

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra analytickej chémie



**Diplomová práca**

Vývoj UHPLC-DAD metódy na separáciu fenolických látok z rastlinného materiálu  
a optimalizácia ich extrakcie

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Marcela Hollá

### **Čestné prehlásenie**

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové 2022

Anna Turčanová

### **PodĎakovanie**

Týmto by som chcela poĎakovať svojej školiteľke doc. PharmDr. Hane Sklenářovej, Ph.D. a konzultantke Mgr. Marcele Hollej za odborné vedenia, užitočné rady, ochotu, trpezlivosť a čas, ktoré mi venovali pri vypracovávaní tejto diplomovej práce. Ďakujem aj ostatným zamestnancom z Katedry analytickej chémie za príjemné pracovné prostredie. Takisto by som chcela poĎakovať aj mojej rodine a priateľom za to, že ma počas celého štúdia podporovali a pomáhali v každej situácii.

## Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytickej chémie

Kandidát: Anna Turčanová

Školiteľ: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Marcela Hollá

Názov diplomovej práce: Vývoj UHPLC-DAD metódy na separáciu fenolických látok z rastlinného materiálu a optimalizácia ich extrakcie

Táto diplomová práca sa zaoberá vývojom UHPLC-DAD metódy na separáciu vybraných fenolických látok (arbutín, kyselina chlorogénová, neochlorogénová, kryptochlorogénová, izochlorogénová A a kávová, cynarín, katechín, epikatechín, rutín, hyperozid, hirsutrín, reynoutrín, guajaverín, kvercitrín a kvercetin).

UHPLC analýza týchto fenolických látok prebiehala na kolóne Luna® Omega Polar C18 100 (150 x 2,1 mm; 1,6 µm) s plne poréznymi časticami. V rámci optimalizácie metódy bola testovaná aj kolóna s povrchovo poréznymi časticami (Kinetex® Polar C18) a kolóna s hybridnou stacionárnou fázou (YMC-Triart C18 ExRS). Dávkovaný objem vzorky bol 2 µl, prietoková rýchlosť bola nastavená na 0,3 ml/min a teplota kolóny na 30 °C. Ako mobilná fáza bola použitá ultračistá voda okyslená kyselinou octovou na pH 2,8 v kombinácii s acetonitrilom. Celková doba analýzy bola 17,5 min a detekcia prebiehala pomocou DAD detektora pri vlnových dĺžkach 254, 280, 320 a 365 nm.

Optimalizovaná UHPLC-DAD metóda slúžila na stanovenie obsahu vybraných fenolických látok v listoch hrušky. Boli prevedené extrakcie v ultrazvukovom kúpeli pomocou etanolu a metanolu v rôznych koncentráciách ako extrakčných rozpúšťadiel. Takisto bol optimalizovaný aj čas extrakcie. Najväčšie množstvo fenolických látok sa nachádzalo v extrakčnom rozpúšťadle s 20% etanolom vo vode po 30 min extrakcie.

## **Abstract**

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Anna Turčanová

Supervisor: doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Advisor: Mgr. Marcela Hollá

Title of the diploma thesis: Development of UHPLC-DAD method for separation of phenolic substances in plant material and extraction optimization

This diploma thesis deals with development of UHPLC-DAD method for separation of selected phenolic substances (arbutin, chlorogenic, neochlorogenic, cryptochlorogenic, isochlorogenic A and caffeic acid, cynarin, catechin, epicatechin, rutin, hyperoside, hirsutrin, reynoutrin, guaiaverin, quercitrin and quercetin).

UHPLC analysis of these phenolic substances took place on a Luna<sup>®</sup> Omega Polar C18 100 (150 x 2.1 mm; 1.6 μm) column with fully porous particles. As a part of the optimization method, a column with core-shell particles (Kinetex<sup>®</sup> Polar C18) and a column with a hybrid stationary phase (YMC-Triart C18 ExRS) were also tested. The sample injection volume was 2 μl, the flow rate has been set to 0.3 ml/min and temperature of the column has been set to 30 °C. As a mobile phase ultrapure water acidified with acetic acid to pH 2.8 in combination with acetonitrile has been used. The total analysis time was 17.5 min and detection was performed using a DAD detector at wavelengths 254, 280, 320 and 365 nm.

The optimized UHPLC-DAD method was used to determine the content of selected phenolic substances in pear leaves. Extractions were performed in an ultrasonic bath using ethanol and methanol at various concentrations as extraction solvents. The extraction time was also optimized. The largest amount of phenolic substances was in the extraction solvent with 20% ethanol in water after 30 min of extraction.

## Obsah

<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....</b>	<b>8</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2 CIEĽ PRÁCE .....</b>	<b>10</b>
<b>3 TEORETICKÁ ČASŤ.....</b>	<b>11</b>
3.1 FENOLICKÉ LÁTKY .....	11
3.1.1 Fenolické kyseliny.....	11
3.1.2 Flavonoidy.....	12
3.1.3 Ostatné fenolické látky .....	13
3.2 VYBRANÉ FENOLICKÉ LÁTKY .....	13
3.3 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRÁFIA.....	16
3.4 PREHĽAD PODMIENOK SEPARÁCIE FENOLICKÝCH LÁTKO Z RASTLINNÉHO MATERIÁLU.....	18
<b>4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>21</b>
4.1 POUŽITÉ PRÍSTROJE A POMÔCKY .....	21
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	21
4.3 ŠTANDARDY .....	22
4.4 PRÍPRAVA ROZTOKOV .....	22
4.5 PRÍPRAVA EXTRAKTOV .....	23
4.6 PODMIENKY CHROMATOGRÁFICKEJ SEPARÁCIE .....	24
4.7 VALIDÁCIA CHROMATOGRÁFICKEJ METÓDY .....	25
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUSIA.....</b>	<b>27</b>
5.1 VÝVOJ UHPLC-DAD METÓDY.....	27
5.1.1 Kolóna YMC-Triart C18 ExRS.....	28
5.1.2 Kolóna Kinetex® Polar C18.....	32
5.1.3 Kolóna Luna® Omega Polar C18 .....	35
5.2 OPTIMALIZOVANÉ PODMIENKY UHPLC-DAD METÓDY .....	40
5.3 VÝSLEDKY TESTU VHODNOSTI CHROMATOGRÁFICKÉHO SYSTÉMU.....	41
5.4 LINEARITA.....	42
5.5 STANOVENIE OBSAHU FENOLICKÝCH LÁTKO .....	43

5.5.1	<i>Výber extrakčného rozpúšťadla</i> .....	44
5.5.2	<i>Vplyv dĺžky extrakcie na výťažnosť</i> .....	52
<b>6</b>	<b>ZÁVER</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>POUŽITÁ LITERATÚRA</b> .....	<b>58</b>

## Zoznam použitých skratiek

ACN – acetonitril

DAD - detektor diódového poľa (*Diode Array Detektor*)

DMSO – dimetylsulfoxid

EtOH – etanol

KP – kalibračná priamka

MeOH – metanol

MF – mobilná fáza

MS – hmotnostný spektrometer (*Mass Spectrometer*)

R<sup>2</sup> – koeficient determinácie

RSD – relatívna smerodajná odchýlka

SST – test vhodnosti chromatografického systému (*System Suitability Test*)

UHPLC – ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography*)



## 1 Úvod

Fenolické látky sú sekundárne metabolity rastlín, ktoré hrajú dôležitú úlohu v raste, reprodukcii, farbe a ochrane proti patogénom.

