bez a citrusové plody obsahují flavanony. V obilovinách a lněném semínku můžeme najít lignany [6, 7].

Flavonoidy, fenolové kyseliny a jejich konjugáty jsou obecně považovány za součást zdravé stravy. Strava bohatá na ovoce a zeleninu přispívá ke zpoždění procesu stárnutí, ke snížení rizika vzniku zánětu a oxidačního stresu souvisejícího s chronickými chorobami jako například kardiovaskulární onemocnění, ateroskleróza, cukrovka, rakovina a neurologická onemocnění. [8] Polyfenoly jako silné antioxidanty doplňují funkci antioxidantních vitaminů a enzymů jako obrana proti oxidačnímu stresu způsobenému reaktivními formami kyslíku [1]. Polyfenolické látky mohou rostliny a živočichové využívat i jako obranu a ochranu proti jiným organismům; např. flavonoidy

a isoflavonoidy mohou sloužit jako fungicidy k ochraně proti některým houbám.

V poslední době přibývají důkazy o tom, že tyto polyfenoly fungují spíše na úrovni receptorů, než že by vyrovnávaly oxidační a radikálový stres v buňkách [9]. K přesnému posouzení účinků polyfenolických látek je tedy nutné další podrobné studium jejich toxikologie, metabolismu a interakcí s ostatními složkami stravy.

Polyfenolické látky jsou v organismu v řádu několika desítek minut metabolizovány v rámci tzv. II. fáze biotransformace, to znamená, že jsou sulfatovány, glukuronidovány nebo methylovány pomocí různých sulfotransferáz (obrázek 1.3) [10]. Tyto konjugáty zůstávají v organismu déle než samotné výchozí látky, a proto je pro studium metabolismu polyfenolů nutné získat dobře charakterizované standardy těchto konjugátů. V předkládané práci se jedná zejména o konjugáty sulfátů flavonoidů, fenolických kyselin a methylcatecholu.



Obrázek 1.3: Metabolity naringeninu identifikované ve střevní tkáni [11]

1.3 Sulfatace

Sulfatace látek je významnou přirozenou reakcí v přírodě, hraje důležitou roli při odstraňování látek z organismu. V lidském těle může docházet k sulfataci flavonoidů, karotenoidů, steroidů, antibiotik, léků, hormonů, sacharidů a proteinů. Při sulfataci látek v organismu dochází ke změnám v biologické aktivitě látek [12].

Sulfatace je obvykle považována za detoxikační reakci. Produkty těchto reakcí jsou polární a dobře rozpustné ve vodě, toxické látky mohou být takto vyloučeny z těla [13]. Sulfatace i desulfatace jsou důležité například při řízení reakcí steroidů nebo při detoxikaci fenolických látek v játrech [12].

Sulfatované látky mívají zajímavé biologické účinky, například sulfatované flavonoidy a obecně polyfenoly mohou mít antikoagulační, antivirové, protizánětlivé a protinádorové účinky. Tyto látky se objevují také při vývoji, diferenciaci a regulaci. Z těchto důvodů mají svůj význam ve farmakologii [13, 14].

Sulfatace mění mnoho důležitých parametrů, jako jsou fyzikálně-chemické vlastnosti, náboj, velikost a rozpustnost molekuly [12].

1.3.1 Chemická sulfatace

Sulfatace se může jevit jako jednoduchá jedнокroková reakce, avšak chemická syntéza biologicky aktivních sloučenin je velmi náročná [15].

Při zavádění sulfátové skupiny se mění fyzikálně-chemické vlastnosti molekul oproti nesulfatovaným molekulám. Pro svou vysokou polaritu jsou sulfatované molekuly velmi málo rozpustné v organických rozpouštědlech, což obvykle způsobuje problémy v dalším zpracování a čištění. Sulfátové skupiny jsou velmi labilní v kyselém prostředí a při vysokých teplotách [15].

Chemická sulfatace se provádí obvykle za použití komplexů oxidu sírového s terciárními aminy nebo amidy (tedy v zásaditém prostředí) [12]. Tato reakce se provádí pomocí kyseliny sírové a DCC (*N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid) nebo pomocí 2,2,2-trichloroethylesteru kyseliny chlorosírové. Tyto reakční podmínky jsou ale poměrně extrémní a není zde zajištěna dostatečná regiosektivita [12, 14, 15].

1.3.2 Enzymová sulfatace

Oproti chemické sulfataci má enzymová sulfatace značné výhody, především to jsou mírnější podmínky reakce a vysoká regioselektivita [12].

Při odstraňování nebezpečných látek z těla využívá organismus metabolickou sulfataci. Metabolická sulfatace probíhá v cytosolu pomocí sulfotransferáz (SULTs) a 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS). SULTs katalyzují přenos sulfátové skupiny. PAPS pak daruje aktivovanou sulfátovou skupinu ($-\text{SO}_3$) akceptorové hydroxylové, fenolové skupině nebo aminoskupině. Tímto způsobem se zvýší záporný náboj a látky se snáze vyloučí z těla. S použitím těchto reakcí se ovšem pojí určité problémy jako je vysoká cena PAPS a jeho regenerace [12, 15].

Druhou možností je použití bakteriální aryl-sulfotransferázy (AST), která není závislá na PAPS, a může být tedy mnohem výhodnější při syntéze sulfátů [12, 14].

Oproti chemické sulfataci má enzymová sulfatace pomocí AST mírnější reakční podmínky. Reakce probíhá v jednom kroku, není zde nutná ochrana funkčních skupin, má vysokou substrátovou specifitu a regioselektivitu [12, 14].

1.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Chromatografie je jednou z nejvyužívanějších metod pro separaci, identifikaci a stanovení anorganických a organických látek. Základní podstatou chromatografie je rozdělování složek směsi vzorku mezi dvě fáze, fázi mobilní a stacionární. Mobilní fáze protéká fází stacionární a unáší sebou složky směsi [16, 17]. Fáze se mezi sebou liší fyzikálními nebo chemickými vlastnostmi. Separace závisejí na vlastnostech analyzované látky a její interakce s fází, dále závisí na typu kolony, spojovacích cestách, detektoru, průtoku a teplotě [18].

Podle druhu použité stacionární fáze se chromatografické techniky dělí na kolonovou a planární chromatografii. V kolonové chromatografii je stacionární fáze umístěna v úzké trubici a mobilní fáze je do ní hnána tlakem nebo gravitační silou, u planární chromatografie je stacionární fází porézní vrstva a pohyb mobilní fáze po stacionární fází je výsledkem působení kapilárních sil nebo gravitace [19].

Dále se chromatografické metody dělí podle druhu použité mobilní fáze, a to na plynovou chromatografii, kde mobilní fází je plyn a kapalinovou, kde je mobilní fází kapalina.

Můžeme se setkat také s fluidní chromatografií, kde je mobilní fáze látka v nadkritickém stavu, nebo plazmovou chromatografií, kde je mobilní fáze proud iontů [17, 19].

Při analýze můžeme využít dvou typů eluce, jedná se o eluci izokratickou a gradientovou. Při izokratické eluci se složení mobilní fáze nemění, zatímco u gradientové eluce eluční síla mobilní fáze roste během analýzy [16, 17].

Poslední dělení se týká povahy děje, který při separaci převládá; rozeznáváme tak chromatografii adsorpční, rozdělovací, gelovou, afinitní a iontově-výměnnou [19].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie neboli HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) je velmi využívanou metodou pro určení hledaného analytu, rozdělování jednotlivých složek směsi a také slouží ke stanovení jejich množství, je to tedy kvalitativní a kvantitativní metoda [17].

HPLC má oproti ostatním separačním metodám několik výhod mezi které patří vysoká citlivost a přesnost metody, také se může použít pro nejrůznější typy látek, jako jsou organické a anorganické analyty, ale i některé biologické materiály. Dalšími výhodami může být rychlost analýzy, její automatizace a malé nároky na spotřebu analytu [17].

Na rozdíl od klasické kolonové chromatografie, kde je separace řízena gravitací, je mobilní fáze spolu s analytem vháněna do kolony pod vysokým tlakem, což značně urychluje analýzu [17].

1.4.1 Princip HPLC

Proces separace pomocí HPLC je založen na rozdílné distribuci dělených látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze, mezi fází mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou). V kapalinové chromatografii je mobilní fáze kapalina. Stacionární fáze je tuhá látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči. Mobilní fáze (kapalina) je v HPLC vháněna čerpadlem do chromatografického systému pod vysokým tlakem. Mezi stacionární a mobilní fází dochází k opakovanému ustalování rovnováhy dělených látek. Distribuci složek mezi dvě fáze pak lze popsat distribuční konstantou. Čím vyšší je hodnota distribuční konstanty, tím delší dobu setrvávají molekuly ve stacionární fází, a tím větší je jejich retence [17].

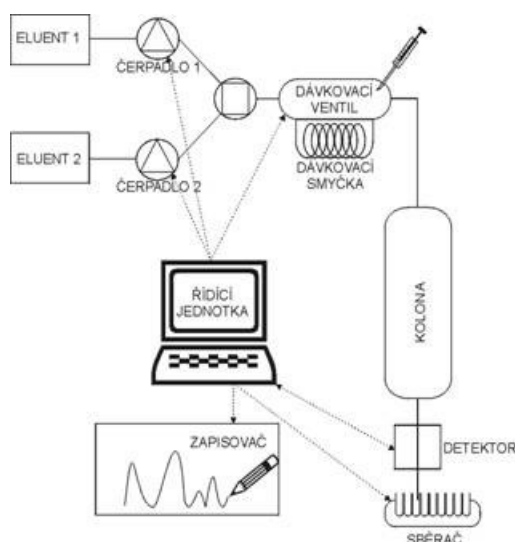
V HPLC se může uplatnit systém s normálními fázemi, kde jsou pro separaci látek

používány polární stacionární fáze a mobilní fáze s nižší polaritou než stacionární fáze, nebo systém s reverzní fází, kde je mobilní fáze polární (obvykle směs vodné složky s polárním organickým rozpouštědlem mísitelným s vodou) a stacionární fáze s nepolárním charakterem. U nepolární stacionární fáze se nejčastěji jedná o dlouhé uhlíkaté řetězce na nosiči (silikagel); nejčastěji používanou fází je C18 [17].

Separace a eluce jednotlivých složek směsi je ovlivněna povahou stacionární i mobilní fáze. Eluce může být provedena mobilní fází o konstantním složení v čase (tzv. izokratická eluce), nebo mobilní fází se zvyšující se eluční silou (tzv. gradientová eluce). Při gradientové eluci se zvyšuje poměr mobilní fáze ve prospěch jedné z elučních složek, což se může zkrátit čas analýzy, zvýšit citlivost nebo zlepšit rozdělování složek směsi [16, 17].

Základem každého chromatografického systému je kolona. Od kolony se odvíjí selektivita dané metody a účinnost separace. Kolona u HPLC musí mít základní vlastnosti, mezi které patří odolnost vůči vysokým tlakům a odolnost vůči chemickému působení mobilní fáze. Kolony jsou zpravidla vyrobeny z nerezové oceli, ale mohou být použity i skleněné nebo plastové trubice. Většina kolon je dlouhá asi 5 až 25 cm, jejich vnitřní průměr je obvykle 3 až 5 mm a velikost částic se pohybuje kolem 5 μm [16].

Mezi neodmyslitelnou součást aparatury patří také detektor. Nejčastěji používané detektory jsou založené na absorpci ultrafialového nebo viditelného záření, protože zde má svou absorpční oblast mnoho organických látek. Nejčastěji užívanými jsou deuteriové výbojky a lampy se žhaveným wolframovým vláknem [16]. Na obrázku 1.4 je zobrazeno schéma HPLC.



Obrázek 1.4: Schéma vysokoúčinné kapalinové chromatografie [20]

1.4.2 Stacionární fáze u HPLC

Základem pro separaci pomocí HPLC je výběr vhodné stacionární fáze. Stacionární fáze jsou děleny podle několika parametrů, dělí se například podle skupenství, typu fáze, podle chromatografického módu a chemického složení. Podle skupenství se dělí na kapalnou (kapalinová rozdělovací chromatografie – LLC) a tuhou (kapalinová adsorpční chromatografie – LSC). Podle typu fáze jsou to kolony polární, nepolární a amfoterní, tzv. zwitterionty. Členění dle chromatografického módu je následovné: normální, reverzní, ionexové, HILIC, HIC, gely, afinitní a chirální. Posledním typem dělení je pak rozčlenění podle chemického složení na kolony s anorganickými oxidy (např. silikagel, oxid zirkoničitý, oxid hlinitý a oxid titaničitý), chemicky vázané fáze na bázi silikagelu, polymerní a hybridní stacionární fáze, a nakonec stacionární fáze na bázi grafitového uhlíku [17].

Každá kolona má své výhody i nevýhody. Silikagel je nejčastějším typem používaného adsorbentu, mezi jehož výhody patří vysoká mechanická odolnost, prakticky nulová bobtnavost a nesrážlivost v organických rozpouštědlech. Silikagel má vysoce porézní částice, což zajišťuje volný průnik analytů, na druhou stranu je stabilní jen v rozsahu pH 2 – 8, neboť při vyšším pH dochází k alkalické hydrolyze. Výbornou náhražkou se proto zdá být oxid zirkoničitý, který má podobné vlastnosti jako silikagel, ale na rozdíl od silikagelu je stabilní v celém rozsahu pH i při vyšších teplotách, oproti silikagelu má ale nižší separační účinnost. Obdobně je tomu u polymerních fází, které jsou sice stabilní v celém rozsahu pH a při vyšších teplotách, problém je zde ale přítomnost mikropórů

a tlakové omezení oproti silikagelu. Grafitizované saze (porézní grafitový uhlík) mají nižší účinnost a také jsou velmi křehké, ale opět jsou stabilní v celém rozsahu pH, při vyšších teplotách a lze použít jakékoliv rozpouštědlo. Poslední možností je oxid hlinitý (alumina), který je vyráběn podobně jako silikagel a lze na něm separovat i vysoce bazické látky, protože je stabilní v pH rozmezí 2 – 12 [17].

1.4.3 Detekční systémy v HPLC

U HPLC lze využít několik typů detektorů. Detektory se umísťují v systému za kolonu a zaznamenávají rozdíl signálu mezi procházející čistou mobilní fází a mobilní fází s analytem. Základními dvěma typy jsou detektor koncentrační a hmotnostní. Koncentrační detektor zaznamenává změnu hmotnostní koncentrace látky v eluentu, zatímco hmotnostní detektor zaznamenává změnu hmotnostního toku látky v eluentu. Detektor může být také destrukční nebo nedestrukční, u nedestrukčního detektoru nedochází ke změně chemického složení látky, zatímco u destrukčního se látka nevratně mění [17].

Ideální detektor by měl mít několik vlastností, mezi nejdůležitější patří vysoká citlivost, použití na jakoukoliv látku, vysoká specifita, spolehlivost, signál by neměl být závislý na změně složení mobilní fáze nebo na změně teploty, měl by mít široký lineární dynamický rozsah. Žádný detektor však nebude splňovat všechny tyto vlastnosti, největším problémem je asi univerzálnost detektoru, protože ho zpravidla nebude možno použít na jakýkoliv analyt [17].

Mezi nejčastěji využívané detektory patří detektor spektrofotometrický (UV/VIS), který měří absorbance látek v oblasti vlnových délek od 190 – 800 nm. Spektrofotometrický detektor může být s fixní vlnovou délkou nebo s nastavitelnou vlnovou délkou, dále to může být detektor s diodovým polem (PDA, DAD), který zaznamenává celé spektrum v reálném čase a umožňuje detekci analytů při jakékoliv vlnové délce. Dalšími typy detektorů jsou detektory fluorescenční, refraktometrické, elektrochemické (coulometrický a amperometrický) a vodivostní. Posledním typem je detektor hmotnostní, který detekuje ionty vznikající ionizací analytů, a proto se zde musí provést převod analytu z kapalně mobilní fáze na ionty ve fázi plynné [17].

1.4.4 Trendy v HPLC

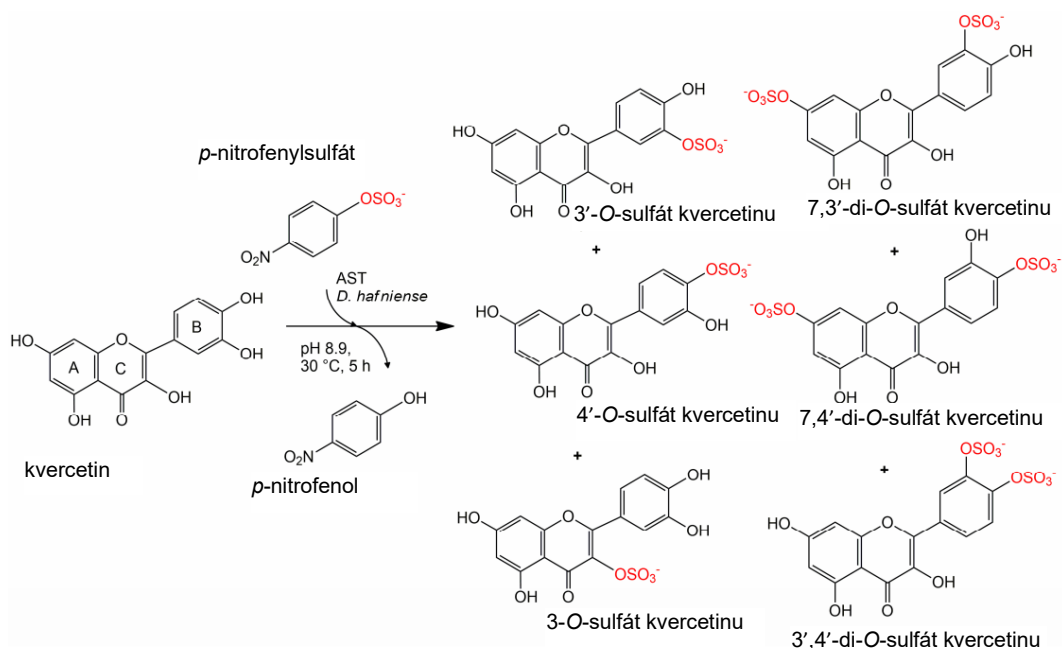
Chromatografické systémy se neustále vyvíjejí; při vývoji je cílem především zrychlení separace nebo zlepšení kvality účinnosti, citlivosti a rozlišení měření. Mezi nové technologie, které umožňují rychlejší separace, patří například HPLC za zvýšené teploty nebo použití velmi vysokých průtoků mobilní fáze na porézní nečasticové stacionární fázi – tzv. monolitické stacionární fáze; dále se využívají povrchově porézní částice. Jednou z dalších možností může být také superkritická fluidní chromatografie. Ke zlepšení separační účinnosti se využívá dvoudimenzionální kapalinová chromatografie (2D LC) nebo miniaturizované techniky jako kapilární nebo nano-kapalinová chromatografie. Tyto techniky ale neurychlují separace [17].