Na ľudský organizmus pôsobia hlavne antioxidantnými, protizápalovými, protinádorovými a antimikrobiálnymi vlastnosťami. V potrave sú zastúpené najmä v ovocí, zelenine, obilninách, strukovinách, čaji, káve, čokoláde, ovocných šťavách a červenom víne.

Fenolické zlúčeniny sa najčastejšie stanovujú pomocou kvapalinovej chromatografie. Táto diplomová práca sa zaoberá vývojom UHPLC-DAD metódy vybraných fenolických látok. Ďalej prebiehala aj optimalizácia extrakcie pomocou 2 extrakčných rozpúšťadiel v rôznych koncentráciách, a takisto aj optimalizácia času extrakcie.

## 2 Cieľ práce

Cieľom experimentálnej časti tejto diplomovej práce bude vývoj chromatografickej UHPLC-DAD metódy pre vybrané fenolické látky (arbutín, kyselina chlorogénová, neochlorogénová, kryptochlorogénová, izochlorogénová A a kávová, cynarín, katechín, epikatechín, rutín, hyperozid, hirsutrín, reynoutrín, guajaverín, kvercitrín a kvercetín). Budú testované rôzne druhy chromatografických kolón, mobilných fáz, profily gradientovej elúcie, prietokové rýchlosti aj teploty na kolóne.

Bude vykonaný aj test vhodnosti chromatografického systému (rozlíšenie, faktor symetrie, píkova kapacita a retenčný faktor), opakovateľnosť retenčných časov a plôch píkov a linearita testovaných látok.

Optimalizujeme výber extrakčného rozpúšťadla a čas extrakcie v listoch hrušky.

### **3 Teoretická časť**

#### **3.1 Fenolické látky**

Fenolické látky sú zlúčeniny, ktoré obsahujú aromatický kruh s jednou alebo viac hydroxylovými skupinami. V rámci štruktúry to môžu byť jednoduché fenolové molekuly až vysokomolekulárne polyméry. Sú to sekundárne metabolity rastlín, ktoré sú dôležité pre rast, reprodukciu, ochranu proti patogénom a farbu ovocia a zeleniny. Väčšinou ich v prírode nájdeme konjugované s rôznymi sacharidmi, organickými kyselinami alebo navzájom. Hlavnými zdrojmi týchto látok sú ovocie a nápoje ako čaj, káva, ovocné šťavy a červené víno. Takisto sa vyskytujú aj v zelenine, obilninách, čokoláde a strukovinách.

Skúmané sú hlavne kvôli svojim antioxidačným vlastnostiam. Takisto sa vyznačujú aj protizápalovými, protinádorovými, antimikrobiálnymi, antifugálnymi, antitrombotickými, kardioprotektívnymi a vazodilatačnými účinkami. Používajú sa na prevenciu chorôb ako sú napríklad rakovina, ateroskleróza, hypertenzia, diabetes mellitus a podobne.

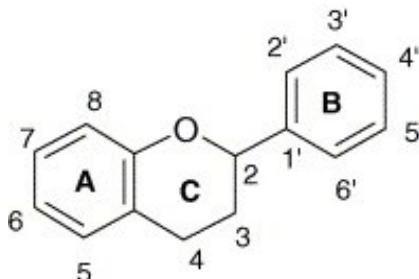
Rozdeľujeme ich do týchto hlavných skupín: fenolické kyseliny, flavonoidy, lignany, stilbény a taníny [1 - 3].

##### **3.1.1 Fenolické kyseliny**

Fenolické kyseliny rozdeľujeme do dvoch tried, a to na deriváty kyseliny hydroxybenzoovej a deriváty kyseliny hydroxyškoricovej, ktoré sa vyznačujú vyššími antioxidačnými vlastnosťami. Medzi hydroxybenzoové kyseliny radíme napr. kyselinu gallovú, p-hydroxybenzoovú, vanilovú a syringovú. Obsah týchto látok je v rastlinách nízky, ale môžeme ich nájsť napríklad v ovocí, reďkovke, cibuli a čaji. K hydroxyškoricovým kyselinám patria kyselina kávová, ferulová, p-kumarová, sinapová a chlorogénová. Nachádzajú sa napr. v káve, čučoriedkach, slivkách, čerešniach a jablkách [1, 2].

### 3.1.2 Flavonoidy

Štruktúru flavonoidov, ktorú vidíme na Obr. 1, tvoria dva aromatické kruhy A a B, tie sú spojené mostíkom z troch uhlíkov, ktorý je väčšinou vo forme heterocyklického kruhu C [2].



Obrázok 1: Všeobecná štruktúra flavonoidov [2]

U flavonoidov ešte ďalej rozlišujeme podtriedy: flavonoly, flavóny, izoflavóny, flavanóny, antokyanidíny a flavanoly (katechíny a proantokyanidíny) [1].

#### Flavonoly

Hlavnými predstaviteľmi flavonolov sú kvercetín a kaempferol. Ich hlavnými zdrojmi sú: cibuľa, kel, pór, brokolica, čučoriedky, červené víno a čaj. Sú najrozšírenejšou skupinou flavonoidov v potravinách. Nachádzajú sa v glykozylovaných formách, kde cukrovú skupinu často tvorí glukóza, ramnóza, galaktóza a arabinóza. Nájdeme ich hlavne v povrchových tkanivách rastlín, ako sú pokožka a listy. Tento jav je spôsobený tým, že ich biosyntéza je stimulovaná svetlom [1].

#### Flavóny

Medzi flavóny radíme hlavne glykozidy luteolínu a apigenínu. V ovocí a zelenine nie sú tak často zastúpené ako flavonoly. Zdrojmi týchto látok sú: petržlen, zeler, proso a pšenica [1].

#### Izoflavóny

Hlavné izoflavóny sú: genisteín, daidzeín a glyciteín, ktoré nájdeme hlavne v strukovinách. Vyznačujú sa pseudohormonálnymi vlastnosťami kvôli tomu, že ich štruktúra je podobná estrogénom. Takisto majú schopnosť viazať sa na estrogénové receptory, kvôli čomu sú často označované ako fytoestrogény [1].

#### Flavanóny

Medzi hlavných zástupcov tu radíme naringenín a hesperidín. Ich najväčším zdrojom sú citrusové plody - hlavne grapefruit, pomaranč a citróny. V malom množstve ich nájdeme aj v paradajkách a mäte. V grapefruite sú zodpovedné za jeho horkú chuť [1].

## **Antokyanidíny**

Najznámejší a najbežnejší antokyanidín v potravinách je kyanidín. Hlavným zdrojom je ovocie, ale takisto ich nájdeme aj v červenom víne, baklažáne, kapuste, fazuli, cibuli a red'kovke. Sú to pigmenty, ktoré sú zodpovedné za farbu kvetov a plodov [1].

## **Flavanoly**

Flavanoly delíme na katechíny, ktoré sú v monomérskej forme a proantokyanidíny, ktoré sú vo forme polyméru. Hlavnými zdrojmi katechínov sú marhule, zelený čaj, čokoláda a červené víno. Proantokyanidíny, známe tiež aj ako kondenzované taníny, sú zodpovedné za trpkastú chuť v ovocí a nápojoch, ktorá často zmizne, keď ovocie dozreje [1].

### **3.1.3 Ostatné fenolické látky**

#### **Lignany**

Hlavnými zástupcami sú: sekoisolariciresinol a matairezínol. Najbohatším zdrojom sú ľanové semienka, ale aj šošovica, pšenica, cesnak, špargľa, mrkva, hrušky a sušené slivky [1].

#### **Stilbény**

Hlavným zástupcom je resveratrol, ktorý sa nachádza vo víne. Je významný kvôli svojim antikarcinogénnym účinkom [1].

#### **Taníny**

Taníny sú zlúčeniny, ktoré sa vyznačujú relatívne vysokou molekulovou hmotnosťou. Delíme ich na hydrolyzovateľné taníny (radíme sem estery kyseliny gallovej) a kondenzované taníny, tiež známe ako proantokyanidíny. Sú to polyméry katechínu a v ovocí a nápojoch sú zodpovedné za trpkastú chuť, ktorá vzniká pri tvorbe komplexov s bielkovinami obsiahnutými v slinách [1, 2].

## **3.2 Vybrané fenolické látky**

Na separáciu vybraných fenolických látok sú dôležité ich fyzikálno-chemické vlastnosti. Rozdeľovací koeficient zlúčeniny určuje jej hydrofilitu/lipofilitu a je zodpovedný za správanie sa danej zlúčeniny. Je definovaný ako rovnovážny pomer koncentrácií zlúčeniny v dvoch navzájom nemiešateľných kvapalinách: 1-oktanolu (hydrofóbná kvapalina) a vody (hydrofilná kvapalina). Pre lepší prehľad sa hodnoty uvádzajú ako dekadický logaritmus (logP). Hodnoty logP väčšie ako 0 označujú lipofilné látky, ktoré sa lepšie rozpúšťajú v organickej fáze

a hodnoty menšie ako 0 hydrofilné látky a ich lepšiu rozpustnosť vo vodnej fáze. Rovnaká rozpustnosť v organickej aj vodnej fáze je typická pre logP rovnej 0 [4]. V Tab. 1 sú zobrazené hodnoty logP a pKa jednotlivých fenolických látok, ktorými sme sa v tejto práci zaoberali.

*Tabuľka 1: Hodnoty logP a pKa jednotlivých fenolických látok [5, 6]*

<b>FENOLICKÁ LÁTKA</b>	<b>logP</b>	<b>pKa</b>
arbutín	-0,7	9,82
kyselina neochlorogénová	-0,4	3,33
kyselina chlorogénová	-0,4	3,33
katechín	0,4	9,00
kyselina kryptochlorogénová	-0,4	3,39
kyselina kávová	1,2	3,64
epikatechín	0,4	9,00
cynarín	1,5	3,18
rutín	-1,3	6,37
hyperozid	0,4	6,37
hirsutrín	0,4	6,37
reynoutrín	0,4	6,43
guaijaverín	0,4	6,43
kyselina izochlorogénová A	1,5	3,28
kvercitrín	0,9	6,37
kvercetín	1,5	6,38

Arbutín sa vyskytuje v listoch mnohých liečivých rastlín a vyznačuje sa antimikrobiálnymi, antioxidantnými a protizápalovými vlastnosťami, vrátane liečby ochorení močových ciest. Má význam v zdravotníckom a kozmetickom priemysle aj ako depigmentačné činidlo na koži, ktoré zabraňuje a eliminuje rast tmavých škvŕn [7]. Hodnota pKa je 9,82 a so zvyšujúcou sa hodnotou pKa rastie aj sila zásad. Má negatívnu hodnotu logP, čo označuje, že arbutín je lepšie rozpustný vo vodnej fáze. Ako polárna látka je na nepolárnej stacionárnej fáze zadržovaná slabo a eluuje na začiatku.

Kyselina chlorogénová, ester kyseliny kávovej a kyseliny chinovej, sa nachádza v káve, jablkách, hruškách, bobuľovom ovocí a baklažáne. Kyselina neochlorogénová, izomér kyseliny chlorogénovej, sa vyskytuje v broskyniach, slivkách, marhuliach, čerešniach a kávových zrnách. Kyselinu kryptochlorogénovú môžeme nájsť napríklad v zelených kávových zrnách, jablkách a zemiakoch. Tieto 3 kyseliny majú hodnotu  $\log P$  -0,4, ktorá udáva, že látky sú hydrofilné. Kyselina kávová je obsiahnutá v ovse, pšenici, ryži a olivovom oleji. Kyselina izochlorogénová A je rozšírená v ovocí, zelenine a káve. Kyselina kávová a izochlorogénová A dosahujú hodnoty  $\log P$  väčšie ako 1 a označuje látky viac lipofilné. Chlorogénové kyseliny sa vyznačujú antioxidantnými, antimikrobiálnymi, antibakteriálnymi, antivírusovými, hepatoprotektívnymi a protizápalovými vlastnosťami, a taktiež môžu prispieť k prevencii kardiovaskulárnych ochorení [8 - 13]. Hodnota  $pK_a$  chlorogénových kyselín okolo 3,3 značí, že tieto látky patria medzi silné kyseliny.

Katechín a epikatechín sú fenolické zlúčeniny z podtriedy flavanolov. Nájdeme ich v kakau, čajových listoch, ovocí, zelenine, strukovinách a orechoch. Príjem týchto látok je spojený s nižším výskytom cukrovky 2. typu. Sú to zásady s hodnotou  $pK_a$  9,00. Cynarínu sa pripisujú potencionálne hepatoprotektívne, antioxidantné, antidiabetické a antikarcinogénne účinky a nachádza sa napríklad v artičokoch [14, 15]. Podľa hodnoty  $pK_a$  3,18 je to silná kyselina. Hodnoty  $\log P$  väčšie ako 0 označujú lipofilné látky a ich lepšiu rozpustnosť v organickej fáze.

Rutín je prítomný v špargli, pohánke, citrusových plodoch, bobuľových plodoch, jablkách, marhuliach, čerešniach, hrozne, slivkách, pomarančoch, hovädzom mäse a pive. Je známy pre svoje antioxidantné, protizápalové, kardiovaskulárne, neuroprotektívne, antidiabetické a protirakovinové účinky [11, 16]. Zo zápornej hodnoty  $\log P$  vyplýva, že rutín je hydrofilná látka s lepšou rozpustnosťou vo vodnej fáze.

Hyperozid nájdeme najmä v rastlinách ako ľubovník a hloh. Vyznačuje sa protirakovinovými, protizápalovými a antioxidantnými účinkami. Hirsutrín má hepatoprotektívne a antioxidantné vlastnosti a ako všetky ostatné flavonoidy sa nachádza v mnohých rastlinách, zelenine a ovocí. Reynoutrín má potenciálne antioxidantné a antivírusové vlastnosti a vyskytuje sa v listoch a plodoch rôznych rastlín. Takisto aj guaijaverín pôsobí ako antioxidant [17 - 20]. Všetky tieto 4 látky majú hodnotu  $\log P$  0,4, ktorá udáva, že látka je lipofilná. Hodnotou  $pK_a$  okolo 6,4 sa vyznačujú slabé kyseliny aj zásady.