Asi nejvýznamnějším trendem je rozvoj UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*). Pro zvýšení účinnosti separace se zde používají částice menší než 2 μm , využívají se kratší kolony s délkou 5 – 15 cm a snižuje se i jejich průměr na 2,1 mm. Hlavní výhody tohoto systému jsou lepší účinnost, zlepšení rozlišení, zrychlení analýzy a také malá spotřeba mobilní fáze. Nevýhodou je však práce při velmi vysokých tlacích (60 – 100MPa), navíc při použití malých částic je zde znatelný nárůst zpětného toku. V neposlední řadě jsou nevýhodou i pořizovací náklady na přístrojové vybavení [17].

1.4.5 Separace vysoce polárních látek v HPLC

Při enzymových sulfatacích (obrázek 1.5) vzniká potřeba oddělit od sebe polární (např. kvercetin) a vysoce polární látky (např. 3-*O*-sulfát kvercetinu). Vysoce nabitě analyty způsobují v kapalinové chromatografii deformaci a rozmývání píků. Pro takové dělení je tedy důležité zvolit vhodnou kombinaci stacionární a mobilní fáze. Mezi nejčastěji používanými stacionárními fázemi patří kolona v reverzní fázi – C18. Tato kolona je nepolární a jako mobilní fáze se zde používá polární směs vody a organického rozpouštědla jako např. acetonitrilu, použít se také může kyselina mravenčí, TFA (trifluoroctová kyselina), nebo fosfátový pufr. Další často používanou kolonou je Kinetex PFP (pentafluorfenyl) s pevným jádrem, ke se jako mobilní fáze používá 0,1% TFA ve vodě a methanol, dále to může být také acetonitril nebo octan amonný. Poslední využívanou stacionární fází je HILIC kolona (hydrofilní interakční kapalinová chromatografie – metoda s polárně organickými fázemi), kde stacionární fáze je polární

a jako mobilní fáze se využívá vodně-organická směs s obsahem organického rozpouštědla 55 – 99 objemových %, přičemž nejčastěji je používán acetonitril a octan amonný.



Obrázek 1.5: Sulfatace kvercetinu katalyzovaná aryl-sulfotransferázou z *Desulfitobacterium hafniense* [21]

Valentová *et al.* pro separaci sulfátů kvercetinu použila jako stacionární fázi kolonu Kinetex PFP (150×4,6 mm; 5µm) a jako mobilní fázi vodu/TFA (100/0,1, v/v, fáze A) a methanol (fáze B) s lineárním gradientem. [21] Stejného postupu pro separaci sulfátů kvercetinu využila i Puchartová *et al.* (obrázek 1.6); malou změnou zde byla fáze B, kde do methanolu byla přidána voda (methanol/ voda, 80/20, v/v) [22]. Nevýhodou byla v obou případech koeluce sulfátů a nesymetrie píků v sestupné části. Tuto metodu zvolili i Begines *et al.* pro separaci sulfátů tyrosolu a hydroxytyrosolu [23]. Výsledkem byla opět koeluce sulfátů, rozmývání a deformace píků v sestupné části.

Kolону v reverzní fázi C18, použili Dueñas *et al.*, mobilními fázemi byly voda s 0,1% TFA (fáze A) a acetonitril (fáze B) s gradientovou elucí pro separaci sulfátů kvercetinu a epikatechinu (obrázek 1.7) [24]. I zde byla výsledkem koeluce látek, rozmývání látek, deformace píků a delší čas separace (30 min).

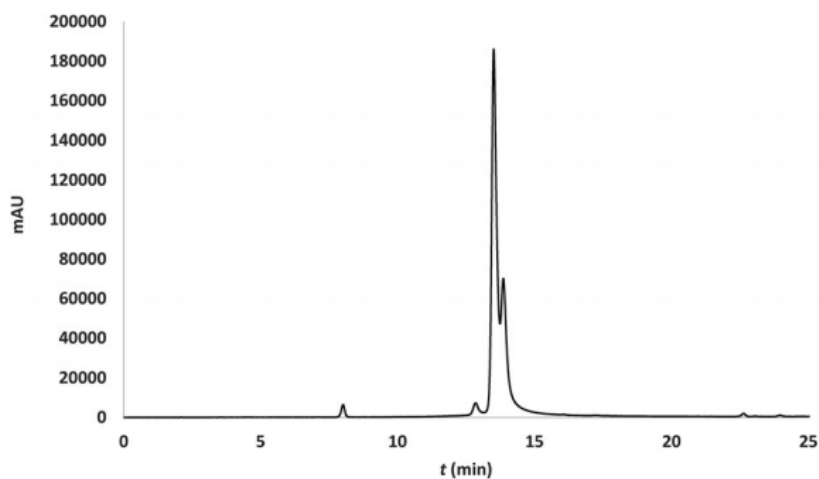
Kolону C18 použili Zhang *et al.* pro separaci myricetinu, dihydromyricetinu a hibifolinu, mobilní fáze byl acetonitril (fáze A) a voda/ 0,04% kyselina fosforečná (fáze B) [25]. Nevýhodou této metody byl poměrně dlouhý čas analýzy (až 60 min) a rozmývání píků.

Fosfátový pufr (25 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) jako mobilní fázi ve své práci publikoval van der Horst *et al.* při separaci sulfátů resveratrolu a floretinu, stacionární fází byla opět kolona C18 [14]. Nevýhodou této metody byl však poměrně dlouhý čas analýzy (30 min), fosfátový pufr by navíc mohl být problémem při použití hmotnostního detektoru místo spektrofotometrického.

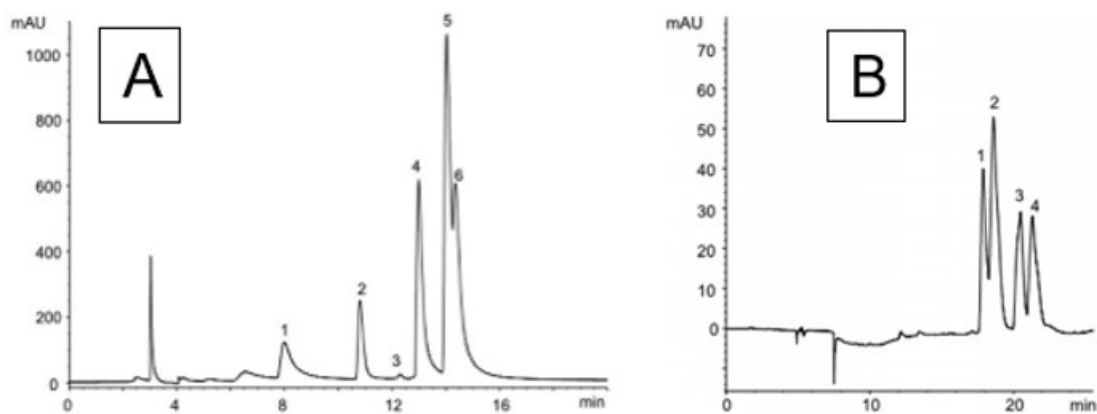
Ji *et al.* publikovali použití HILIC kolony s octanem amonným a acetonitrilem jako mobilní fáze na separaci katecholů (obrázek 1.8) [26]. Při této metodě docházelo k poměrně velkému rozmývání látek, jejich koeluci a deformaci píků.

Separaci vysoce polárních sulfatovaných látek lze řešit také pomocí IPLC (*Ion-Pairing Liquid Chromatography*). IPLC využívá běžnou reverzní fázi v kombinaci s mobilní fází, která je obohacena o iontově párové činidlo. Ionově párové činidlo (např. tetrabutylamonium-perchlorát, obecně aminy) vytváří s molekulou sulfátu s opačným nábojem hydrofobní pár. To vede k výraznému zvýšení retence analytu, a tedy k větší ostroti píku. Tuto metodu publikovali Saribaş *et al.* pro separaci sulfatovaných polysacharidů na polyaminové koloně, jako mobilní fázi zde použil dihydrogenfosforečnan sodný [27]. I zde se však nepodařilo úplně odstranit deformace píků (rozmývání látek) a nevýhodou je i čas separace přesahující 30 minut.

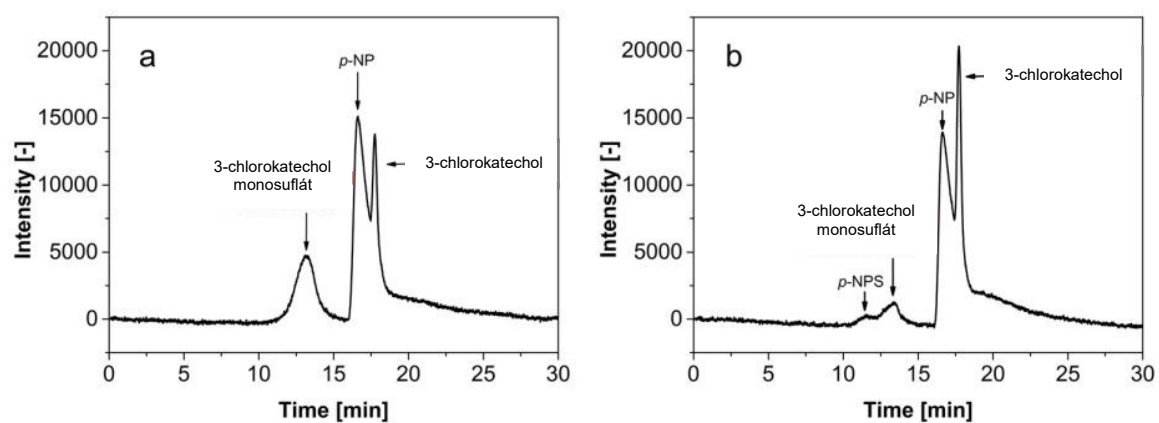
U všech výše uvedených metod se autoři potýkali s určitými nevýhodami, jako například dlouhými retenčními časy, rozmýváním látek a širokými nesymetrickými píky. V některých případech lze za nevýhodu považovat i použití fosfátových pufrů nebo iontově párových činidel, které nejsou kompatibilní s hmotnostní detekcí.



Obrázek 1.6: Příklad chromatogramu separace sulfátů kvercetinu na koloně Kinetex PFP (Puchartová et al.); nedochází zde k úplné separaci sulfátů, píky koeluují a nejsou symetrické v sestupné části píku [22]



Obrázek 1.7: Příklad chromatogramů separace sulfátů kvercetinu (A) a epikatechinu (B) na koloně C18 (Dueñas et al.); látky se rozmývají, koeluují (neseparují se všechny látky) a píky nejsou symetrické v sestupné části [24]



Obrázek 1.8: Příklad chromatogramů separace reakční směsi chlorokatecholu na HILIC koloně (Ji et al.); neseparují se všechny látky, píky koeluují a látky se rozmývají [26]

1.5 Další chromatografické metody

Kromě metody HPLC byly v práci použity i metody gelové chromatografie a tenkovrstevné chromatografie.

V gelové permeační chromatografii (*Gel Permeation Chromatography* – GPC nebo *Size Exclusion Chromatography* – SEC) se jednotlivé složky dělí podle své velikosti. Látky se dělí mezi pohyblivou částí mobilní fáze, která se nachází mezi zrn stacionární fáze, a mezi nepohyblivou část mobilní fáze, která se nachází uvnitř zrn stacionární fáze. Molekuly jsou při průchodu kolonou zadržovány v pórech stacionární fáze, menší molekuly pronikají hlouběji a mají vyšší retenční objemy než velké molekuly. Pro látky rozpustné ve vodě se jako stacionární fáze volí hydrofilní gel a jako mobilní fáze voda s příměsí organického rozpouštědla, pro látky nerozpustné ve vodě se používají hydrofobní gely a mobilní fází je organické rozpouštědlo. Existují i univerzální gely na bázi silikagelu, které jsou vhodné pro separaci hydrofilních i hydrofobních látek [19].

V tenkovrstevné chromatografii (*Thin Layer Chromatography* – TLC) je stacionární fáze umístěná na desce z vhodného materiálu, jako je sklo, hliník nebo polyester, tenká vrstva na desce je oxid hlinitý nebo silikagel. Vzorky jsou nanášeny na jeden konec chromatografické destičky (start) pomocí kapiláry. Destička se vzorky se vkládá do vyvíjecí komůrky, kde se nachází mobilní fáze. Mobilní fáze vzlíná po tenké vrstvě a vyvíjení se ukončí po dosažení konce destičky. Jednotlivé složky jsou unášeny mobilní fází a rozdělují se tím rychleji, čím méně jsou poutány ke stacionární fázi [19].

2 Cíl práce

- návrh a optimalizace analytické metody pro separaci sulfatovaných polyfenolických látek, především sulfátů flavonoidů, fenolových kyselin a katecholů za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)
- odstranění fosfátových pufrů a iontově párových činidel z mobilní fáze a použití nízkých průtoků mobilní fáze, tak aby bylo možné přímé spojení s hmotnostním detektorem
- zkrácení času separace, ostré symetrické píky a úplná separace všech složek směsi
- z časových důvodů nebylo možné vyzkoušet analýzu s hmotnostní detekcí, pouze optimalizovat pro ni separační podmínky

Cílem této práce bylo vyvinout robustní metodu, která odstraňuje nedostatky publikovaných metod a je univerzální pro separaci co nejvíce látek, především sulfátů flavonoidů, fenolových kyselin a katecholů. Při vývoji bylo žádoucí odstranění fosfátových pufrů a iontově párových činidel z mobilní fáze, zkrácení času separace (do 20 min), ostré symetrické píky a úplná separace všech složek směsi.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- 2,3-dehydrosilybin (DHSB), čistota 96,2 %
- 2,3-dihydroxybenzoová kyselina (DHB), analytický standard, čistota 97 % (Alfa Aesar, Německo)
- 3-*O*-sulfát kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové (DHBS), čistota 96 %
- 3'-*O*-sulfát kvercetinu (QS), čistota 100 %
- 4-methylkatechol (MECAT), analytický standard, čistota min. 95 % (Sigma-Aldrich, ČR)
- 4'-*O*-sulfát naringenin (NGS)
- 7,20-di-*O*-sulfát 2,3-dehydrosilybinu (DHSBSS)
- 19-*O*-sulfát silychristinu (SCHS), čistota 100 %
- 20-*O*-sulfát 2,3-dehydrosilybinu (DHSBS)
- 20-*O*-sulfát silybinu (SBS), čistota 99 %
- ampelopsin (AM), čistota 94 % (Herb Nutritionals Co., Ltd, Čína)
- ampelopsinsulfát (AMS), čistota 96 %
- disulfát kvercetinu (QSS), čistota 99,6 %
- floroglucinol (PHG), analytický standard, čistota 98 % (Alfa Aesar, Německo)
- kanamycin (Serva Electroporesis, Německo)
- katechol (CAT), analytický standard (Acros Organics, USA)
- kávová kyselina (CAF), analytický standard (Sigma-Aldrich, ČR)
- kvercetin (Q), analytický standard, čistota min. 95 % (Sigma-Aldrich, ČR)
- naringenin (NG), analytický standard, čistota 98 % (Sigma-Alchrid, ČR)
- *p*-nitrofenol (*p*-NP), analytický standard, čistota 100 % (Lachema, Česká republika)
- *p*-nitrofenylsulfát (*p*-NPS), analytický standard, čistota 99 % (Acros Organics, USA)
- sulfát floroglucinolu (PHGS), čistota 94 %
- sulfát katecholu (CATS)
- sulfát 4-methylkatecholu (MECATS), čistota 97 %
- sulfát kyseliny kávové (CAFS)

- silybin (SB), čistota 99,5 %
- silychristin (SCH), čistota 99 %

Pokud není uvedeno jinak, byly sulfáty látek vyrobeny a jejich struktury potvrzeny HRMS a NMR v Laboratoři biotransformací v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd ČR.

3.2 Mobilní fáze, roztoky, média a biologický materiál

- aceton (VWR Chemicals)
- acetonitril, použití pro UPLC/UHPLC (VWR Chemicals BDH[®], Avantor, USA)
- deionizovaná voda (Ultrapure, Watrex, CZ)
- dimethylsulfoxid (DMSO), obsah vody $\leq 0,03$ % (VWR Chemicals BDH[®], Avantor, USA)
- ethylacetát (VWR Chemicals BDH[®], Avantor, USA)
- kyselina chlorovodíková (Lachner, ČR)
- methanol, použití pro UPLC/UHPLC (VWR Chemicals BDH[®], Avantor, USA)
- mravenčí kyselina, čistota 99 – 100% (VWR Chemicals BDH[®], Avantor, USA)
- octan amonný (Lachner, ČR)
- LB médium: trypton (10 g), kvasničný extrakt (5 g), NaCl (5 g), doplnění vodou do 1000 ml; úprava na pH 7 pomocí NaOH
- pufr Tris-Gly: Tris-báze (3,03g), glycin (1,877 g), doplnění vodou do 250 ml, úprava na pH 8,9 pomocí HCl, výsledná koncentrace 100 mM
- kryoprotektovaná kultura kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformovaných plazmidem nesoucím gen AST z *D. hafniense*

3.3 Přístroje a pomůcky

- HPLC: Shimadzu Prominence LC (Shimadzu, Japonsko)
 - odplyňovač: DGU-20A_{3R}
 - čerpadlo mobilní fáze: LC-20AB
 - autosampler s termostatem: SIL-20A HT
 - kolonový termostat: CTO-20A
 - detektor s diodovým polem: SPD-20MA
 - sběr a zpracování dat: Shimadzu Lab Solution
 - membránový filtr 45 μm (Whatman, GE Healthcare, USA)

- filtrační zařízení pro membránovou filtraci Glassco (Gelman Sciences Corp., USA)
- kolony:
 - kolona Luna[®] Omega 3 μm Polar C18 100, rozměry 100 × 2,1 mm, velikost částic 3 μm, velikost pórů 100 Å (Phenomenex, USA)
 - kolona Kinetex 5 μm PFP 100Å, rozměry 150 × 4,60 mm, velikost částic 5 μm, velikost pórů 100 Å (Phenomenex, USA)
 - kolona ZIC[®]-pHILIC, rozměry 100 × 2,1 mm, velikost částic 5 μm (Merck, Německo)
- předkolony:
 - Security Guard[™] ULTRA Cartiges, UHPLC Fully Porous Polar C18 2,1 mm ID Columns (Phenomenex, USA)
 - Kinetex 5 μm PFP, rozměry 4 × 3 mm (Phenomenex, USA)
 - ZIC-HILIC guard column, rozměry 2,1 mm × 5 mm, 5 μm (Merck, Německo)

3.4 Příprava vzorků

Vzorky vybraných flavonoidů byly připraveny rozpuštěním naváženého množství látek v methanolu. V případě že se látky nerozpouštěly, byly protřepány nebo mírně zahřáty v teplé vodě nebo k nim byl přidán roztok dimethylsulfoxidu (DMSO). Veškeré navážky a koncentrace zásobních roztoků vzorků shrnuje tabulka 3.1 a 3.2.