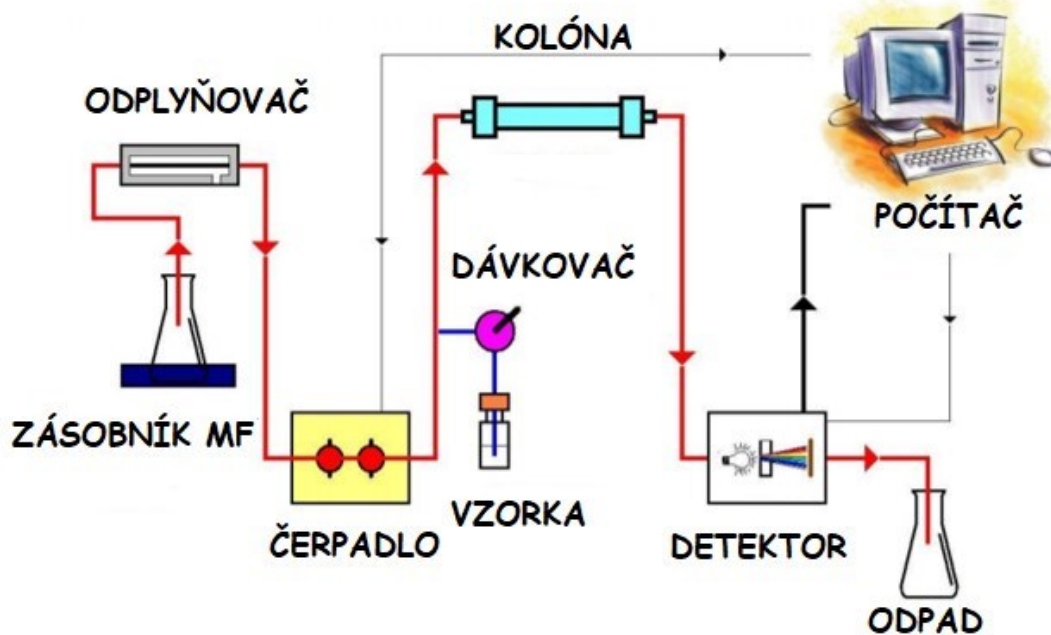
Kvercetín má antikarcinogénne, protizápalové, antivírusové a antioxidantné účinky. Hlavným potravinovým zdrojom sú: jablká, hrozno, cibuľa, čaj, paradajky, semená, orechy, liečivé rastliny ako ginkgo a ľubovník. Je prítomný hlavne vo svojich glykozylovaných formách, ako je kvercitrín, ktorý má významné antioxidantné aj antibakteriálne vlastnosti [21, 22]. Ich hodnoty logP blízke 1 označujú látky lipofilného charakteru.

### **3.3 Vysokoučinná kvapalinová chromatografia**

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) je separačná analytická metóda, ktorá sa používa vo farmaceutickej analýze, bioanalýze, analýze potravín, rastlinných materiálov a tiež v environmentálnej analýze. Je založená na rozdielnej distribúcii látok medzi pohyblivou mobilnou fázou a nepohyblivou stacionárnou fázou. V kvapalinovej chromatografii je pohyblivou mobilnou fázou kvapalina. Separácia môže prebiehať za použitia izokratickej (zloženie mobilnej fázy je rovnaké) alebo gradientovej elúcie (zloženie mobilnej fázy sa mení). Separácia môže prebiehať na fázach, ktoré majú normálne umiestnenie (polárna stacionárna fáza a mobilná fáza s nižšou polaritou) alebo na systéme s reverznými fázami (polárna mobilná fáza a stacionárna fáza nepolárneho charakteru).

Systém HPLC sa skladá z viacerých funkčne prepojených častí a sú schematicky znázornené na Obr. 2. Zásobníky mobilných fáz sú sklenené fľaše, ktoré slúžia na uchovávanie mobilných fáz a pomocou kapilár ich spája s ďalšími časťami prístroja. Aby sa zamedzilo bublinkám v systéme, je potrebné mobilnú fázu pred HPLC analýzou odplyniť pomocou odplyňovača, pre ktorý je zaužívaný aj pojem degaser. Vysokotlakové čerpadlo zaisťuje pohyb mobilnej fázy v chromatografickom systéme. Pomocou zmiešavača dochádza k zmiešaniu zložiek mobilnej fázy. Úlohou automatického dávkovača vzorky (autosampler) je dávkovanie presného množstva vzorky na kolónu. Separácia látok prebieha na chromatografickej kolóne umiestnenej v termostate. Za kolónou je umiestnený detektor, kde prebieha detekcia analyzovaných látok. Zaznamenáva rozdiel signálu medzi prechodom čistej mobilnej fázy a mobilnej fázy, ktorá obsahuje analyt. Počítač ovláda celý proces analýzy a zaznamenáva dáta pre následné vyhodnotenie. Do nádoby na zber odpadu steká mobilná fáza, ktorá prešla systémom [23].





Obrázok 2: Schéma chromatografického systému [24]

### Ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia

Ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia si zachováva princípy HPLC metódy a zároveň zlepšuje chromatografický výkon. Využíva kolóny s veľkosťou častíc menších než 2  $\mu\text{m}$  a prístrojové vybavenie, ktoré pracuje pri vyšších tlakoch ako tie, ktoré sa používajú pri HPLC systéme. Takisto sa používajú aj kolóny s menšími rozmermi, zvyčajne s priemerom kolóny okolo 2,1 mm. To prispieva k získaniu vysokej separačnej účinnosti, zvýšeniu rozlíšenia, citlivosti a rýchlosti analýzy. Medzi ďalšie výhody patrí aj menšia spotreba rozpúšťadiel a nižšie prevádzkové náklady. Nevýhodou v UHPLC systéme môže byť vyšší spätný tlak, obstarávacie náklady na inštrumentáciu, väčšia údržba systému a prenos metód medzi laboratóriami a z HPLC na UHPLC metódu [23, 25].

### 3.4 Prehľad podmienok separácie fenolických látok z rastlinného materiálu

Tabuľka 2: Prehľad podmienok separácie fenolických látok v predchádzajúcich štúdiách

stanovované látky	materiál	úprava vzorky	typ kolóny	mobilné fázy	detekcia	dĺžka analýzy (min)	zdroj
kyselina chlorogénová, gallová, rutín, hyperozid, hirsutrín, florizín, arbutín, kvercitrín	jablká, hrušky	ultrazvuk (70% metanol)	LiChrospher® 100 C18 (250 × 4 mm; 5 µm)	(A) 1% kyselina mravčia vo vode (B) ACN	DAD	25	[26]
kyselina nechlorogénová, chlorogénová, katechín, rutín, epikatechín, hyperozid, hirsutrín, kyanidín-3-O-galaktozid, peonidín-3-O-galaktozid, izorhamnetín	hrušky	ultrazvuk (metanol okyslený 0,01% kyselinou octovou)	LiChrospher® 100 C18 (dĺžka a priemer kolóny neuvedené; 5 µm)	(A) 1% kyselina mravčia vo vode (B) ACN	DAD	52	[27]
arbutín, rutín, kyselina gallová, chlorogénová, vanilová, p-kumarová, ferulová, ursolová, oleanolová, katechín, epikatechín	hrušky	ultrazvuk (60% metanol vo vode)	Kromasil® 100 C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm)	(A) 0,5% kyselina octová vo vode (B) ACN	DAD	86	[28]
arbutín, rutín, epikatechín, katechín, kyselina chlorogénová, gallová, vanilová, p-kumarová, ferulová, oleanolová, ursolová	hrušky	ultrazvuk (60% metanol vo vode)	Kromasil® 100 C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm)	(A) 0,5% kyselina octová vo vode (B) 1% kyselina mravčia v ACN	DAD	86	[29]

kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kávová, p-kumarová, ferulová, chlorogénová, arbutín, katechín, epikatechín, kvercetín, floretín, florizín, prokyanidín B1 a B2, reynoutrín	jablkové a hruškové šťavy, hrušky	70% acetón vo vode	Aqua® 125 C18 (250 × 4,6 mm; 5 µm)	(A) 2% kyselina octová vo vode (B) 0,5% kyselina octová v 50% ACN vo vode	MS	65	[30]
kyselina chlorogénová, kaftarová, kávová, p-kumarová, ferulová, kryptochlorogénová, gentisová, ellagová, 4-hydroxybenzoová, gallová, homovanilová, sinapová, nechlorogénová, protokatechová, apigenín, arbutín, epikatechín, katechín, kuromanín, kyanidín, kyanidín-3-rutinozid, fisetín, epigallokatechín, etylgallát, morín, izorhamnetín, kaempferol, piceid, myricetín, prokyanidín B1, rutín, hyperozid, hirsutrín, kvercitrín, t-resveratrol, taxifolín, tyrozol	hrušky	ultrazvuk (DMSO)	Kinetex® 100 C18 (100 × 4,6 mm; 2,6 µm)	(A) 0,1% kyselina mravčia vo vode (B) metanol	DAD	35	[31]

V Tab. 2 sú uvedené predchádzajúce štúdie, ktoré porovnávajú separáciu fenolických látok v hruškách. V niektorých prípadoch boli použité s hruškami ako rastlinný materiál aj jablká. Skoro vo všetkých prípadoch boli vzorky extrahované v ultrazvukovom kúpeli. Ako stacionárna fáza bola vo všetkých štúdiách použitá kolóna s C<sub>18</sub> a veľkosťou pórov 100 a 125 Å. Vo všetkých štúdiách, okrem poslednej, sú použité kolóny s plne poréznymi časticami a dĺžkou 250 mm. Posledná štúdia použila kolónu Kinetex® s povrchovo poréznymi časticami, ktorá má menšiu dĺžku (100 mm) a veľkosť častíc (2,6 µm). Podľa priemeru kolóny od 4 mm a vyššie a zároveň veľkosti častíc 5 µm sa dá usudzovať, že okrem poslednej štúdie sa jedná skôr o HPLC než UHPLC metódu. Mobilná fáza sa skladá z kyseliny mravčej alebo octovej v rôznej koncentrácii vo vode spolu s acetonitrilom, prípadne metanolom. Najčastejšie využívaným detektorom je DAD, a takisto sa používa aj hmotnostný spektrometer. Väčšina analýz trvá desiatky minút v závislosti od počtu stanovovaných látok a typu detekcie.

## 4 Experimentálna časť

### 4.1 Použité prístroje a pomôcky

Príprava vzorky

- mixér Sencor (Sencor, Česká republika)

Príprava štandardov a úprava extraktov

- analytické váhy (Sartorius, Nemecko)
- digitálny ultrazvukový kúpeľ DU-32 (Argo Lab, Taliansko)
- rotačná vákuová odparka Concentrator plus 5305 (Eppendorf, Česká republika)
- trepačka TS-100 (Biosan, Česká republika)
- centrifúga MPW 260R (MPW, Poľsko)

pH meter Schott (Schott, Nemecko)

UHPLC

- Empower vyhodnocovací softvér (Waters, USA)
- Acquity UPLC systém (Waters, USA) – čerpadlo, automatický dávkovač, kolónový termostat
- chromatografické kolóny:
  - YMC-Triart C18 ExRS (150 x 3,0 mm; 1,9  $\mu\text{m}$ ) (YMC, Japonsko)
  - Luna® Omega Polar C18 100 (150 x 2,1 mm; 1,6  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, USA)
  - Kinetex® Polar C18 100 Å (150 x 3,0 mm; 2,6  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, USA)

Bežné laboratórne sklo a pomôcky

### 4.2 Použité chemikálie

- ultračistá voda pripravená na Farmaceutickej fakulte v Hradci Králové prístrojom Milli-Q Direct Water Purification System (Merck spol. s.r.o., Česká republika)
- etanol absolútny  $\geq 99,7\%$  (VWR International s.r.o., Česká republika)
- metanol  $\geq 99,9\%$  HiPerSolv CHROMANORM®, HPLC – ULTRA LC-MS (Merck KGaA, Česká republika)
- kyselina mravčia  $\geq 99\%$ , LC-MS (Merck KGaA, Česká republika)
- kyselina octová  $\geq 99\%$  (Penta s.r.o., Česká republika)
- acetonitril RS  $\geq 99,95\%$  LC/MS (CARLO ERBA Reagents S.A.S.)

### 4.3 Štandardy

- arbutín ≥98 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- kyselina chlorogénová ≥95 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- kyselina neochlorogénová ≥95 % (PhytoLab, Nemecko)
- kyselina kryptochlorogénová ≥98 % (PhytoLab, Nemecko)
- kyselina kávová ≥97 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- katechín ≥96 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- epikatechín ≥90 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- cynarín ≥98 % (PhytoLab, Nemecko)
- kyselina izochlorogénová A ≥95 % (PhytoLab, Nemecko)
- rutín hydrát ≥94 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- hyperozid ≥98,35 % (MedChemExpress, USA)
- hirsutrín ≥90,1 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- reynoutrín ≥97 % (MedChemExpress, USA)
- guajaverín ≥99,3 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- kvercetín ≥95 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)
- kvercitrín hydrát ≥97 % (Sigma-Aldrich, Česká republika)

### 4.4 Príprava roztokov

#### Príprava riediaceho roztoku

Zloženie riediaceho roztoku bolo 60:40 MeOH:H<sub>2</sub>O (v/v) s prídavkom 0,1% (v/v) kyseliny mravčej, ktorá je potrebná kvôli stabilite fenolických látok. Tento riediaci roztok bol použitý na prípravu a riedenie štandardov a na rekonštitúciu odparených extraktov.

#### Príprava zásobných štandardov

Z každého štandardu bolo navážené približne 0,25 mg. Navážka bola rozpustená v príslušnom objeme riediaceho roztoku na koncentráciu 0,25 mg/ml. Kvôli dokonalému rozpusteniu bola použitá trepačka. K rozpusteniu niektorých štandardov (rutín, kvercetín, hirsutrín a reynoutrín) bolo potrebné použiť aj ultrazvukový kúpeľ po dobu 15 minút. Všetky štandardy boli uchovávané v tme pri teplote 4 °C.

### **Príprava zmesného štandardu**

Zmesný štandard mal koncentráciu 5 µg/ml. Bol pripravený tak, že z každého zásobného štandardu bolo do vialky napipetované množstvo 20 µl a objem bol doplnený na 1 ml riediacim roztokom. Tento štandard bol taktiež uchovávaný v tme pri teplote 4 °C.