Nejprve byla každá látka analyzována zvlášť, poté byly analyzovány látky jako modelové směsi. Modelová směs odpovídala reálnému složení enzymové sulfatační reakce. Do každé směsi bylo přidáno 30 μl standardu látky (struktury viz. obrázek 3.1) a jeho sulfátu, dále *p*-nitrofenol (*p*-NP) a *p*-nitrofenylsulfát (*p*-NPS) ze zásobních roztoků. U dalších vybraných polyfenolů pro separaci na koloně Kinetex PFP byl do směsi doplněn methanol do celkového objemu 200 μl. Naředění methanolem bylo zvoleno pro snížení intenzity odezvy při měření.

Modelové směsi:

- kyselina kávová (CAF/CAFS/*p*-NP/*p*-NPS);
- katechol (CAT/CATS/*p*-NP/*p*-NPS);
- 2,3-dihydroxybenzoová kyselina (DHB/DHBS/*p*-NP/*p*-NPS);
- 2,3-dehydrosilybin (DHSB/DHSBS/DHSBSS/*p*-NP/*p*-NPS);
- ampelopsin (AM/AMS/*p*-NP/*p*-NPS);
- 4-methylkatechol (MECAT/MECATS/*p*-NP/*p*-NPS);
- naringenin (NG/NGS/*p*-NP/*p*-NPS);
- floroglucinol (PHG/PHGS/*p*-NP/*p*-NPS);
- kvercetin (Q/QS/QSS/*p*-NP/*p*-NPS);
- silybin (SB/SBS/*p*-NP/*p*-NPS);
- silychristin (SCH/SCHS/*p*-NP/*p*-NPS).

Tabulka 3.1: Navážky, ředění a koncentrace zásobních roztoků vybraných polyfenolů pro porovnání separace na různých kolonách

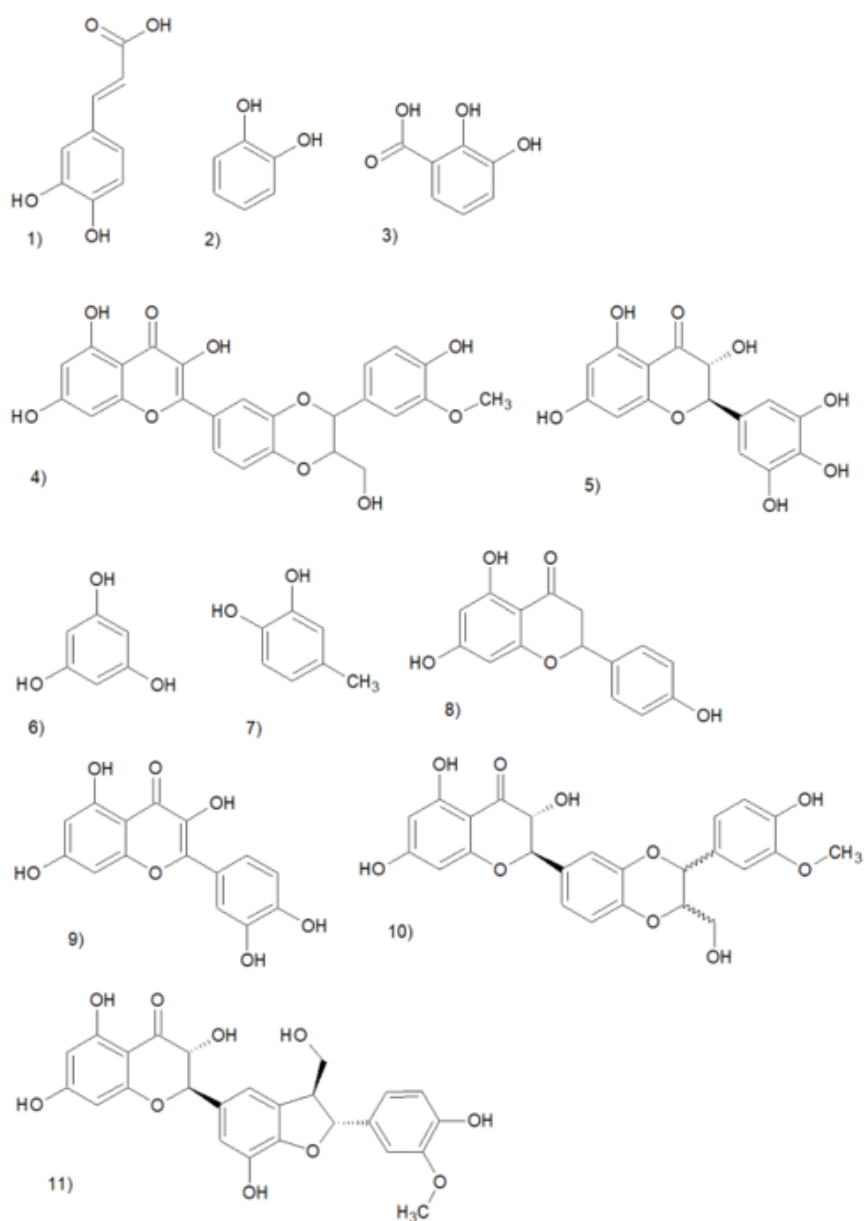
Látka	Navážka [mg]	Methanol [ml]	DMSO [ml]*	Hmotnostní koncentrace [mg/ml]	Molární koncentrace [mmol/l]
CAF	5,0	1,5	-	3,33	18,50
CAFS	3,7	1,5	-	2,47	9,55
CAT	11,5	1,5	-	7,67	40,40
CATS	2,7	1,5	-	1,80	9,46
DHB	4,5	1,0	0,5	3,00	19,50
DHBS	4,5	1,0	0,5	3,00	12,80
DHSB	10,0	1,0	0,5	6,67	13,90
DHSBS	3,0	1,0	0,5	2,00	3,57
DHSBSS	3,4	1,0	0,5	2,27	3,54
<i>p</i> -NP	3,2	1,0	-	3,20	23,00
<i>p</i> -NPS	7,7	1,0	-	7,70	29,90

*-: roztok nebyl přidán

Tabulka 3.2: Navážky, ředění a koncentrace zásobních roztoků dalších vybraných polyfenolů pro separaci na koloně Kinetex PFP

Látka	Navážka [mg]	Methanol [ml]	DMSO [ml]*	Hmotnostní koncentrace [mg/ml]	Molární koncentrace [mmol/l]
AM	3,4	0,5	-	6,80	21,20
AMS	1,8	0,5	0,1	3,00	7,50
MECAT	3,0	0,5	-	6,00	48,30
MECATS	1,4	0,5	-	2,80	13,70
NG	3,3	0,5	-	6,60	24,20
NGS	1,4	0,5	-	2,80	7,95
PHG	2,9	0,5	-	5,80	45,99
PHGS	1,4	0,5	-	2,80	13,60
Q	2,8	0,5	0,1	4,67	15,40
QS	1,0	0,5	0,1	1,67	4,36
QSS	1,5	0,5	0,1	2,50	5,41
SB	2,0	0,5	-	4,00	8,29
SBS	2,7	0,5	-	5,40	9,60
SCH	1,8	0,5	-	3,60	7,46
SCHS	2,1	0,5	-	4,20	7,47

*-: roztok nebyl přidán



Obrázek 3.1: Strukturální vzorce standardů výchozích látek: 1) kyselina kávová; 2) katechol; 3) 2,3-dihydroxybenzoová kyselina; 4) 2,3-dehydrosilybin; 5) ampelopsin; 6) floroglucinol; 7) 4-methylkatechol; 8) naringenin; 9) kvercetin; 10) silybin; 11) silychristin.

3.5 Příprava mobilní fáze octanu amonného

Pro 10 mM octanový pufr bylo odváženo 0,3850 g octanu amonného (pro 5 mM – 0,1940 g), k tomuto množství bylo přidáno 500 ml deionizované vody a 500 μ l mravenčí kyseliny. Tyto mobilní fáze byly použity pro kolny ZIC-HILIC a Kinetex PFP.

Před nanesením na kolonu byly všechny mobilní fáze přefiltrovány přes membránový filtr (0,45 μ m).

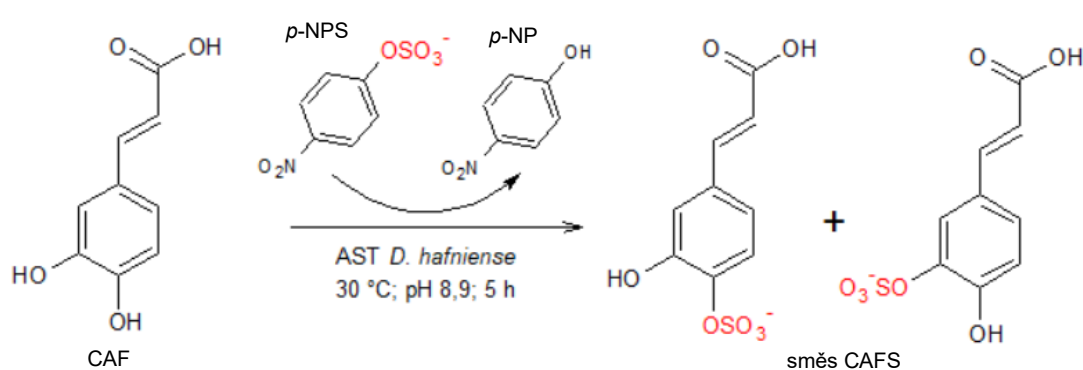
3.6 Příprava sulfátu kyseliny kávové

3.6.1 Příprava enzymu

Pro přípravu enzymu bylo 100 μ l kryoprotektované kultury kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformováno plazmidem nesoucím gen aryl-sulfotransferázy (AST) z *D. hafniense*. Vybraná kolonie byla zaočkována do 100 ml LB media se 100 μ l kanamycinu (50 mg/ml). Kultura byla kultivována při 37 °C, 220 otáček/min, dokud nedosáhla optické hustoty $OD_{600} = 0,6$. Poté byl přidán induktor proteinové exprese IPTG (0,5 M, 160 μ l) a inkubace probíhala přes noc při 25 °C a 220 otáček/min. Poté byla směs stočena (5000 \times g, 20 min), buňky byly resuspendovány v Tris-Gly pufru, následovala sonikace 4 \times 1 min na ledu. Po dalším stočení byl izolován supernatant, který obsahoval enzym AST.

3.6.2 Příprava sulfátu kyseliny kávové

Kyselina kávová byla rozpuštěna v 5 ml acetonu a byl přidán *p*-NPS (25 mg/ml, 5 ml), 24 ml Tris-Gly pufru a 2 ml enzymu (40 U/ml). Směs byla inkubována v inertní atmosféře (argon) při 30 °C po dobu 5 hodin. Ze směsi bylo odebíráno cca 100 μ l pro analýzu koncentrace reaktantů a produktů v čase pomocí HPLC; první hodinu se odebíralo každých 10 min, poté jen po hodině. Sledování průběhu reakce se provádělo pomocí TLC (mobilní fáze ethylacetát/ methanol/ kyselina mravenčí, 4/1/0,01). Odebrané vzorky byly zahřáty na 95 °C (inaktivace enzymu) a uchovány při -20 °C až do analýzy. Schéma sulfatace kyseliny kávové je zobrazeno na obrázku 3.2.



Obrázek 3.2: Sulfatace kyseliny kávové katalyzovaná aryl-sulfotransferázou z *D. hafniense*

3.6.3 Úprava reakční směsi a separace gelovou chromatografií

Reakční směs byla částečně odpařena, aby se odstranil aceton, následovala úprava pH na 7,5 – 7,7. Reakční směs byla třikrát extrahována ethylacetátem a proběhla kontrola frakcí pomocí TLC. Po extrakci byla vodná fáze odpařena do sucha, rozpuštěna v 1 – 2 ml 80% methanolu a stočena, poté byla nanesena na kolonu Sephadex LH-20 v 80 % methanolu (průtoková rychlost 0,175 ml/min). Detekce frakcí (cca 3 ml) byla prováděna pomocí TLC (ethylacetát/methanol/kyselina mravenčí, 4/1/0,01). Spojené frakce obsahující produkt byly odpařeny a lyofilizovány, následovala kontrola čistoty získaného produktu pomocí HPLC.

3.7 Podmínky separace na HPLC

Pro chromatografické separace byly zvoleny následující výchozí podmínky:

3.7.1 Kolona C18

Metoda A1: Separace polyfenolů byla prováděna v reverzním módu. Teplota byla nastavena na 25 °C, průtok 0,4 ml/min a nástřik byl 1 µl. Byla zvolena gradientová eluce, mobilní fázi byl acetonitril/ voda/ kyselina mravenčí (5/95/0,1, v/v/v; fáze A) a acetonitril/ voda (80/20, v/v; fáze B). Nastavení gradientu: 0-7 min 0→90% B, 7-8 min 90% B, 8-11 min 90→0% B, ukončení ve 14 min.

3.7.2 Kolona ZIC-HILIC

Metoda B1: Zde byla separace prováděna na polárně-organické fázi. Teplota byla nastavena na 25 °C, průtok 0,4 ml/min a nástřik 1 µl. Separace probíhala gradientovou elucí a byly zvoleny dvě metody pro separaci. V první metodě byla jako mobilní fáze zvolena směs acetonitril/ mravenčí kyselina (100/0,1, v/v; fáze A) a 10 mM octan amonný/ mravenčí kyselina (100/0,1, v/v; fáze B). Metoda B2: V druhé metodě byla jako mobilní fáze zvolena směs acetonitril/ mravenčí kyselina (100/0,1, v/v; fáze A) a 5 mM octan amonný/ mravenčí kyselina (100/0,1, v/v; fáze B). Nastavení gradientu pro obě metody: 0-8 min 5→20% B, 8-10 min 20→5% B, ukončení v 15 min.

3.7.3 Kolona Kinetex PFP

Metoda C1: Separace polyfenolů byla prováděna v reverzním módu. Pro výchozí metodu byla teplota nastavena na 45 °C, průtok 0,6 ml/min a nástřik 1 µl. I zde byla zvolena gradientová eluce jako mobilní fáze se použil 10 mM octan amonný/ mravenčí kyselina

(100/0,1, v/v; fáze A) a 100% methanol (fáze B). Nastavení výchozího gradientu pro všechny látky: 0-20 min 40→72% B, 20-21 min 72→40% B, ukončení v 24 min.

Metoda C2: Pro porovnání byla zvolena ještě druhá metoda na koloně Kinetex PFP. Veškeré podmínky byly nastaveny stejně jako u metody C1, místo 10 mM octanového pufru byl použit 5 mM octanový pufr.

Metoda C3: Tato metoda byla vytvořena pro separaci modelové směsi kyseliny kávové (kapitola 4.1.7) úpravou metody C1. Jako mobilní fáze byl zvolen 10 mM octan amonný/mravenčí kyselina (100/0,1, v/v; fáze A) a 100% methanol (fáze B). Teplota byla nastavena na 45 °C, průtok 0,6 ml/min a nástřik 1 µl. Změnil se zde gradient: 0-22 min 20→50% B, 22-23 min 50→20% B, ukončení ve 25 min.

Přehled jednotlivých metod je uveden v tabulce 3.3.

Tabulka 3.3: Přehled použitých metod na jednotlivých kolonách

Kolona	Metoda	MF A	MF B	Nástřik [μl]	Průtok [ml/min]	Teplota [°C]	Gradient
C18	A1	AcCN/ H ₂ O/ HCOOH (5/95/0,1; v/v/v)	AcCN/ H ₂ O (80/20; v/v)	1	0,4	25	0-7 min 0→90% B 7-8 min 90% B 8-11 min 90→0% B 14 min - STOP
ZIC-HILIC	B1	AcCN/ HCOOH (100/0,1, v/v)	10 mM CH ₃ COONH ₄ / HCOOH (100/0,1, v/v)	1	0,4	25	0-8 min 5→20% B 8-10 min 20→5% B 15 min - STOP
	B2	AcCN/ HCOOH (100/0,1, v/v)	5 mM CH ₃ COONH ₄ / HCOOH (100/0,1, v/v)	1	0,4	25	
Kinetex PFP	C1	10 mM CH ₃ COONH ₄ / HCOOH (100/0,1, v/v)	100% MeOH	1	0,6	45	0-20 min 40→72% B 20-21 min 72→40% B 24 min - STOP
	C2	5 mM CH ₃ COONH ₄ / HCOOH (100/0,1, v/v)	100% MeOH	1	0,6	45	
	C3	10 mM CH ₃ COONH ₄ / HCOOH (100/0,1, v/v)	100% MeOH	1	0,6	45	0-22 min 20→50% B 22-23 min 50→20% B 25 min - STOP

4 Výsledky a diskuze

4.1 Výsledky

Pro porovnání jednotlivých metod a kolon byly sledovány tyto parametry: retenční čas a šířka v 5 % výšky píku. Všechny analyty byly změřeny nejprve samostatně a poté v modelových směsích, které odpovídaly reálnému složení enzymové reakce. V modelových směsích byl pozorován mírný posun retenčních časů jednotlivých analytů oproti retenčním časům získaným pro každý analyt zvlášť.

4.1.1 Kolona C18 – metoda A1

Jako první byla pro testování zvolena kolona C18 nejpoužívanější v běžné praxi. U všech látek docházelo k eluci do 10 min. U parentních látek a odpovídajících sulfátů nebylo pozorováno výrazné rozmývání analytů (hodnoty $w_{0,05}$ se pohybovaly od 0,154 do 0,500 min). V případě *p*-NPS však docházelo k výraznějším rozmývání ($w_{0,05} = 0,621$ min) a ve směsi ke koeluci s DHB (5,5 min). Veškerá data shrnuje tabulka 4.1, chromatogramy jednotlivých látek se nacházejí v příloze A.