### **Príprava štandardov na kalibračnú závislosť**

Zriedením zásobných štandardov boli pripravené roztoky s následnou koncentráciou: 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 15; 20 a 25 µg/ml. Každá koncentrácia bola nastrieknutá trikrát a z nameraných hodnôt bola pre každú látku vytvorená kalibračná závislosť.

### **Príprava mobilnej fázy pre UHPLC**

Na UHPLC separáciu bola použitá ako vodná zložka mobilnej fázy ultračistá voda okyslená kyselinou octovou na pH 2,8. Ako organická zložka mobilnej fázy bol použitý acetonitril.

V rámci optimalizácie sa skúšala aj vodná zložka mobilnej fázy, ktorá pozostávala z ultračistej vody s 0,1% prídavkom kyseliny mravčej.

### **Príprava extrakčných rozpúšťadiel**

Najprv boli pripravené: etanol, metanol a ultračistá voda s prídavkom 0,1% (v/v) kyseliny mravčej. Následne boli zmiešané v danom pomere etanol, prípadne metanol s vodou, aby výsledná koncentrácia extrakčných rozpúšťadiel bola 0, 20, 40, 60, 80 a 100% etanolu, prípadne metanolu vo vode. Tieto extrakčné roztoky boli uchovávané v tme pri teplote 4 °C.

## **4.5 Príprava extraktov**

Príprava extraktov prebiehala tak, že bolo navážené 0,05 g z rozmixovaných listov hrušiek a pridaním 2 ml extrakčného rozpúšťadla. Extrakcia prebiehala v ultrazvukovom kúpeli počas 30-tich minút. Nasledovala centrifugácia pri 4341 G a 4 °C po dobu 10 minút. Supernatant bol prefiltrovaný cez PTFE filter s veľkosťou pórov 0,22 µm. Následne bol 1 ml odparený na rotačnej vákuovej odparke pri teplote 45 °C do sucha a rozpustený v 1 ml riediaceho roztoku. Extrakty boli uchovávané v mrazničke.

#### 4.6 Podmienky chromatografickej separácie

Chromatografická separácia fenolických látok prebiehala na UPLC systéme Acquity. Pri vývoji analytickej metódy bol používaný zmesný štandard s koncentráciou látok 5 µg/ml. Dávkovaný objem vzorky bol vždy 2 µl. Počas optimalizácie UHPLC-DAD metódy boli testované 3 druhy kolóny: YMC-Triart C18 ExRS (150 x 3,0 mm; 1,9 µm), Luna® Omega Polar C18 100 (150 x 2,1 mm; 1,6 µm) a Kinetex® Polar C18 100 Å (150 x 3,0 mm; 2,6 µm).

Kolóny YMC-Triart využívajú hybridnú stacionárnu fázu, ktorá je kombináciou anorganického silikagelu a organického polyméru. Touto kombináciou sa získajú výhodné vlastnosti oboch zložiek: zvýšená separačná účinnosť a mechanická odolnosť (silikagel) a chemická a termálna stabilita (organický polymér). Vyznačuje sa výbornou selektivitou pre izoméry a štruktúrne analógy. Konkrétne pre našu zvolenú kolónu je zaistená stabilita v rozsahu pH 1 – 12 a odoláva teplote až 90 °C. Kolóna Luna® Omega Polar s chemicky viazanými alkylovými reťazcami sa skladá z plne poréznych častíc. Najrozšírenejšou stacionárnou fázou je oktadecyl (alkyl C<sub>18</sub>) viazaný na silikagel (oktadecylsilikagel). Jeho alternatívou je C<sub>8</sub> (oktyl), prípadne sú vyrábané aj stacionárne fázy s alkylmi C<sub>6</sub> alebo C<sub>4</sub> s väčšou veľkosťou pórov, ktoré sa používajú pri analýze biomolekúl. Využívajú sa na analýzu polárnych aj nepolárnych látok, takisto aj vysoko polárnych zlúčenín. Táto konkrétna kolóna má obmedzenú stabilitu pri pH 1,5 – 8,5 a teplote do 60 °C, ale je zabezpečená 100% vodná stabilita kvôli patentovanej technológii. Číslo 100 v názve kolóny označuje veľkosť pórov (100 Å). Jednotka ångström (Å; 1 Å = 0,1 nm) označuje priemernú hodnotu veľkosti pórov. Čím je menší priemer kolóny, tým sa dosahuje väčšia citlivosť detekcie, píky sú užšie a spotreba rozpúšťadiel je nižšia. Kolóna Kinetex® je tvorená neporéznym jadrom a vrstvou porézneho silikagelu, ktorá sa označuje ako kolóna naplnená povrchovo poréznymi časticami. Výhodou tohto typu kolóny je vyššia účinnosť separácie a rýchlosť analýzy s miernejším nárastom spätného tlaku v systéme, vďaka čomu sa môžu využívať vyššie prietoky mobilnej fázy. Používa sa pri analýze malých molekúl (napr. liečivá, farbivá, potravinové aditíva, ...), ale takisto aj pri analýze biopolymérov (napr. proteíny, peptidy, monoklonálne protilátky) [23, 32 - 35].

Teplota autosampléru bola nastavená na 6 °C a teplota na kolóne na 30 °C, v niektorých prípadoch bola testovaná aj teplota kolóny s 35 °C. Skúšaná prietoková rýchlosť bola 0,3 – 0,6 ml/min v závislosti od rozmerov kolóny a veľkosti častíc. Medzi mobilné fázy, ktoré boli testované patrí acetonitril spolu s ultračistou vodou s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej, prípadne s ultračistou vodou okyslenou na pH 2,8 pomocou kyseliny octovej. Namiesto



acetonitrilu sa v niektorých gradientoch použil acetonitril s 10% metanolom. Počas vývoja UHPLC metódy prebiehala detekcia pomocou DAD detektora pri 280 nm. Rôzne profily gradientovej elúcie, ktoré boli testované, budú popísané nižšie. Na začiatku optimalizácie metódy bol zvolený lineárny gradient, ktorý bude taktiež popísaný nižšie. Pri vývoji metódy sa vychádzalo z poznatkov, ktoré boli popísané v predchádzajúcich experimentoch [36 - 39].

#### 4.7 Validácia chromatografickej metódy

Validácia je proces na potvrdenie, že analytické zariadenie, metóda alebo systém sú vhodné na zamýšľané použitie a získané výsledky sú spoľahlivé. Výsledkom úspešného ukončenia validácie je metóda, ktorú možno spoľahlivo použiť na charakterizáciu skutočných vzoriek [40].

Ako test spôsobilosti systému (SST) sa označuje postup validácie analytického systému, ktorý kombinuje analytickú metódu a výkonnosť prístroja. Jeho cieľom je posúdiť, či chromatograf alebo jeho časti fungujú tak, ako sa vyžaduje a môžu generovať výsledky s prijateľnou presnosťou. SST zahŕňa opakovateľnosť retenčného času a plôch pík, rozlíšenie, faktor symetrie, píkovej kapacity a retenčný faktor [40].

**Retenčný čas ( $t_R$ )** je doba, ktorá uplynie od nástreku vzorky do dosiahnutia maxima vrcholu píku. Je kvalitatívnou charakteristikou látky, a teda sa používa na potvrdenie identity danej látky [23].

**Rozlíšenie ( $R_s$ )** je bezrozmerná veličina, ktorá určuje mieru separácie dvoch susedných pík (pík 1 a 2). Rozlíšenie by malo nadobúdať hodnoty väčšie než 1,5 a definuje sa pomocou rovnice [23]:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_1 + w_2}{2}}$$

$t_{R1}$  a  $t_{R2}$  = retenčné časy látok;  $w_1$  a  $w_2$  = šírky pík na úrovni základnej línie

**Faktor symetrie ( $A_s$ )** popisuje tvar chromatografického píku. Ideálna hodnota je rovná 1 a nemala by byť väčšia ako 2. Pri hodnote väčšej ako 1 dochádza k chvostovaniu píku a naopak, hodnoty menšie ako 1 zas označujú frontovanie píku. Jeho výpočet je znázornený v rovnici [23]:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

$w_{0,05}$  = šírka píku v 5 % jeho výšky;  $f$  = vzostupná časť píku v 5 % výšky píku

**Píková kapacita ( $P_c$ )** je definovaná ako počet píkov, ktoré môžu byť rozlíšené v určitom časovom úseku tak, aby všetky látky boli rozdelené na základnú líniu. Vypočíta sa pomocou rovnice [23]:

$$P_c = 1 + \frac{t_g}{w_g}$$

$t_g$  = dĺžka gradientu;  $w_g$  = šírka píku na základnej línii

Podľa toho, ako veľmi sú delené látky zachytené na kolóne, definuje **retenčný faktor ( $k$ )**. Narastá s rastúcim retenčným časom a doporučená hodnota je väčšia ako 2. Na jeho výpočet sa používa rovnica [23]:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$t_R$  = retenčný čas látky;  $t_0$  = mŕtvy retenčný čas (retenčný čas zložky, ktorá nie je na kolóne zadržovaná)

**Opakovateľnosť** prebieha v jednom laboratóriu s použitím jedného zariadenia, vykonaná jedným operátorom počas krátkeho časového rozmedzia. Je vyjadrená ako % RSD, ktorá by mala dosahovať hodnoty do 1 % [23, 40].

**Linearita** je schopnosť dosahovať výsledky testov, ktoré sú priamoúmerné koncentrácii analytov vo vzorkách v rámci daného rozsahu. Hodnoty determinačných koeficientov by mali byť medzi 0,99 a 1,00 [40].

## 5 Výsledky a diskusia

### 5.1 Vývoj UHPLC-DAD metódy

UHPLC-DAD metóda bola pôvodne vyvíjaná pre šesťnásť fenolických látok. Zoznam týchto látok, ako aj ich poradie pík, pod ktorými sú označené v chromatogramoch, sú uvedené v Tab. 3. Katechín nebol ďalej hodnotený z dôvodu, že u tejto látky nedochádzalo k dostatočnému rozlíšeniu ( $R_s = 1,49$ ). Taktiež bolo experimentálne potvrdené, že obsah katechínu nekomplikuje integráciu podobných látok.

Počas optimalizácie metódy boli použité 3 typy kolón a ich konkrétne rozmery sú spomenuté vyššie. Na týchto kolónach bol testovaný rôzny profil gradientu, zloženie mobilnej fázy, prietoková rýchlosť a teplota. V tejto časti sú stručne popísané vybrané chromatografické podmienky, ktoré boli testované.

Tabuľka 3: Zoznam fenolických látok s číslom pík

ČÍSLO PÍKU	FENOLICKÁ LÁTKA
1	arbutín
2	kyselina neochlorogénová
3	kyselina chlorogénová
4	katechín
5	kyselina kryptochlorogénová
6	kyselina kávová
7	epikatechín
8	cynarín
9	rutín
10	hyperozid
11	hirsutrín
12	reynoutrín
13	guaijaverín
14	kyselina izochlorogénová A
15	kvercitrín
16	kvercetín

### 5.1.1 Kolóna YMC-Triart C18 ExRS

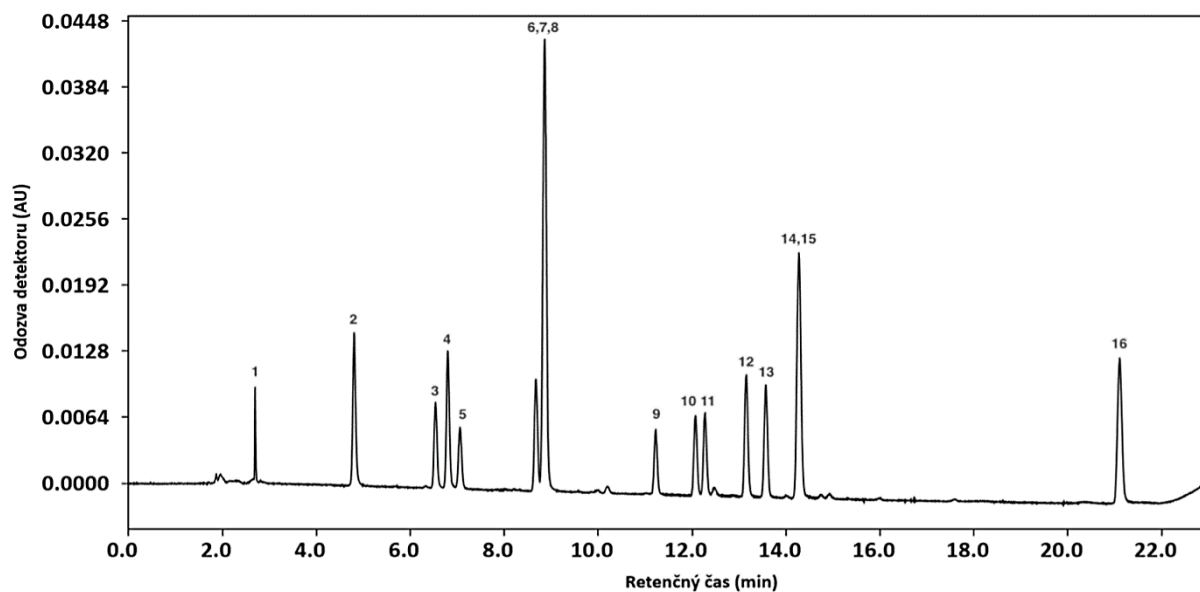
Ako prvá kolóna bola použitá YMC-Triart C18 ExRS (150 x 3,0 mm; 1,9 µm) s hybridnou stacionárnou fázou. Pri optimalizácii metódy na tejto kolóne boli testované rôzne profily gradientov, mobilné fázy (acetonitril v kombinácii s ultračistou vodou s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej a acetonitril s 10% metanolom spolu s ultračistou vodou okyslenou pomocou kyseliny octovej na pH 2,8), prietokové rýchlosti (0,3 – 0,6 ml/min) aj teploty na kolóne (30 a 35 °C).

#### Gradient 1

Na začiatku bol zvolený lineárny gradient (viď Tab. 4), prietoková rýchlosť bola nastavená na 0,3 ml/min a teplota na kolóne na 30 °C. Ako mobilná fáza bola použitá ultračistá voda s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej (A) spoločne s acetonitrilom (B). Ako je vidieť na Obr. 3, dochádzalo ku koelúcii píkovo číslo 6, 7 a 8 - kyselina kávová, epikatechín a cynarín a ďalej píkovo číslo 14 a 15 - kyselina izochlorogénová A a kvercitrín. Tieto látky nie je možné od seba rozlíšiť. Ďalšími úpravami gradientu sme sa snažili oddeliť jednotlivé píky, ktoré spolu koeluujú, a takisto aj skrátiť celkový čas analýzy.