Tabulka 4.1: Hodnoty t_R , $w_{0,05}$, λ_{max} , pro analyty změřené samostatně metodou A1, kolona C18

Látka	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]*	λ_{max} [nm]
CAF	7,539	0,154	235; 324
CAFS	6,597	-	229; 293
CAT	4,848	0,436	274
CATS	7,627	0,305	274
DHB	5,549	0,500	255; 292
DHBS	4,212	0,443	255
DHSB	9,032	0,143	360
DHSBS	7,904	0,234	360
DHSBSS	8,490	0,146	360
<i>p</i> -NP	7,274	0,278	314
<i>p</i> -NPS	5,567	0,621	280

*-: data nebyla k dispozici z důvodu rozkladu CAFS na koloně

4.1.2 Kolona ZIC-HILIC – metoda B1

Při separaci na koloně ZIC-HILIC docházelo u některých látek (*p*-NP, *p*-NPS, CAFS, CAT, CATS, DHSB, DHSBSS) k velmi slabé interakci se stacionární fází (t_R : 1,1 – 1,3 min), u dalších látek (CAF, DHBS, DHSBS, DHSBSS) bylo pozorováno rozmývání píků ($w_{0,05}$ nad 0,6 min v případě *p*-NPS) (Příloha B1), data shrnuje

tabulka 4.2. V modelových směsích docházelo ke koleuci některých analytů: *p*-NP ($t_R = 1,148$ min) a CAFS ($t_R = 1,19$ min) a také *p*-NPS ($t_R = 1,3$ min) a CAT ($t_R = 1,296$ min).

Tabulka 4.2: Hodnoty t_R , λ_{max} , pro analyty změřené samostatně metodou B1, kolona ZIC-HILIC

Látka	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]	λ_{max} [nm]
CAF	2,809	0,582	235; 324
CAFS	1,192	0,312	229; 293
CAT	1,296	0,458	274
CATS	1,253	0,289	274
DHB	3,480	0,466	255; 292
DHBS	5,596	0,345	255
DHSB	1,210	0,604	360
DHSBS	3,608	0,772	360
DHSBSS	5,869	0,587	360
<i>p</i> -NP	1,148	0,265	314
<i>p</i> -NPS	1,300	0,456	280

4.1.3 Kolona ZIC-HILIC – metoda B2

Pro kolonu ZIC-HILIC byla zvolena ještě druhá metoda, místo 10 mM octanu amonného se zde použil 5 mM octan amonný. Čas analýzy se zde prodloužil na 12 min. Oproti metodě B1 se zvýšila retence některých analytů, ale došlo k výraznému rozmývání analytů, $w_{0,05}$ převyšovala u všech látek hodnotu 0,6 min až k hodnotě 6,1 min (DHB). Data shrnuje tabulka 4.3 (chromatogramy – Příloha B2).

Tabulka 4.3: Hodnoty t_R , $w_{0,05}$, λ_{max} , pro analyty změřené samostatně metodou B2, kolona ZIC-HILIC

Látka	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]	λ_{max} [nm]
CAF	9,697	0,676	235; 324
CAFS	4,320	2,247	229; 293
CAT	2,966	0,884	274
CATS	4,843	2,501	274
DHB	9,871	6,087	255; 292
DHBS	4,200	1,479	255
DHSB	4,951	2,888	360
DHSBS	9,399	3,178	360
DHSBSS	5,020	4,549	360
<i>p</i> -NP	1,697	0,809	314
<i>p</i> -NPS	5,908	3,157	280

4.1.4 Kolona Kinetex PFP – metoda C1

Třetí zvolenou stacionární fází byla kolona Kinetex PFP. U této kolony se prodloužil čas analýzy např. pro DHSB asi na 20 min, u ostatních látek se ale retenční časy pohybovaly opět do 10 min. Nebylo zde také pozorováno výrazné rozmývání látek ($w_{0,05}$ nepřekročily hodnotu 0,4 min). Z uvedených retenčních časů (tabulka 4.4; chromatogramy: Příloha C) je patrné, že by v případě měření některých látek v odpovídajících modelových směsích docházelo jen k částečné separaci, nebo že by se píky zcela překrývaly. Pro některé látky (CAF/CAFS; CAT/CATS) byla tato metoda tedy dále optimalizována snížením gradientu (kapitola 4.1.7)

Tabulka 4.4: Hodnoty t_R , $w_{0,05}$, λ_{max} , pro analyty změřené samostatně metodou C1, kolona Kinetex PFP

Látka	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]	λ_{max} [nm]
CAF	4,452	0,319	235; 324
CAFS	3,344	0,289	229; 293
CAT	4,146	0,326	274
CATS	4,424	0,289	274
DHB	3,721	0,270	255; 292
DHBS	2,874	0,299	255
DHSB	20,349	0,401	360
DHSBS	14,892	0,360	360
DHSBSS	20,247	0,327	360
<i>p</i> -NP	9,513	0,289	314
<i>p</i> -NPS	4,368	0,342	280

Pro ověření, zda je metoda C1 účinná a univerzální pro co nejvíce sulfátů polyfenolických látek, byli zvoleni další zástupci flavonoidů a jejich sulfátů. Jednalo se o 4'-*O*-sulfát ampelopsinu (AMS), sulfát 4-methylkatecholu (MECATS), 4'-*O*-sulfát naringenu (NGS), sulfát floroglucinu (PHGS), 3'-*O*-sulfát kvercetínu (QS), disulfát kvercetínu, 20'-*O*-sulfát silybinu (SBS) a 19'-*O*-sulfát silychristinu (SCHS) a jejich parentní látky. Data shrnuje tabulka 4.5 (chromatogramy v příloze D, E). V modelových směsích látek došlo ke koeluci těchto látek: v modelové směsi ampelopsinu koelulovaly AM ($t_R = 4,577$ min), AMS ($t_R = 4,608$ min) a částečně *p*-NPS ($t_R = 4,368$ min, $R_{1,2} = 0,654$), ve směsi kvercetínu došlo ke koeluci QSS ($t_R = 4,393$ min) s *p*-NPS ($t_R = 4,368$ min). Směsi s AMS a QS byly tedy vzhledem ke koeluci píků s *p*-NPS měřeny metodou vytvořenou pro separaci modelové směsi kyseliny kávové – metoda C3 (kapitola 4.1.7). Ve směsi silychristinu došlo k částečné separaci ($R_{1,2} = 1,070$) SCHS ($t_R = 4,798$ min)

s *p*-NPS ($t_R = 4,368$ min) a u směsi florogluciolu došlo k částečné separaci ($R_{1,2} = 1,005$) PHG ($t_R = 2,875$ min) a PHGS ($t_R = 2,540$ min).

Tabulka 4.5: Hodnoty t_R , $w_{0,05}$, λ_{max} , pro analyty změřené samostatně metodou C1, kolona Kinetex PFP

Látka	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]	λ_{max} [nm]
AM	4,577	0,297	300
AMS	4,608	0,338	300
MECAT	5,387	0,305	280
MECATS	3,674	0,292	280
NG	14,177	0,304	305
NGS	7,972	0,386	305
PHG	2,875	0,280	220
PHGS	2,540	0,346	267
Q	13,163	0,327	360
QS	9,012	0,394	360
QSS	4,393	0,455	360
SB	12,492	0,280	297
SBS	8,223	0,452	297
SCH	7,781	0,302	288
SCHS	4,798	0,513	288

4.1.5 Kolona Kinetex PFP – metoda C2

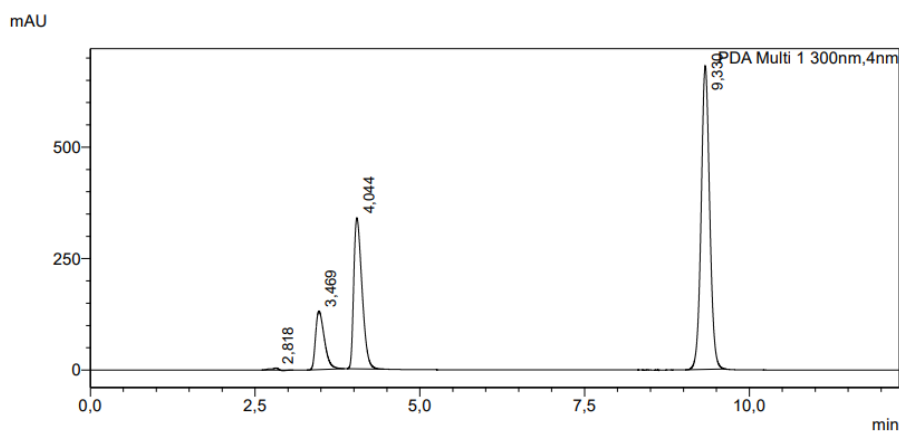
Pro kolonu Kinetex PFP byla vyzkoušena také metoda s nižší koncentrací pufru v mobilní fázi. (místo 10 mM pufru byl použit 5 mM octan amonný). Látky byly měřeny pouze ve směsi (tabulka 4.6; obrázek 4.1 – 4.4). Tato metoda sloužila jako orientační pro porovnání s metodou C1. U většiny testovaných látek nedošlo k výrazné změně v čase eluce ani k rozmývání oproti předchozí metodě, některé látky však vůbec nebyly detekovány (CAF, CAT, CATS, DHSBSS). V případě CATS a DHSBSS se ukázalo, že dochází během separace k rozkladu sulfátu na výchozí látku.

Tabulka 4.6: Hodnoty t_R , $w_{0,05}$, λ_{max} , pro analyty změřené v modelové směsi metodou C2, kolona Kinetex PFP

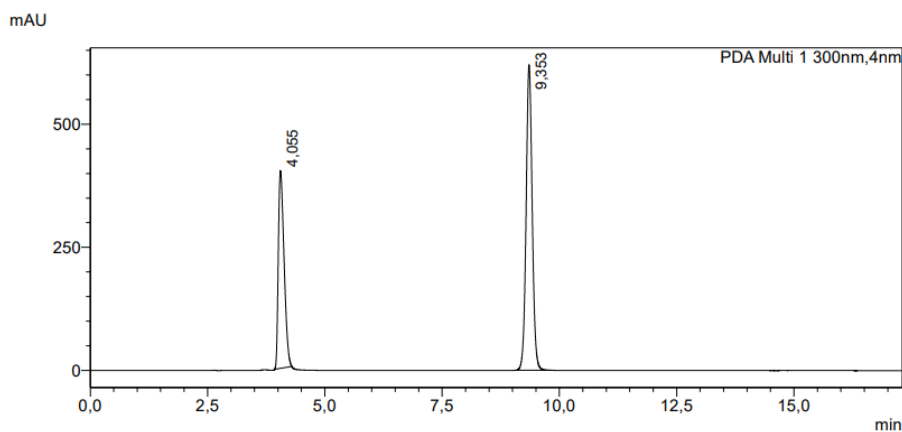
Látka	t_R [min]*	$w_{0,05}$ [min]*	λ_{max} [nm]
CAF	-	-	235; 324
CAFS	3,153	0,288	229; 293
CAT	-	-	274
CATS	-	-	274
DHB	3,469	0,313	255; 292
DHBS	2,818	0,253	255
DHSB	20,100	0,347	360
DHSBS	13,992	0,339	360
DHSBSS	-	-	360
<i>p</i> -NP**	9,330	0,311	314
<i>p</i> -NPS**	4,044	0,288	280

*-: data nebyla k dispozici z důvodu rozkladu látek na koloně

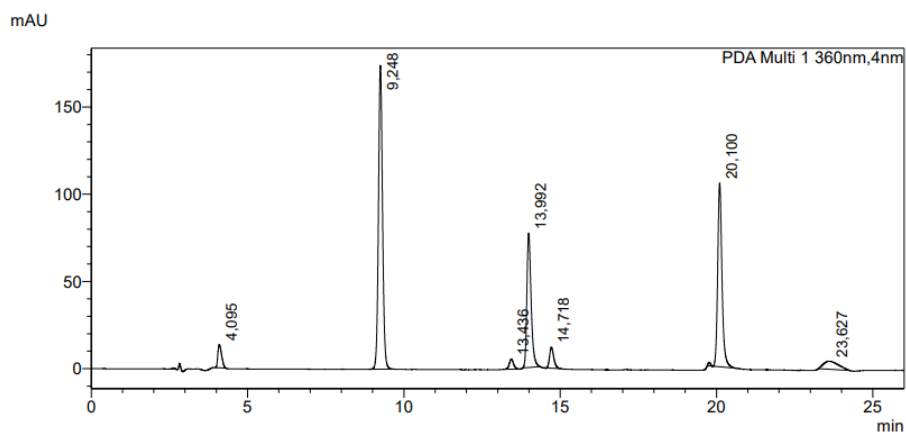
**data pro látky *p*-NP a *p*-NPS jsou z chromatogramu směsi DHB a DHBS



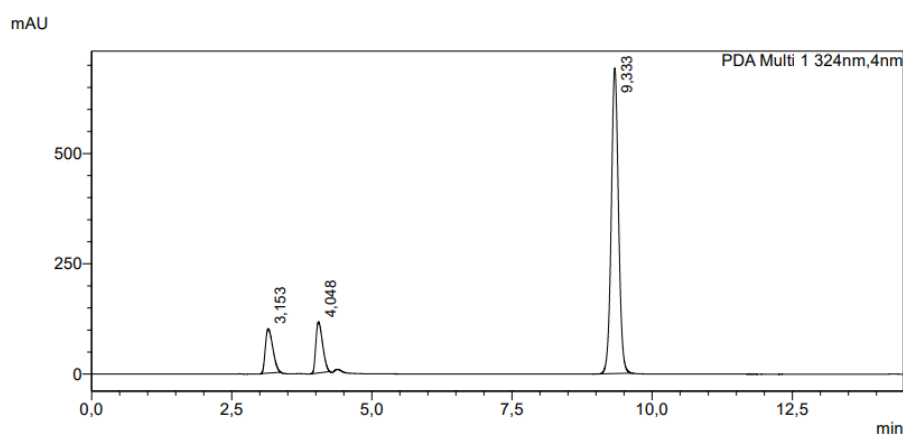
Obrázek 4.1: HPLC analýza modelové směsi 2,3-dihydroxybenzoové kyseliny: DHBS ($t_R = 2,818$ min), DHB ($t_R = 3,469$ min), *p*-NPS ($t_R = 4,044$ min), *p*-NP ($t_R = 9,330$ min), látky byly pozorovány při 300 nm; metoda C2, kolona Kinetex PFP



Obrázek 4.2: HPLC analýza modelové směsi katecholu: *p*-NPS ($t_R = 4,055$ min), *p*-NP ($t_R = 9,353$ min), CAT a CATS nebyly detekovány, látky byly pozorovány při 300 nm; metoda C2, kolona Kinetex PFP



Obrázek 4.3: HPLC analýza modelové směsi 2,3-dehydrosilybinu: *p*-NPS ($t_R = 4,095$ min), *p*-NP ($t_R = 9,248$ min), DHSBS ($t_R = 13,992$ min), DHSB ($t_R = 20,100$ min), DHSBSS nebyl detekován; látky byly pozorovány při 360 nm; metoda C2, kolona Kinetex PFP



Obrázek 4.4: HPLC analýza modelové směsi kyseliny kávové: CAF ($t_R = 3,153$ min), *p*-NPS ($t_R = 4,048$ min), *p*-NP ($t_R = 9,333$ min), CAFS nebyla detekována (možná koeluce s *p*-NPS); látky byly pozorovány při 324 nm; metoda C2, kolona Kinetex PFP

4.1.6 Porovnání t_R a $w_{0,05}$ vybraných analytů dosažených na testovaných kolonách

U jednotlivých kolon a metod byly srovnány parametry t_R a $w_{0,05}$. U kolony C18 (metoda A1) eluovaly látky do 10 min a hodnoty $w_{0,05}$ se pohybovaly nejčastěji v rozmezí 0,1 – 0,5 min, pouze u *p*-NPS bylo pozorováno rozmývání, kdy $w_{0,05}$ převýšila hodnotu 0,6 min.

U kolony ZIC-HILIC eluovaly látky také do 10 min u obou použitých metod B1 a B2, ale bylo pozorováno větší rozmývání píků. Pro látky CAF, CAFS, CAT, DHB a *p*-NP u metody B1 se pohybovaly hodnoty $w_{0,05}$ od 0,4 do 0,6 min, ale pro DHBS, DHSB, DHSBS a *p*-NPS $w_{0,05}$ převyšovaly hodnotu 0,9 min. U metody B2 pouze CAF a *p*-NP zůstala $w_{0,05}$ nižší než 1,0 min u ostatních látek se pohybovaly mezi 1,0 až do 6,1 min.

U kolony Kinetex PFP se opět eluovala většina látek do 10 min a oproti koloně C18

a ZIC-HILIC se v některých případech t_R zkrátily o několik minut (0,5 – 2,5 min); v případě směsi DHSB, DHSBS a DHSBSS se doba eluce naopak výrazně prodloužila až na 20 min, k malému nárůstu došlo i u p -NP a p -NPS, v tomto případě bylo prodloužení o 1 až 2 min. U kinetexové PFP kolony byly u obou použitých metod C1 a C2 hodnoty $w_{0,05}$ v rozmezí 0,2 – 0,4 min.

V následující tabulce 4.7 je porovnání t_R a $w_{0,05}$ pro všechny použité metody na kolonách C18, ZIC-HILIC a Kinetex PFP. V tabulce jsou barevně zvýrazněny nejvyšší (okrová) a nejnižší (zelená) hodnoty šířky píku v 5 % jeho výšky ($w_{0,05}$). Jako nejvhodnější se po porovnání získaných dat pro separaci směsi fenolických látek a jejich sulfátů jeví kinetexová PFP kolona za použití metody C1.

Tabulka 4.7: Porovnání t_R a $w_{0,05}$ jednotlivých vybraných analytů při použití různých kolon a metod

Látka	Kolona C18		Kolona ZIC-HILIC				Kolona Kinetex PFP			
	Metoda A1		Metoda B1		Metoda B2		Metoda C1		Metoda C2	
	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]*	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]	t_R [min]*	$w_{0,05}$ [min]*
CAF	7,539	0,154	2,809	0,582	9,697	0,676	4,452	0,319	-	-
CAFS	6,597	-	1,192	0,312	4,320	2,247	3,344	0,289	3,153	0,288
CAT	4,848	0,436	1,296	0,458	2,966	0,884	4,146	0,326	-	-
CATS	7,627	0,305	1,253	0,289	4,843	2,501	4,424	0,289	-	-
DHB	5,549	0,500	3,480	0,466	9,871	6,087	3,721	0,270	3,469	0,313
DHBS	4,212	0,443	5,596	0,345	4,200	1,479	2,874	0,299	2,818	0,253
DHSB	9,032	0,143	1,210	0,604	4,951	2,888	20,349	0,401	20,100	0,347
DHSBS	7,904	0,234	3,608	0,772	9,399	3,178	14,892	0,360	13,992	0,339
DHSBSS	8,490	0,146	5,869	0,587	5,020	4,549	20,247	0,327	-	-
p -NP	7,274	0,278	1,148	0,265	1,697	0,809	9,513	0,289	9,330	0,311
p -NPS	5,567	0,621	1,300	0,456	5,908	3,157	4,368	0,342	4,044	0,288

*-: data nebyla k dispozici z důvodu rozkladu látek na koloně

označení nejnižší hodnoty $w_{0,05}$

označení nejvyšší hodnoty $w_{0,05}$

4.1.7 Úprava metody C1 pro separaci směsi kyseliny kávové, katecholu, ampelopsinu, kvercetinu, florogluciolu a silychristinu

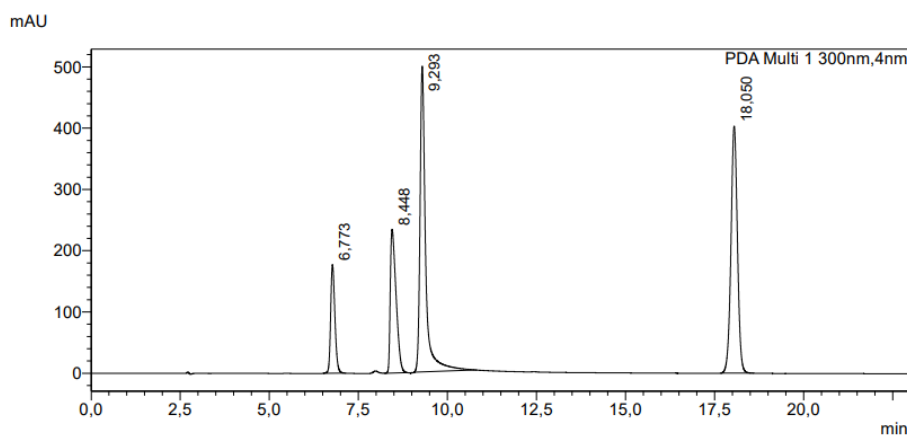
Nejvhodnější metodou pro separaci sulfatovaných polyfenolů byla zvolena metoda C1 na koloně Kinetex PFP (tabulka 4.7). Tato metoda však musela být pro separaci modelových směsí kyseliny kávové, katecholu, ampelopsinu, kvercetinu, florogluciolu a silychristinu ještě dále modifikována z důvodu koeluce některých látek.

Metoda C1 byla upravena následovně (metoda C3; tabulka 3.3): mobilní fáze, teplota, průtok a nástřik zůstaly stejné jako v metodě C1. Byl však upraven gradient: původní

počáteční koncentrace mobilní fáze B byla snížena na 20 % a konečná koncentrace mobilní fáze B byla z původních 72 % snížena na 50 % a to ve stejném časovém úseku jako původní metoda (0-22 min 20→50% B, 22-23 min 50→20% B, ukončení v 25 min).

U analýzy modelové směsi kyseliny kávové se za použití metody C3 prodloužil čas separace, ale podařilo se od sebe oddělit všechny složky směsi. Oproti původní metodě C1 se ale mírně zvýšila hodnota $w_{0,05}$ u CAF a *p*-NP asi o 0,1 min, u CAFS a *p*-NPS zůstala $w_{0,05}$ zachována (obrázek 4.5; tabulka 4.8). Zmenšení šířky píků by mohlo být odstraněno např. zvýšením nebo snížením teploty.

Při úpravě gradientu pro modelovou směs katecholu se pouze prodloužil čas analýzy, ale nepodařilo se identifikovat CATS. Některé sulfáty polyfenolů jsou dosti nestabilní a vzhledem k tomu, že se i u ostatních metod shodoval retenční čas CATS s retenčním časem CAT, lze usuzovat, že CATS byl rozložen již ve výchozím vzorku, případně k jeho rozkladu mohlo dojít během analýzy.



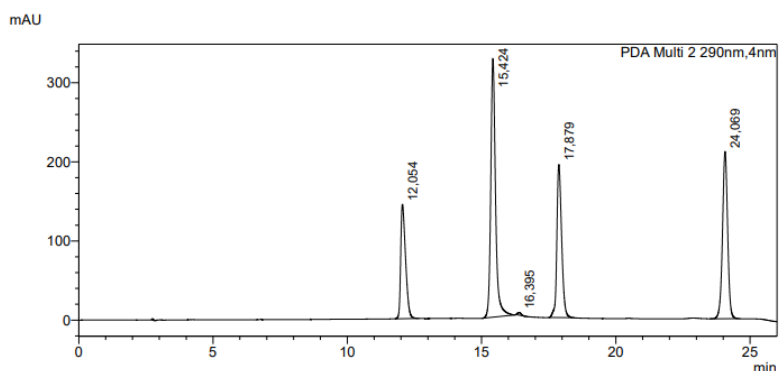
Obrázek 4.5: HPLC analýza modelové směsi kyseliny kávové: CAFS ($t_R = 6,773$ min), *p*-NPS ($t_R = 8,448$ min), CAF ($t_R = 9,293$ min), *p*-NP ($t_R = 18,050$ min), látky byly pozorovány při 300 nm; metoda C3, kolona Kinetex PFP

Tabulka 4.8: Hodnoty t_R , $w_{0,05}$, $\lambda_{max} = 300$ nm, pro metodu separace směsi kyseliny kávové, kolona Kinetex PFP

Látka	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]
CAFS	6,773	0,282
<i>p</i> -NPS	8,448	0,367
CAF	9,293	0,447
<i>p</i> -NP	18,050	0,432

Gradient upravený pro separaci směsi kyseliny kávové (metoda C3) byl vhodný i pro separaci modelových směsí ampelopsinu a kvercetinu. V případě směsi ampelopsinu bylo nutné snížit teplotu z 45 °C na 25 °C, aby došlo k separaci nečistot od AM, u směsi

kvercetinů se snížila teplota na 35 °C. V případě AM se podařilo separovat nečistotu od standardu (obrázek 4.6; tabulka 4.9), u kvercetinů se snížením teploty nepodařilo odstranit nesymetrii v sestupné části píku QSS, pouze se tím prodloužil čas separace.

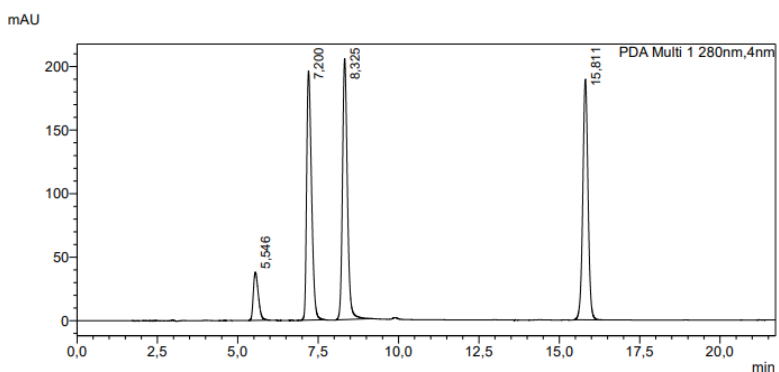


Obrázek 4.6: HPLC analýza modelové směsi ampelopsinu: *p*-NPS ($t_R = 12,054$ min), AM ($t_R = 15,424$ min), AMS ($t_R = 17,879$ min), *p*-NP ($t_R = 24,069$ min), látky byly pozorovány při 290 nm; metoda C3 při teplotě 25 °C, kolona Kinetex PFP

Tabulka 4.9: Hodnoty t_R , $w_{0,05}$, $\lambda_{max} = 290$ nm, pro separaci modelové směsi ampelopsinu, metoda C3 při 25 °C, kolona Kinetex PFP

Látka	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]
<i>p</i> -NPS	12,054	0,420
AM	15,424	0,465
AMS	17,879	0,451
<i>p</i> -NP	24,069	0,464

Pík MECAT při výchozí metodě C1 nebyl symetrický v modelové směsi 4-methylkatecholu ($w_{0,05} = 0,472$ min – příloha E) v tomto případě stačilo snížit teplotu z 45 °C na 25 °C, u MECAT se tím odstranila nesymetrie píku ($w_{0,05} = 0,366$ min) (obrázek 4.7; tabulka 4.10).

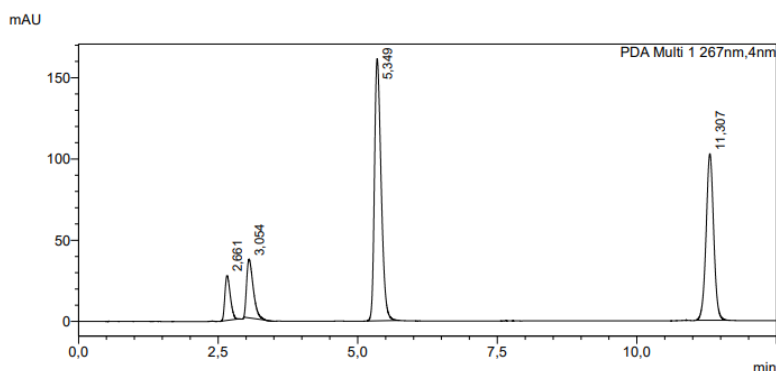


Obrázek 4.7: HPLC analýza modelové směsi 4-methylkatecholu: MECATS ($t_R = 5,546$ min), *p*-NPS ($t_R = 7,200$ min), MECAT ($t_R = 8,325$ min), *p*-NP ($t_R = 15,811$ min), látky byly pozorovány při 280 nm; metoda C1 při teplotě 25 °C, kolona Kinetex PFP

Tabulka 4.10: Hodnoty t_R , $w_{0,05}$, $\lambda_{max} = 280 \text{ nm}$, pro separaci modelové směsi 4-methylcatecholu, metoda C1 při teplotě 25 °C kolona Kinetex PFP

Látka	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]
MECATS	5,546	0,357
<i>p</i> -NPS	7,200	0,349
MECAT	8,325	0,366
<i>p</i> -NP	15,811	0,390

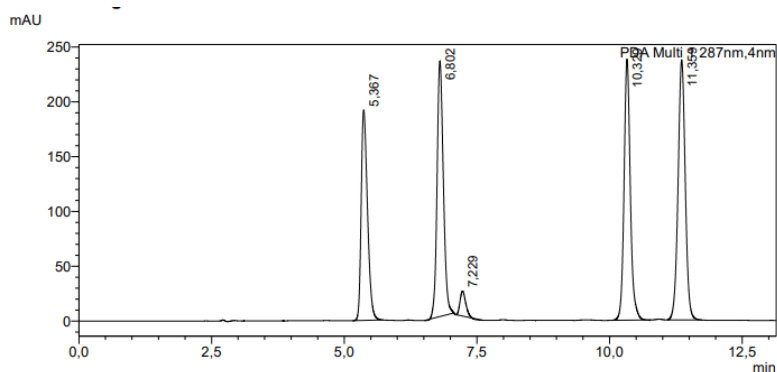
U modelové směsi floroglucinolu nedošlo k úplné separaci ($R_{1,2} = 1,005$) u PHGS ($t_R = 2,540 \text{ min}$) a PHG ($t_R = 2,875 \text{ min}$) a ve směsi silychristinu ($R_{1,2} = 1,070$) u SCHS ($t_R = 4,798 \text{ min}$) a *p*-NPS ($t_R = 4,368 \text{ min}$). Pro obě látky byl snížen gradient z 40 % na 35 %, všechny ostatní parametry zůstaly stejné jako v metodě C1. Úprava gradientu: 0-20 min 35→72% B, 20-21 min 72→35% B, ukončení v 24 min. V obou případech se podařilo odstranit problém koeluce (PHGS: $t_R = 2,661 \text{ min}$ a PHG: $t_R = 3,054 \text{ min}$; SCHS: $t_R = 6,802 \text{ min}$ a *p*-NPS: $t_R = 5,367 \text{ min}$) (obrázek 4.8, 4.9; tabulka 4.11, 4.12).



Obrázek 4.8: HPLC analýza modelové směsi floroglucinolu: PHGS ($t_R = 2,661 \text{ min}$), PHG ($t_R = 3,054 \text{ min}$), *p*-NPS ($t_R = 5,349 \text{ min}$), *p*-NP ($t_R = 11,307 \text{ min}$), látky byly pozorovány při 267 nm; metoda pro separaci modelové směsi floroglucinolu: snížení počáteční koncentrace gradientu z 40 % na 35 %, kolona Kinetex PFP

Tabulka 4.11: Hodnoty t_R , $w_{0,05}$, $\lambda_{max} = 267 \text{ nm}$, pro separaci modelové směsi floroglucinolu: snížení počáteční koncentrace gradientu z 40 % na 35%, kolona Kinetex PFP

Látka	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]
PHGS	2,661	0,219
PHG	3,054	0,282
PNPS	5,349	0,280
PNP	11,307	0,326



Obrázek 4.9: HPLC analýza modelové směsi silychristinu: *p*-NPS ($t_R = 5,367$ min), SCHS ($t_R = 6,802$ min), SCH ($t_R = 10,329$ min), *p*-NP ($t_R = 11,359$ min), látky byly pozorovány při 287 nm; metoda pro separaci modelové směsi silychristinu: snížení počáteční koncentrace gradientu z 40 % na 35 %, kolona Kinetex PFP

Tabulka 4.12: Hodnoty t_R , $w_{0,05}$, $\lambda_{max} = 287$ nm, pro separaci modelové směsi silychristinu: snížení počáteční koncentrace gradientu z 40 % na 35 %, kolona Kinetex PFP

Látka	t_R [min]	$w_{0,05}$ [min]
<i>p</i> -NPS	5,367	0,279
SCHS	6,802	0,289
SCH	10,329	0,304
<i>p</i> -NP	11,359	0,326

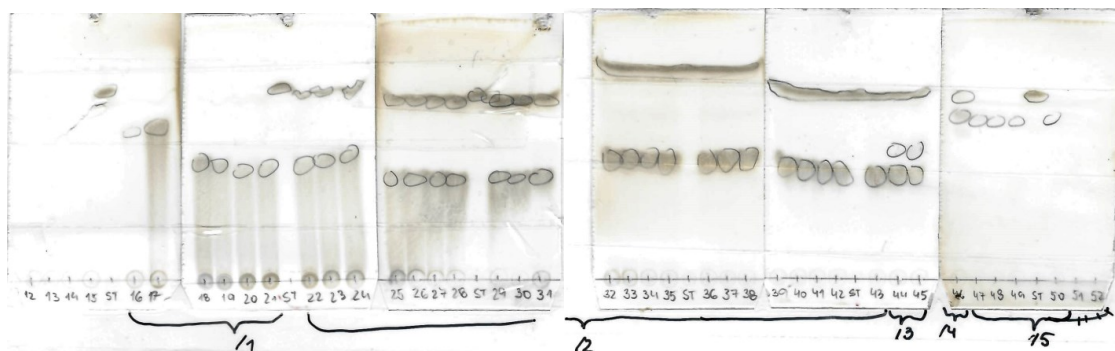
4.1.8 Enzymová příprava sulfátu kyseliny kávové

Pro ověření separačních vlastností vybrané kinetexové PFP kolony a optimalizované metody v reálných podmínkách byla provedena enzymová sulfatace kyseliny kávové. Postup přípravy je uveden v kapitole 3.6. Kontrola reakční směsi probíhala pomocí HPLC, během inkubace bylo odebíráno pro analýzu cca 100 μ l směsi, první hodinu byla směs odebírána každých 10 minut, po 60 minutách se směs odebírala po hodině. Pro kontrolu průběhu reakce byla vybrána metoda C3 na koloně Kinetex PFP, teplota byla nastavena 45 °C, nástřik 1 μ l, průtok 0,6 ml/min, gradient: 0-22 min 20→50% B, 22-23 min 50→20% B, ukončení v 25 min. Chromatogramy jednotlivých odběrů se nacházejí v příloze F.

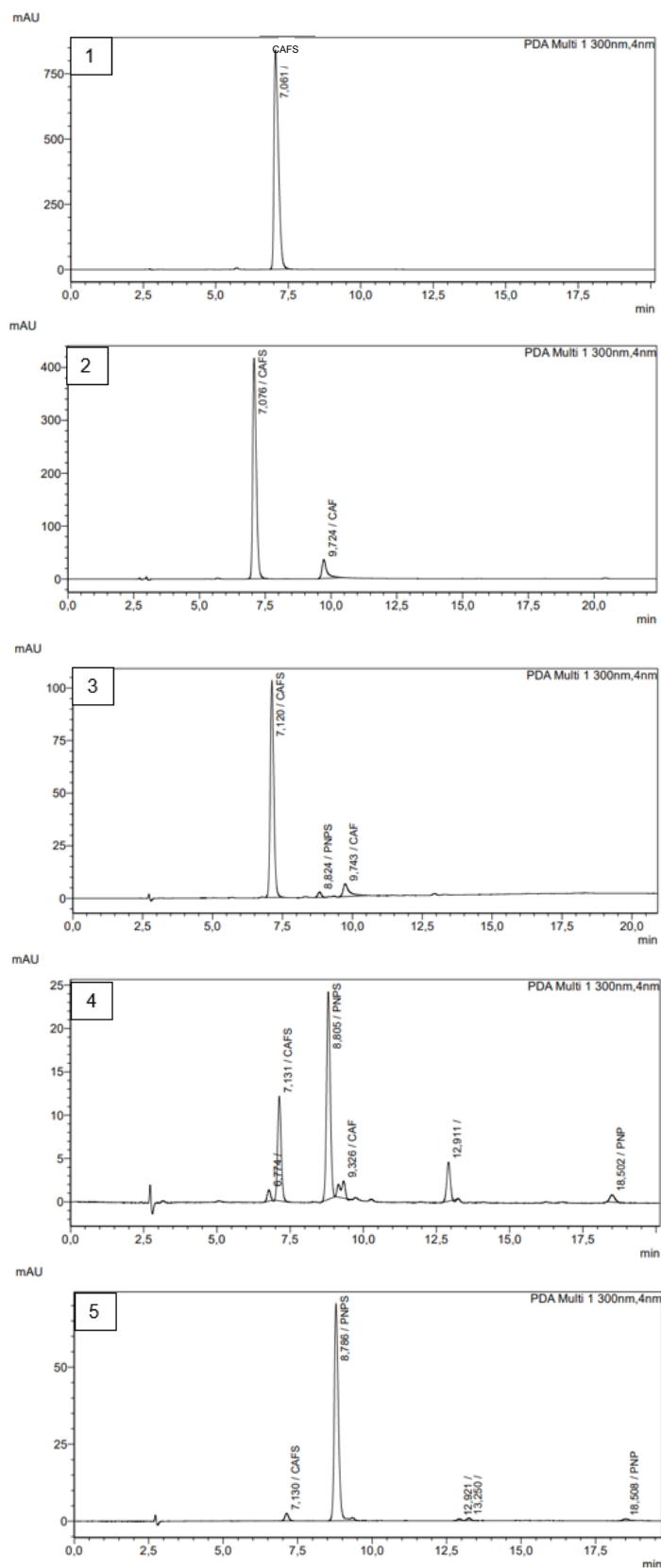
4.1.9 Purifikace enzymové reakční směsi

Před nanesením reakční směsi na kolonu byla směs předčištěna pomocí extrakce ethylacetátem při pH 7,5 – 7,7, poté se směs nanasla na kolonu LH-20. Kontrola frakcí z gelové chromatografie proběhla nejprve pomocí TLC, vybrané frakce byly poté spojeny, byly odpařeny a lyofilizovány. TLC analýzu a výběr frakcí znázorňuje obrázek 4.10. Pro HPLC kontrolu se odebralo malé množství produktu a rozpustilo se v 0,5 ml methanolu. HPLC analýza byla opět prováděna pomocí metody C3

na koloně Kinetex PFP, čistotu jednotlivých pěti frakcí znázorňují chromatogramy na obrázku 4.11.



Obrázek 4.10: TLC analýza produktu sulfatační reakce, sulfátu kyseliny kávové, znázornění výběru a spojení frakcí: 1 (frakce 16 – 21), 2 (frakce 22 – 43), 3 (frakce 44 – 45), 4 (frakce 46), frakce (47 – 50), mobilní fáze – ethylacetát/methanol/kyselina mravenčí, 4/1/0,01



Obrázek 4.11: HPLC analýza frakcí sulfátu kyseliny kávové, látky eluovaly se v pořadí: sulfát kyseliny kávové (CAFS), *p*-nitrofenylsulfát (*p*-NPS), kyselina kávová (CAF), *p*-nitrofenol (*p*-NP), metoda C3, kolona Kinetex PFP

4.2 Diskuze

Pro separaci sulfatovaných flavonoidů byly vybrány pro porovnání tři kolony: kolony C18 a Kinetex PFP v reverzním módu a kolona ZIC-HILIC v polárně organické fázi. Hlavními sledovanými kritérii byly úplná separace všech složek směsi a potlačení rozmývání píků.

Separční účinnost kolony ZIC-HILIC se ukázala pro zvolenou separaci jako nedostačující. Pro tuto kolonu byly vyzkoušeny v mobilní fázi dvě koncentrace octanového pufru (5 a 10 mM). Při vyšší koncentraci octanového pufru docházelo k velmi slabé interakci látek se stacionární fází, retenční časy se pohybovaly kolem 1,1 – 1,3 min (CAFS, CAT, CATS, DHSBS, DHSBSS, *p*-NP, *p*-NPS). Píky DHSB a DHSBS se rozmývaly ($w_{0,05} = 0,6 - 0,8$ min). V případě použití 5 mM octanového pufru docházelo k ještě výraznějšímu rozmývání (především u DHSB, DHSBS, DHSBSS, CAFS, *p*-NPS) a docházelo by ke koeluci prakticky všech látek. Nedostatečná retence analytů a rozmývání ukazuje na nevhodnost této polární stacionární fáze pro separaci vysoce polárních látek jako jsou testované polyfenolické sloučeniny.

Separace na koloně C18 byla uspořádána v reverzním módu (nepolární stacionární fáze, zvyšováním koncentrace nepolární složky mobilní fáze se zvyšuje eluční síla). Oproti koloně ZIC-HILIC zde došlo k dobré retenci všech látek. U této kolony byly pozorovány mnohem užší píky ($w_{0,05}$ se u kolony C18 pohybovala od 0,1 do 0,5 min, zatímco u kolony ZIC-HILIC při metodě B1 byly hodnoty $w_{0,05}$ vyšší než 0,5 min), látky se tolik nerozmývaly. Výhodou zde jsou krátké retenční časy, všechny látky se eluovaly do 10 minut; nevýhodou je koeluce látek CAF s *p*-NP, DHB s *p*-NPS, DHSBS s *p*-NPS, CATS s *p*-NP. Zvolené separační podmínky byly tedy vhodnější pro separaci sulfatovaných flavonoidů než u kolony ZIC-HILIC.

Další testovanou kolonou byla kolona Kinetex PFP. Tato kolona vykazovala nejlepší separační účinnost oproti předchozím dvěma. Stejně jako u kolony C18 se zde eluovaly všechny látky a píky byly užší než u kolony C18 (hodnoty $w_{0,05}$ pro kolonu Kinetex PFP byly do 0,4 min). Například $w_{0,05}$ pro DHB bylo 0,500 min u kolony C18 oproti $w_{0,05} = 0,270$ min u kolony Kinetex PFP. Další výhodou zde je zkrácení retenčních časů pro některé látky, a to asi o 0,5 až 2,5 min. Nevýhodou zde byl delší čas separace DHSB a DHSBS oproti C18, eluovaly se až ve 20 minutě.

Přestože metoda separace na koloně Kinetex PFP byla vhodná pro většinu analyzovaných směsí, v některých případech docházelo ke koleuci, nebo úplnému překrytí dvou látek. Proto byly pro tyto látky zvoleny úpravy metody v podobě snížení gradientu, nebo snížení teploty. Koeluze se týkala především separace modelových směsí kyseliny kávové, katecholu, ampelopsinu a kvercetinu. V případě směsi kyseliny kávové došlo po snížení gradientu k oddělení všech složek směsi, oproti původní metodě se ale deformoval pík CAF. To by mohlo být odstraněno snížením teploty, prodloužily by se tím ale pravděpodobně retenční časy. U modelové směsi katecholu nedošlo ani při změně metody k uspokojivému rozdělení všech složek směsi. Vzhledem k tomu, že i u ostatních metod se shodoval retenční čas CATS a CAT, lze usuzovat, že se CATS ve vzorku nenacházel. To mohlo být způsobeno velkou nestabilitou tohoto sulfátu. Další látka, která se koeluovala se svým standardem, byl DHSBSS. I v tomto případě se retenční časy shodovaly se standardem látek u všech metod, a proto i zde došlo pravděpodobně k rozkladu sulfatované látky.

Pro ověření účinnosti metody na kinetexové PFP koloně byli zvoleni další zástupci sulfatovaných polyfenolických látek. Jednalo se o směsi ampelopsinu, 4-methylkatecholu, floroglucinolu, silychristinu a kvercetinu. U modelové směsi ampelopsinu byla zvolena stejná metoda jako u separace směsi kyseliny kávové (metoda C3), touto metodou se sice separovaly všechny složky směsi, ale mírně se rozmýval pík AM. V tomto případě pomohlo snížení teploty z 45 °C na 25 °C, prodloužily se tím ale retenční časy asi o 8 min. Pro separaci směsi 4-methylkatecholu byl ponechán výchozí gradient (metoda C1), ale byla snížena teplota na 25 °C. Tím se odstranila nesymetrie píku v jeho sestupné části MECAT při měření modelové směsi 4-methylkatecholu z hodnoty $w_{0,05} = 0,472$ min na $w_{0,05} = 0,366$ min; když se MECAT analyzoval samostatně byla hodnota $w_{0,05} = 0,305$ min (metoda C1). V případě separace směsi kvercetinu docházelo k mírnému rozmývání píku QSS ($w_{0,05} = 0,455$ min) v tomto případě ale snížení teploty nebylo účinné. U směsi silychristinu postačilo mírné snížení gradientu z původních 40 % na 35 %, pro úplnou separaci SCH a SCHS. U směsi fluoroglucinolu docházelo v metodě C1 k neúplné separaci PHGS ($t_R = 2,540$ min) a PHG ($t_R = 2,875$ min). Snížením gradientu z 40 na 35 % se podařilo látky separovat (PHGS: $t_R = 2,661$ min a PHG: $t_R = 3,054$ min).

Pro úpravy metod separace směsí sulfatovaných polyfenolických látek bylo tedy zvoleno

bud' snižování gradientu, nebo snižování teploty. Snižováním gradientu se povedlo separovat všechny složky směsi, ale docházelo tím k prodloužení času separace a v některých případech k nesymetrickým píkům, především u nesulfatovaných látek. Nesymetrie píků nesulfatovaných látek se podařilo odstranit snížením teploty, ale píky se rozšířily a prodloužil se čas separace.

U kinetexové PFP kolony byla vyzkoušena také nižší koncentrace pufru v mobilní fázi (5 mM). Tato mobilní fáze byla pro některé látky stejně účinná jako 10 mM pufr (CAFS, DHB, DHBS, DHSB, DHSBS, *p*-NP, *p*-NPS) některé látky se ale na koloně vůbec nezachytily (CAF, CAT).

Pro ověření separační účinnosti kolony Kinetex PFP a optimalizované metody C3 v reálných podmínkách, byla kolona testována při analýze enzymové sulfatace kyseliny kávové. Pomocí metody C3 se separovaly všechny složky směsi, píky se nerozmývaly a nekoeluovaly.

Kolona Kinetex PFP s použitím 10 mM octanového pufru jako mobilní fáze a nastavením metod C1 a C3 je tedy vhodnější alternativou pro separaci sulfatovaných polyfenolů, oproti doposud publikovaným metodám (kapitola 1.4.5). Na této koloně se podařilo zkrátit čas separace látek na 10 – 20 min. Například při separaci na koloně C18 v některých případech dosahoval čas analýzy 30 – 60 min (Dueñas et al. [24]; Zhang et al. [25]). Pomocí optimalizace metody C1 a C3 se podařilo také odstranit koeluci píků a látky se nerozmývaly (Puchartová et al. [22]; Begines et al. [23]). Zkrácení času separace a ostrosti píků napomohlo i nastavení nelineárního gradientu namísto lineárního (Valentová et al. [21]). Výhodou této metody je použití octanového pufru namísto fosfátového pufru (van der Horst et al. [14]), nemusela se využít ani iontově párová činidla (Saribaş et al. [27]). Fosfátové pufrы a iontově párová činidla způsobují nekompatibilitu v případě MS detekce. Další neodmyslitelnou výhodou bylo použití běžně dostupného PDA detektoru.

5 Závěr

Separace vybraných sulfatovaných flavonoidů metodou HPLC byla vyzkoušena na třech chromatografických kolonách. Testovány byly kolony C18 a Kinetex PFP v reverzní fázi a kolona ZIC-HILIC v polárně organické fázi. Při analýze byl zkoumán především retenční čas a šířka píku v 5 % jeho výšky.

Na koloně ZIC-HILIC docházelo k velmi slabé interakci některých látek se stacionární fází, a neposkytla tedy úplnou separaci analytů. Na koloně C18 došlo k separaci všech analytů, ale oproti koloně Kinetex PFP byly hodnoty $w_{0,05}$ vyšší, pohybovaly se mezi 0,1 až 0,7 min, zatímco na koloně Kinetex PFP se hodnoty pohybovaly mezi 0,2 až 0,5 min. Kolona Kinetex PFP byla tedy vybrána pro další optimalizaci metod separace.

Za optimalizované podmínky lze považovat separaci na koloně Kinetex PFP s použitím mobilní fáze 10 mM octanu amonného/0,1% kyseliny mravenčí (100/0,1; v/v; fáze A) a 100% methanolu (fáze B), průtoku 0,6 ml/min a teplotě 45 °C. Byla použita nelineární gradientová eluce. Při tomto gradientu u některých modelových směsí (kyseliny kávové, katecholu, ampelopsinu a kvercetinu) nedocházelo k úplné separaci, proto byl gradient snižen z původní počáteční koncentrace mobilní fáze B 40 % na 20 % a z konečné koncentrace 72 % na 50 %. Při tomto gradientu se již separovaly všechny složky směsi. V případě, kdy píky látek nebyly symetrické (ampelopsin a 4-methylkatechol), byla snížena teplota z 45 °C na 25 °C a docílilo se tak větší symetrie píků. U modelových směsí silychristinu nedocházelo k úplné separaci látek, v tomto případě stačilo snížení počáteční koncentrace fáze B z 40 % na 35 %. Časy analýzy se pohybovaly mezi 10 až 20 min. Nakonec byla kolona a vytvořená metoda testována pro separaci reálné reakční směsi enzymové sulfatace kyseliny kávové. Výsledky ukázaly, že tato kolona se jeví jako univerzálně použitelná pro separace sulfatovaných flavonoidů a jejich směsí. Navíc, díky eliminaci fosfátových pufrů a iontově párových činidel v mobilní fázi i díky nízké průtokové rychlosti je optimalizovaná metoda bez dalších úprav přímo využitelná ve spojení s hmotnostním detektorem.

Zdroje

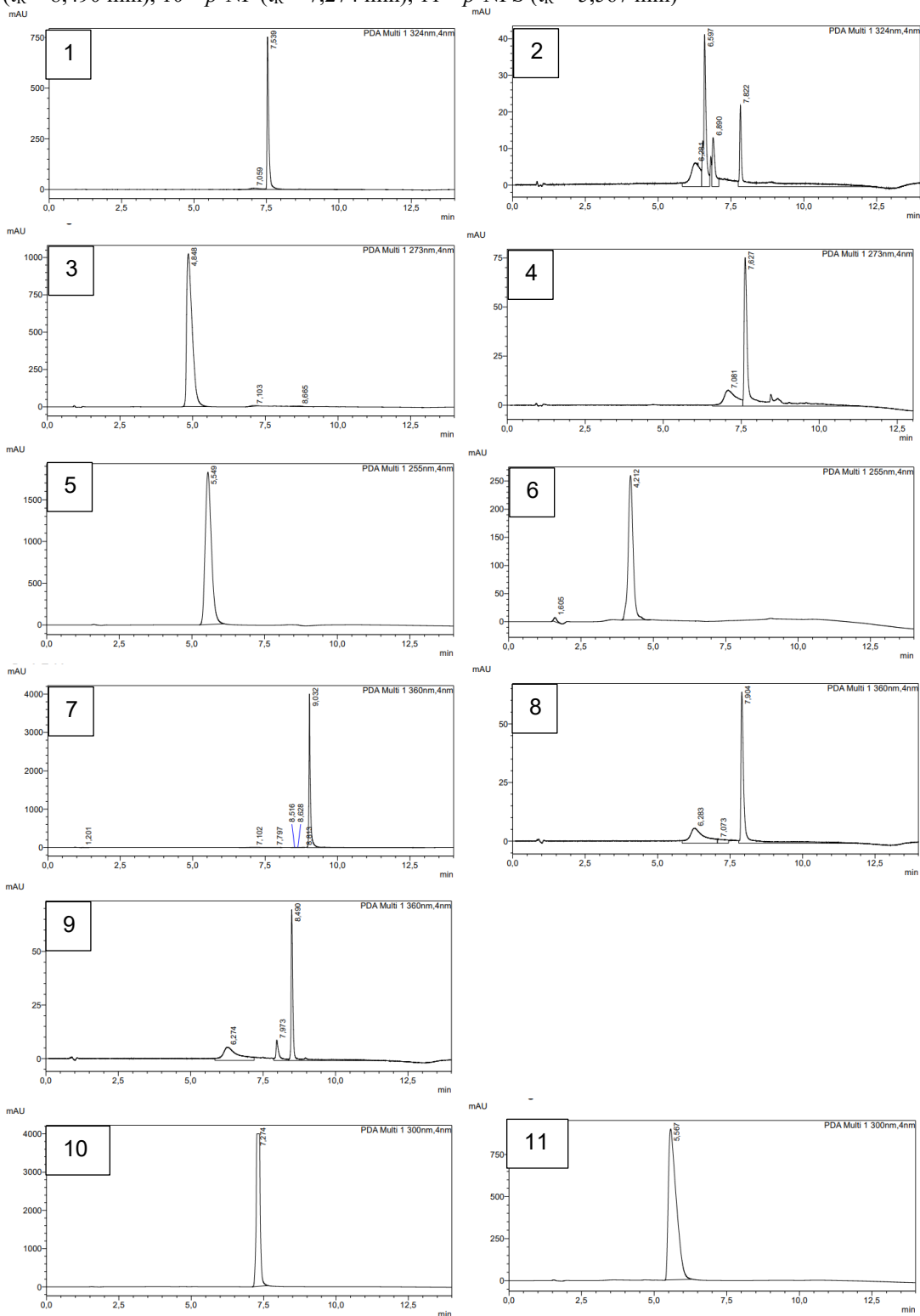
- [1] Tsao, R.: Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2:12, 1231-1246 (2010).
- [2] Reis Giada, M. de L.: Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power., Morales-Gonzalez, J. A. ed. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases - A role for antioxidants*. IntechOpen (2013).
- [3] Fernandes de Araújo, F.; Farias, D de P.; Neri-Numa, I. A.; Pastore, G. M.: Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*. 338, 127535 (2021).
- [4] Biedermann, D.; Vavříková, E.; Cvak, L.; Křen, V.: Chemistry of silybin. *Natural Products Reports*, 31:9, 1138-1157 (2014).
- [5] Slanina, J.; Táborská, E.: Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické Listy*, 98, 239–245 (2004).
- [6] Rockenbach, I. I.; Gonzaga, L. V.; Rizelio, V. M.; Schmidt Goncalves, A. E. S.; Genovese, M. I.: Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Research International*, 44:4, 897–901 (2011).
- [7] Nunes, X. P.; Silva, F. S.; Almeida, J. R. G. S.; Lima, J. T.; Ribeiro, L. A. A.; Quintans Júnior, L. J.; Filho, J. M. B.: Biological oxidations and antioxidant activity of natural products. Rao, V. ed. *Phytochemicals as nutraceuticals - Global approaches to their role in nutrition and health*. IntechOpen (2012).
- [8] Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chung-Yen Oliver Chen a Lima, G. P. P. Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability, Soto-Hernández, M. ed. *Phenolic compounds - Biological activity*. IntechOpen (2017).
- [9] Kerimi, A.; Williamson, G.: At the interface of antioxidant signalling and cellular function: Key polyphenol effects. *Molecular Nutrition & Food Research*. 60:8, 1770-1788 (2016).
- [10] Křen, V.; Marhol P.; Puchartová, K.; Gabrielová E.; Modrianský, M.: Biotransformation of silybin and its congeners. *Current Drug Metabolism*. 14:10, 1009-1021 (2013).
- [11] Guo, X.; Li, K.; Guo, A.; Li, E.: Intestinal absorption and distribution of naringin, hesperidin, and their metabolites in mice. *Journal of Functional Foods*. 74, 104158 (2020).
- [12] van der Horst, M. A.; van Lieshout, J. F. T.; Bury, A.; Hartog, A.; F., Wever, R.: Sulfation of various alcoholic groups by an arylsulfate sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense* and synthesis of estradiol sulfate. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 354:18, 3501-3508 (2012).

- [13] Correia-da-Silva, M.; Sousa, E.; Pinto, M. M. M.: Emerging sulfated flavonoids and other polyphenols as drugs: Nature as an inspiration. *Medicinal Research Reviews*. 34:2, 223-279 (2014).
- [14] van der Horst, M. A.; Hartog, A. F.; Morabet, E. R.; Marais, A.; Kircz, M.; Wever, R.: Enzymatic sulfation of phenolic hydroxy groups of various plant metabolites by an arylsulfotransferase. *European Journal of Organic Chemistry*. 2015:3, 534-541 (2015).
- [15] Al-Horani, R. A.; Desai, U. R.: Chemical sulfation of small molecules – advances and challenges. *Tetrahedron*. 66:16, 2907-2918 (2010).
- [16] Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F.J.; Crouch, S. R.: *Analytická chemie*. Přeložil: Nesměrák, K.; Červený, V.; Křížek, T.; Nováková, E. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019. s. 786 – 805
- [17] Nováková, L.; Douša, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha, 2013.
- [18] Štulík, K.: *Analytické separační metody*. Praha, Karolinum, 2004. s. 136 - 171
- [19] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd., Ostrava, 2003. s. 10 – 25
- [20] Kodíček, M.: *Schéma kapalinového chromatografu*. [online] (citováno 5. 7. 2020). Dostupné online z:
http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/hesla/chromatografie_kapalinova_vysoceucinna.html
- [21] Valentová, K.; Káňová, K.; Di Meo, F.; Pelantová, H.; Chmbers, Ch. S.; Rydlová, L.; Petrásková, L.; Křenková, A.; Cvačka, J.; Trouillas, P.; Křen, V.: Chemoenzymatic preparation and biophysical properties of sulfated quercetin metabolites. *International Journal of Molecular Sciences*. 18:11, 2231 (2017).
- [22] Puchartová, K.; Valentová, K.; Pelantová, H.; Marhol, P.; Cvačka, J.; Havlíček, L.; Křenková, A.; Vavříková, E.; Biedermann, D.; Chambers, Ch. D.; Křen, V.: Prokaryotic and eukaryotic aryl sulfotransferases: sulfation of quercetin and its derivatives. *ChemCatChem*. 7:19, 3152-3162 (2015).
- [23] Begines, P.; Biedermann, D.; Valentová, K.; Petrásková, L.; Pelantová, H.; Maya, I.; Fernández-Bolanos, J. G.; Křen, V.: Chemoenzymatic synthesis and radical scavenging of sulfated hydroxytyrosol, tyrosol, and acetylated derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 67:26, 7281-7288 (2019).
- [24] Dueñas, M.; González-Manzano, S.; Surco-Laos, F.; González-Paramas, A.; Santos-Bulga, C.: Characterization of sulfated quercetin and epicatechin metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60:14, 3592-3598 (2012).

- [25] Zhang, Y. S.; Zhang, Q.; Li, L.; Wang, B.; Zhao, Y.; Guo, D.: Simultaneous determination and pharmacokinetic studies of dihydromyricetin and myricetin in rat plasma by HPLC-DAD after oral administration of *Ampelopsis grossedentata* decoction. *Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 860:1, 4-9 (2007).
- [26] Ji, Y.; Islam, S.; Mertens, A. M.; Sauer, D. F.; Dhoke, G. V.; Jakob, F.; Schwaneberg, U.: Directed aryl sulfotransferase evolution toward improved sulfation stoichiometry on the example of catechols. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103:9, 3761-3771 (2019).
- [27] Saribaş, A. S.; Mobasseri, A.; Pristatsky, P.; Chen, X.; Barthelson, R.; Hakes, D.; Wang, J.: Production of N-sulfated polysaccharides using yeast-expressed N-deacetylase/N-sulfotransferase-1 (NDST-1). *Glycobiology*. 14:12, 1217-1228 (2004).

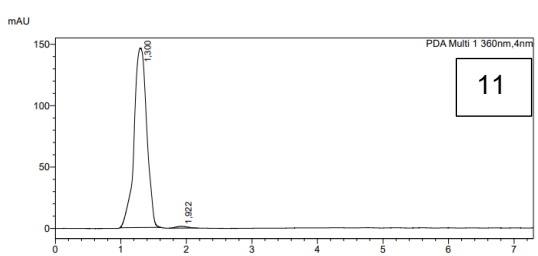
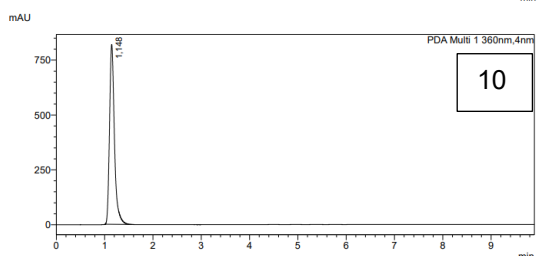
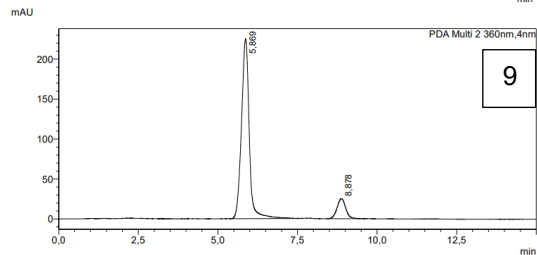
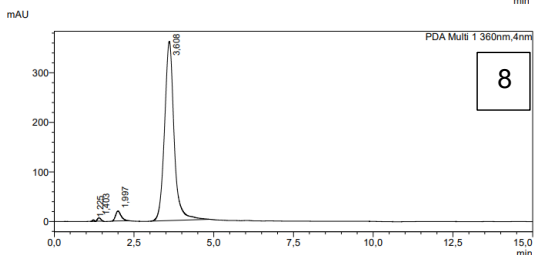
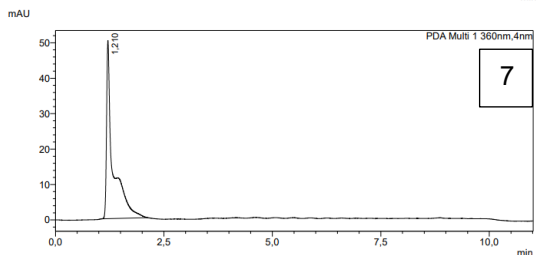
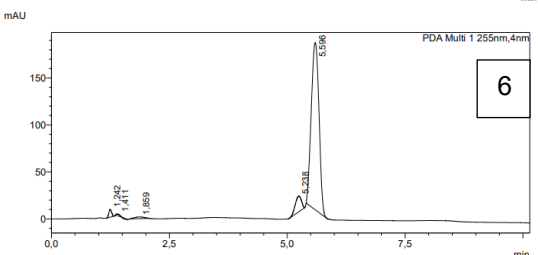
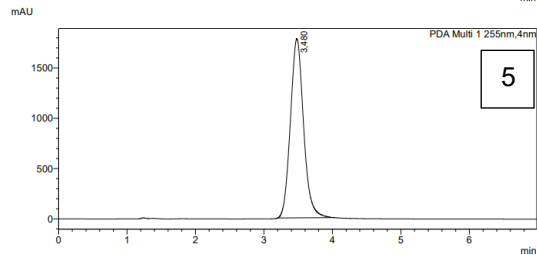
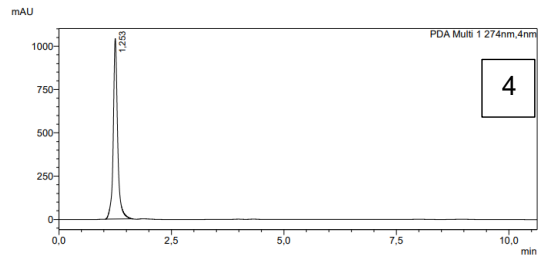
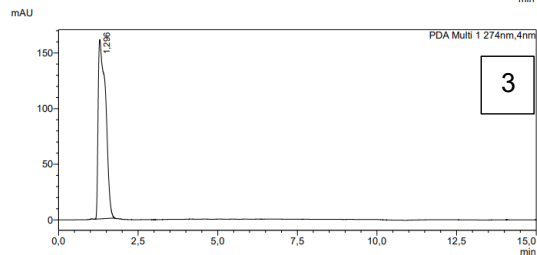
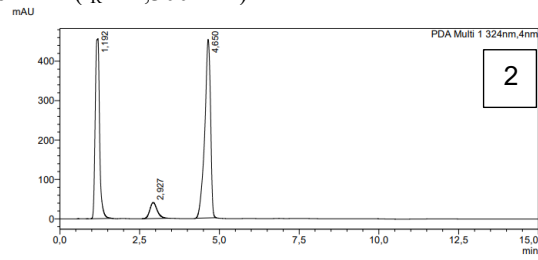
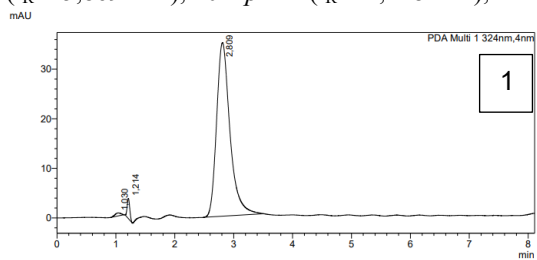
Příloha A

HPLC analýza metodou A1 na koloně C18 – chromatogramy: 1 – CAF ($t_R = 7,539$ min), 2 – CAFS ($t_R = 6,597$ min), 3 – CAT ($t_R = 4,848$ min), 4 – CATS ($t_R = 7,627$ min), 5 – DHB ($t_R = 5,549$ min), 6 – DHBS ($t_R = 4,212$ min), 7 – DHSB ($t_R = 9,032$ min), 8 – DHSBS ($t_R = 7,904$ min), 9 – DHSBS ($t_R = 8,490$ min), 10 – *p*-NP ($t_R = 7,274$ min), 11 – *p*-NPS ($t_R = 5,567$ min)



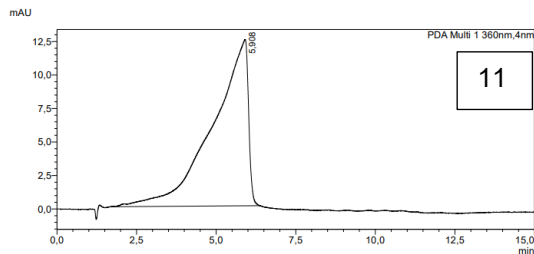
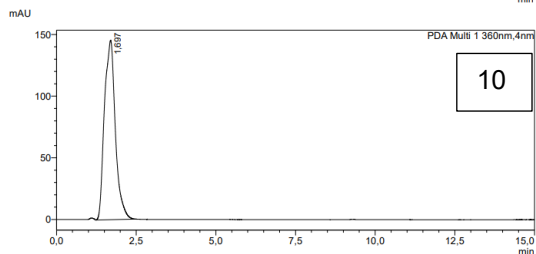
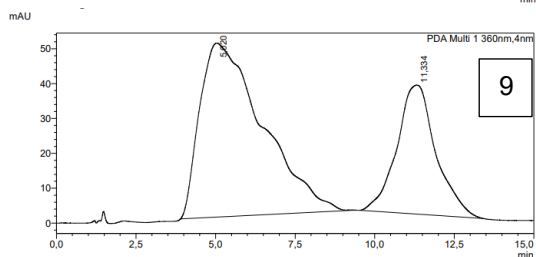
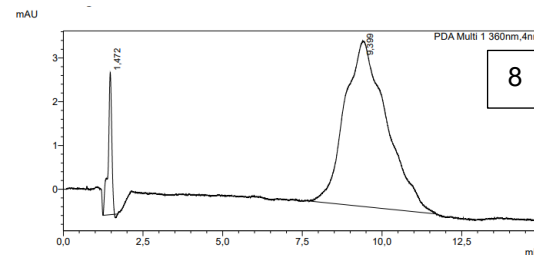
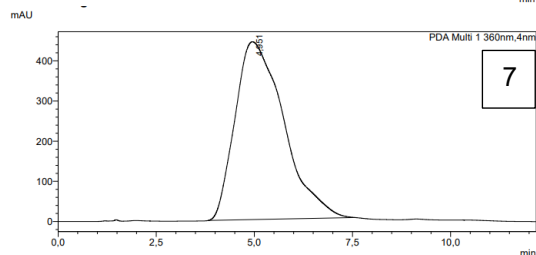
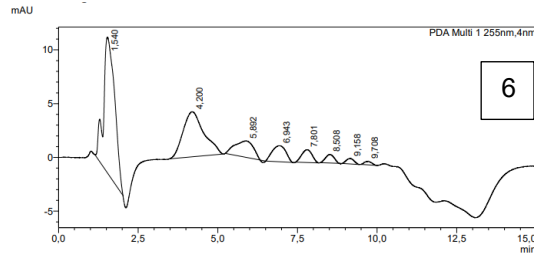
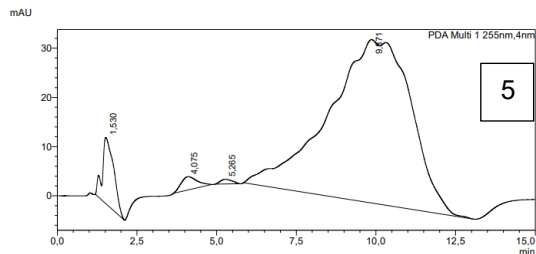
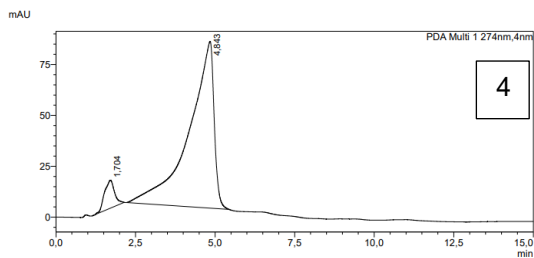
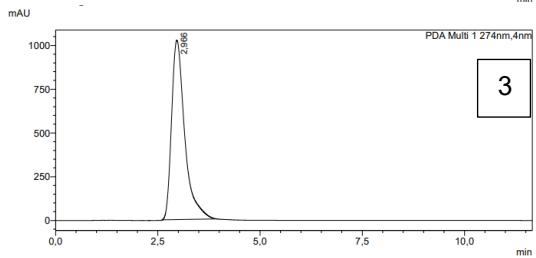
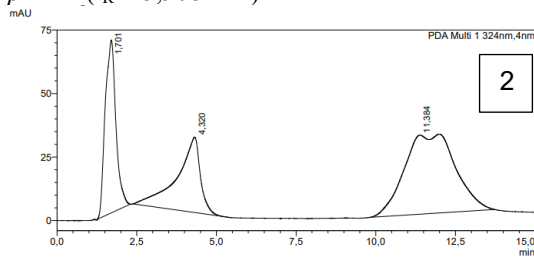
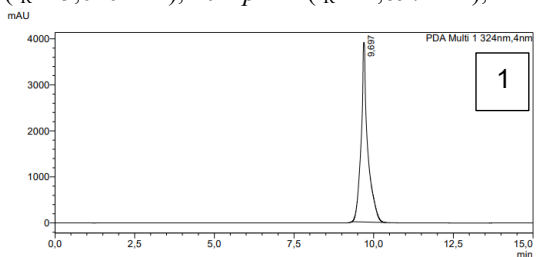
Příloha B-1

HPLC analýza metodou B1 na koloně ZIC-HILIC – chromatogramy: 1 – CAF ($t_R = 2,809$ min), 2 – CAFS ($t_R = 1,192$ min), 3 – CAT ($t_R = 1,296$ min), 4 – CATS ($t_R = 1,253$ min), 5 – DHB ($t_R = 3,480$ min), 6 – DHBS ($t_R = 5,596$ min), 7 – DHSB ($t_R = 1,210$ min), 8 – DHSBS ($t_R = 3,608$ min), 9 – DHSBS ($t_R = 5,869$ min), 10 – *p*-NP ($t_R = 1,148$ min), 11 – *p*-NPS ($t_R = 1,300$ min)



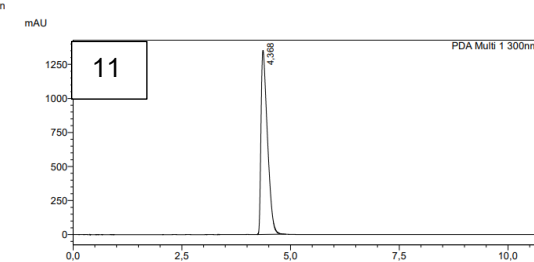
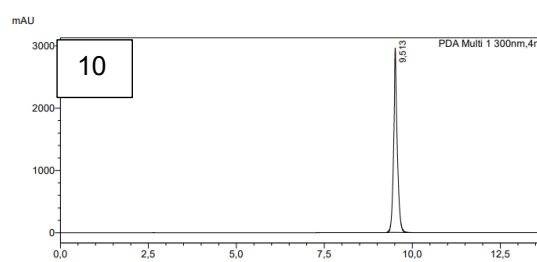
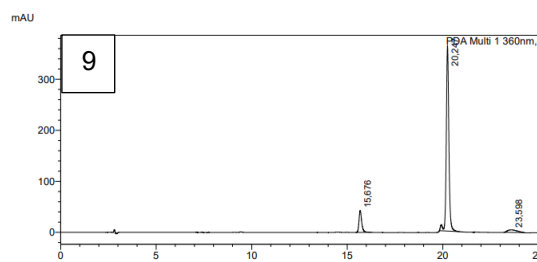
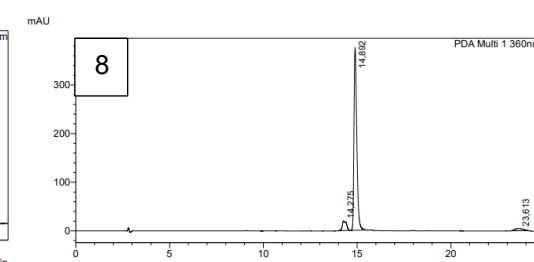
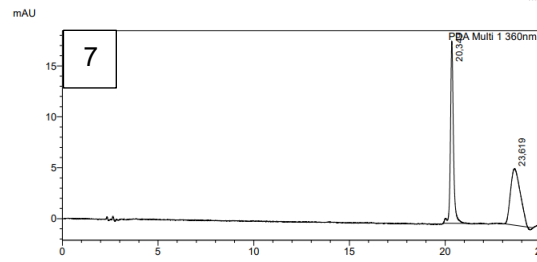
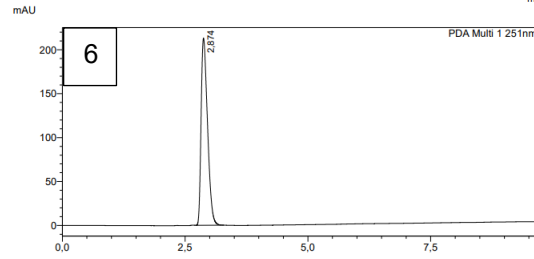
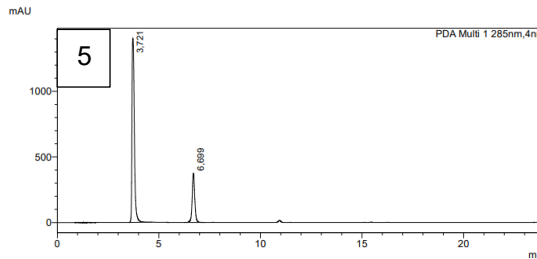
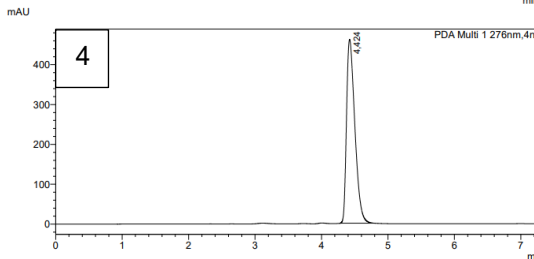
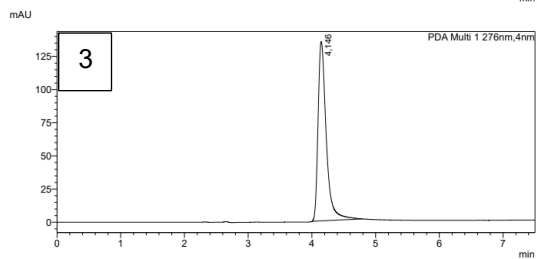
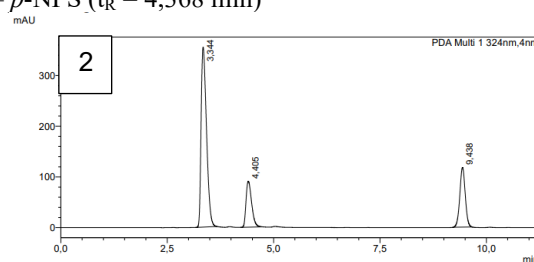
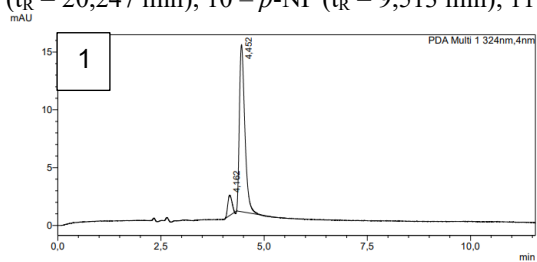
Příloha B-2

HPLC analýza metodou B2 na koloně ZIC-HILIC – chromatogramy: 1 – CAF ($t_R = 9,697$ min), 2 – CAFS ($t_R = 4,320$ min), 3 – CAT ($t_R = 2,966$ min), 4 – CATS ($t_R = 4,843$ min), 5 – DHB ($t_R = 9,871$ min), 6 – DHBS ($t_R = 4,200$ min), 7 – DHSB ($t_R = 4,951$ min), 8 – DHSBS ($t_R = 9,399$ min), 9 – DHSBS ($t_R = 5,020$ min), 10 – *p*-NP ($t_R = 1,697$ min), 11 – *p*-NPS ($t_R = 5,908$ min)



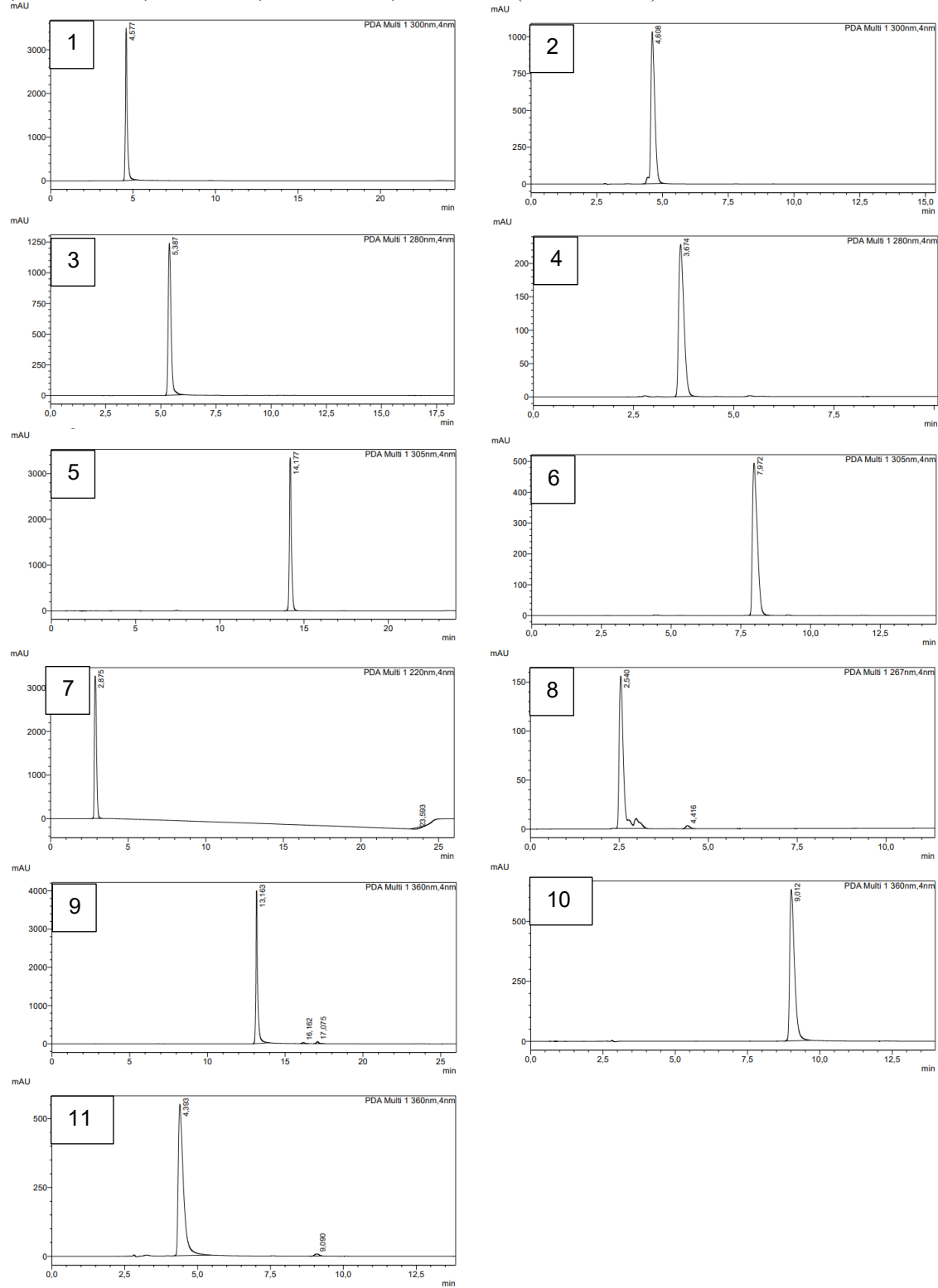
Příloha C

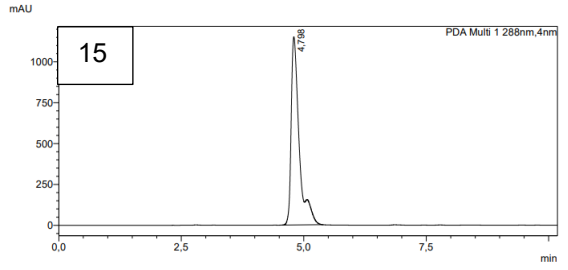
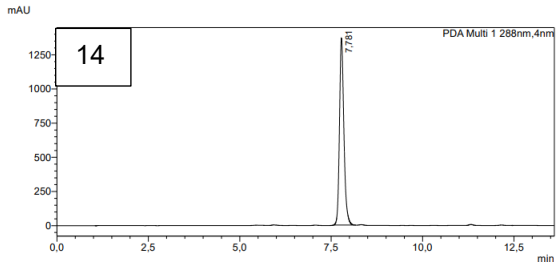
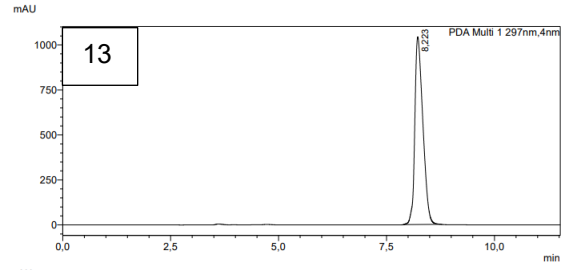
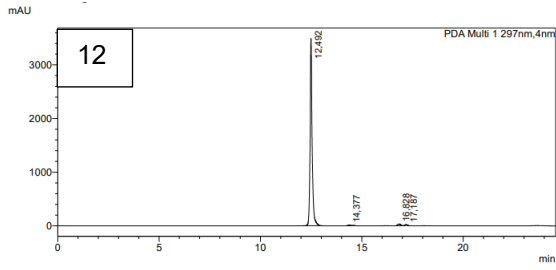
HPLC analýza metodou C1 na koloně Kinetex PFP – chromatogramy: 1 – CAF ($t_R = 4,452$ min), 2 – CAFS ($t_R = 3,344$ min), 3 – CAT ($t_R = 4,146$ min), 4 – CATS ($t_R = 4,424$ min), 5 – DHB ($t_R = 3,721$ min), 6 – DHBS ($t_R = 2,874$ min), 7 – DHSB ($t_R = 20,349$ min), 8 – DHSBS ($t_R = 14,892$ min), 9 – DHSBS ($t_R = 20,247$ min), 10 – *p*-NP ($t_R = 9,513$ min), 11 – *p*-NPS ($t_R = 4,368$ min)



Příloha D

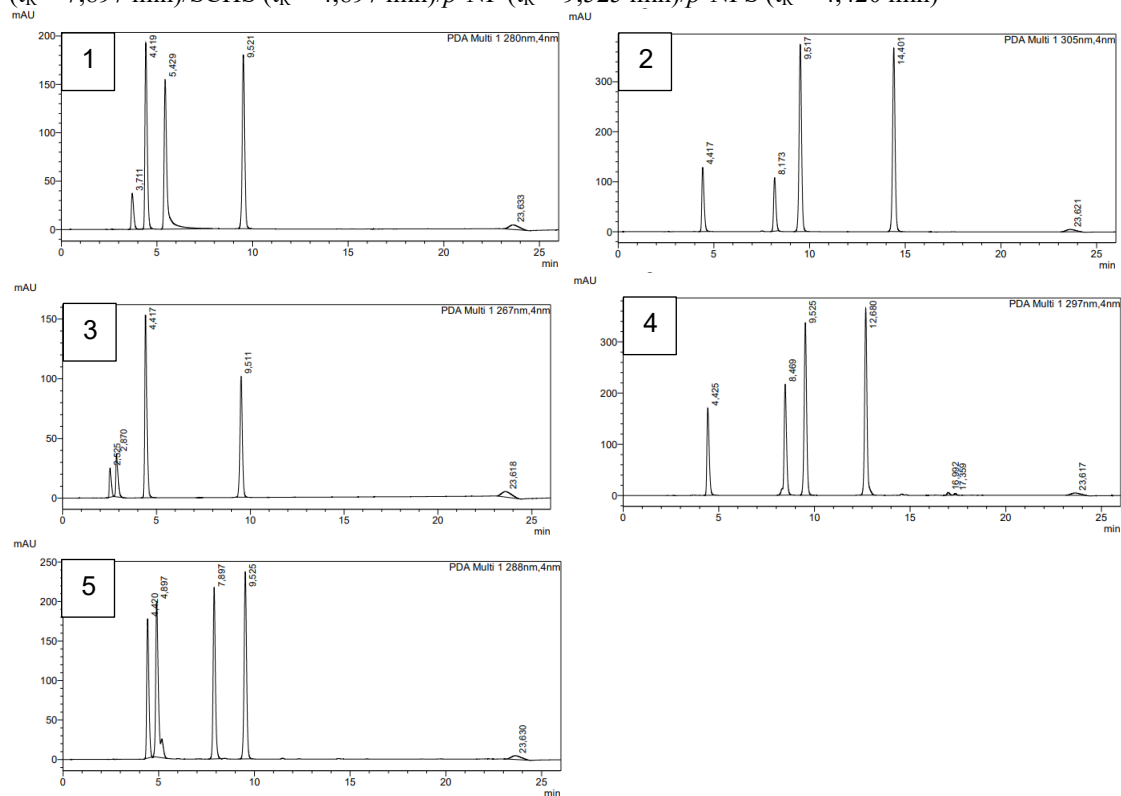
HPLC analýza metodou C1 na koloně Kinetex PFP – chromatogramy: 1 – AM ($t_R = 4,577$ min), 2 – AMS ($t_R = 4,608$ min), 3 – MECAT ($t_R = 5,387$ min), 4 – MECATS ($t_R = 3,674$ min), 5 – NG ($t_R = 14,177$ min), 6 – NGS ($t_R = 7,972$ min), 7 – PHG ($t_R = 2,875$ min), 8 – PHGS ($t_R = 2,540$ min), 9 – Q ($t_R = 13,163$ min), 10 – QS ($t_R = 9,012$ min), 11 – QSS ($t_R = 4,393$ min), 12 – SB ($t_R = 12,492$ min), 13 – SBS ($t_R = 8,223$ min), 14 – SCH ($t_R = 7,781$ min), 15 – SCHS ($t_R = 4,798$ min)



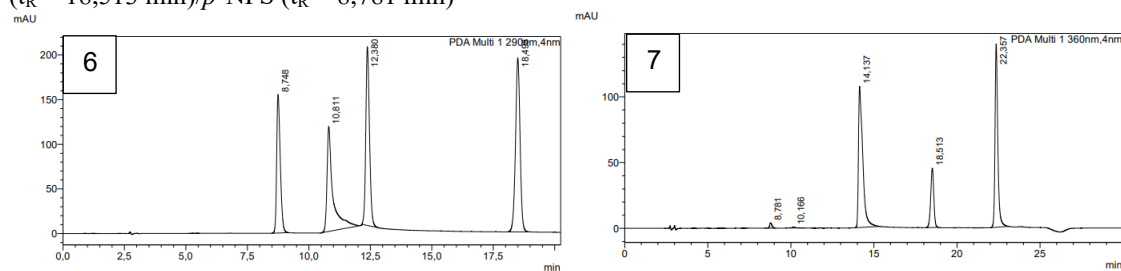


Příloha E

HPLC analýza metodou C1 na koloně Kinetex PFP – chromatogramy: 1 – MECAT ($t_R = 5,429$ min)/MECATS ($t_R = 3,711$ min)/*p*-NP ($t_R = 9,521$ min)/*p*-NPS ($t_R = 4,419$ min); 2 – NG ($t_R = 14,401$ min)/NGS ($t_R = 8,173$ min)/*p*-NP ($t_R = 9,517$ min)/*p*-NPS ($t_R = 4,417$ min); 3 – PHG ($t_R = 2,870$ min)/PHGS ($t_R = 2,525$ min)/*p*-NP ($t_R = 9,511$ min)/*p*-NPS ($t_R = 4,417$ min); 4 – SB ($t_R = 12,680$ min)/SBS ($t_R = 8,469$ min)/*p*-NP ($t_R = 9,525$ min)/*p*-NPS ($t_R = 4,425$ min); 5 – SCH ($t_R = 7,897$ min)/SCHS ($t_R = 4,897$ min)/*p*-NP ($t_R = 9,525$ min)/*p*-NPS ($t_R = 4,420$ min)



HPLC analýza metodou C1 na koloně Kinetex PFP s úpravou gradientu podle sulfátu kyseliny kávové – chromatogramy: 6 – AM ($t_R = 10,811$ min)/AMS ($t_R = 12,380$ min)/*p*-NP ($t_R = 18,498$ min)/*p*-NPS ($t_R = 8,748$ min); 7 – Q ($t_R = 22,357$ min)/QS ($t_R = 14,137$ min)/QSS ($t_R = 10,166$ min)/*p*-NP ($t_R = 18,513$ min)/*p*-NPS ($t_R = 8,781$ min)



Příloha F

HPLC analýza jednotlivých odběrů z reakční směsi sulfátu kyseliny kávové na koloně Kinetex PFP podle upravené metody C1 pro sulfát kyseliny kávové – chromatogramy: 1 – 0 min; 2 – 10 min; 3 – 20 min; 4 – 30 min; 5 – 40 min; 6 – 50 min; 7 – 60 min; 8 – 2 hod; 9 – 3 hod; 10 – 4 hod; 11 – 5 hod.

Látky eluovaly v pořadí: CAFS, *p*-NPS, CAF, *p*-NP