Tabuľka 4: Gradient 1

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,0	90	10
20,0	65	35
20,2	90	10
23,0	90	10



Obrázok 3: Chromatogram separácie fenolických látok pre gradient 1 na kolóne YMC-Triart C18 ExRS (150 x 3,0 mm; 1,9  $\mu$ m), prietoková rýchlosť 0,3 ml/min, teplota na kolóne 30 °C

## Gradient 2

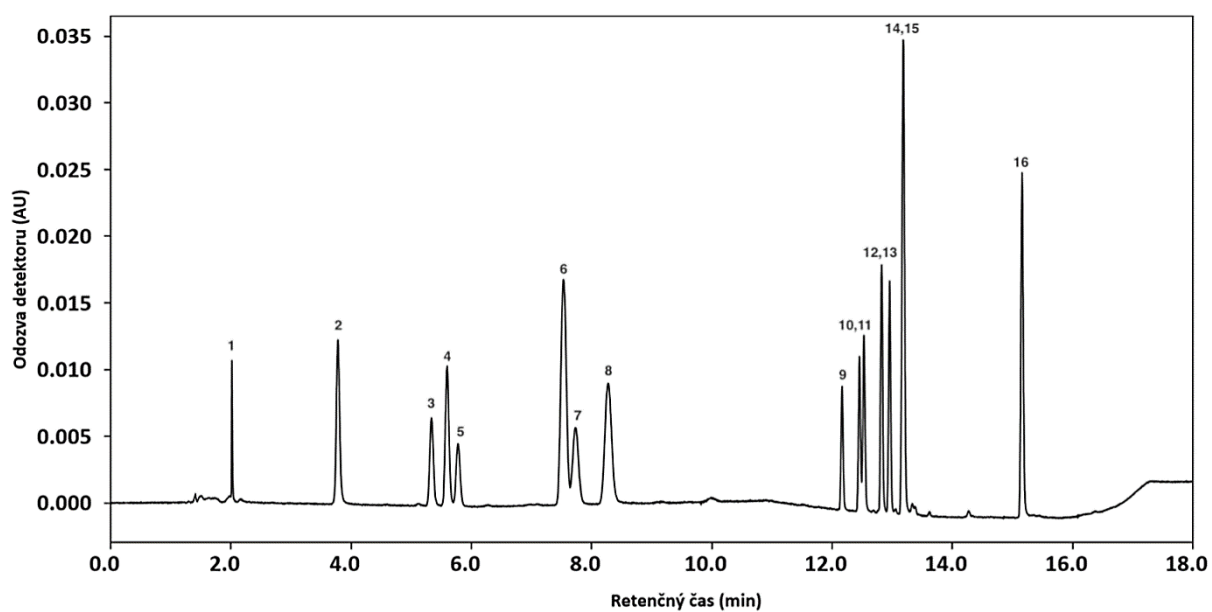
Úpravami gradientov nedochádzalo k úplnej separácii jednotlivých látok. Z toho dôvodu bolo vyskúšané na tejto kolóne zvýšenie prietoku z 0,3 na 0,4 ml/min (Obr. 4) a následne aj zvýšenie teploty na kolóne z 30 na 35 °C (môžeme vidieť na Obr. 5). Pre obe separácie bol použitý gradient, ktorý je znázornený v Tab. 5. Mobilná fáza bola rovnaká ako v Gradiente 1. Výhodou tohto gradientu je skrátenie času analýzy z 23 na 18 minút. Ako je popísané nižšie, zvýšenie prietoku a teploty nevedlo k lepšej separácii látok.

Ako vidíme na Obr. 4, došlo k čiastočnému oddeleniu píkovo číslo 6 a 7 - kyselina kávová a epikatechín a úplnému oddeleniu píku číslo 8 - cynarín. Naopak, zhoršila sa separácia látok po 12. minúte. Došlo ku koelúcii hyperozidu a hirsutrínu (píky číslo 10 a 11), a takisto sa priblížili píky číslo 12 a 13 - reynoutrín a guaijaverín. Taktiež nedošlo k zlepšeniu koelúcie látok kyseliny izochlorogénovej A a kvercitrínu (píky číslo 14 a 15).

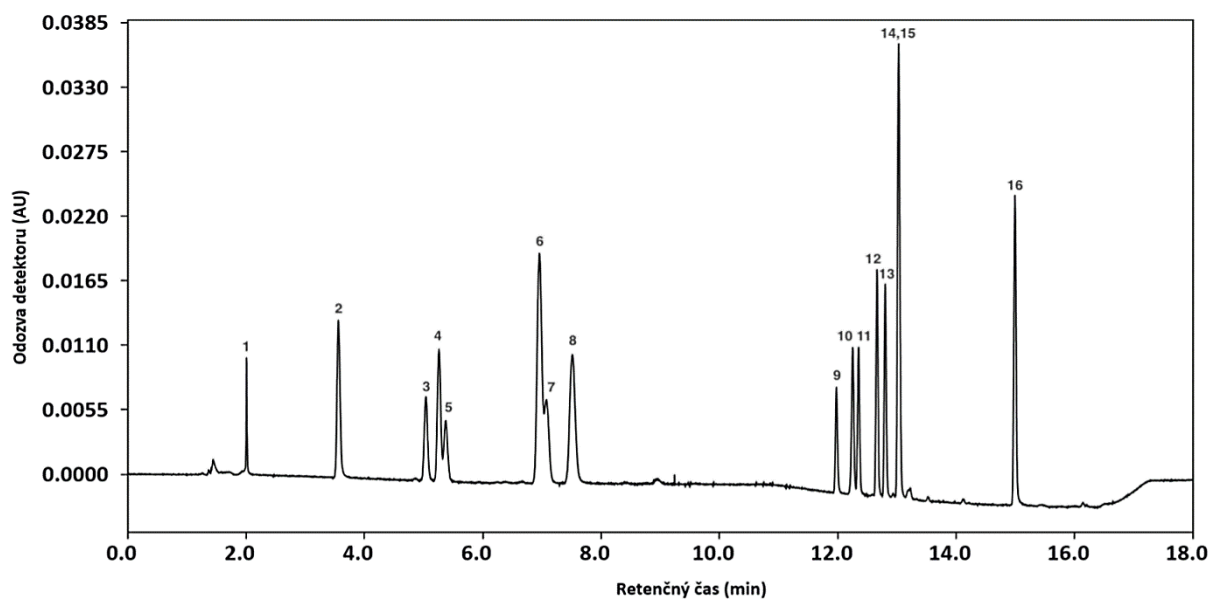
Pri prietokovej rýchlosti 0,4 ml/min a teplote na kolóne 35 °C (znázornené na Obr. 5) došlo k zhoršeniu separácie katechínu a kyseliny kryptochlorogénovej (píky číslo 4 a 5) a ďalej aj kyseliny kávovej a epikatechínu (píky číslo 6 a 7). Nedošlo ani k zlepšeniu koelúcie kyseliny izochlorogénovej A a kvercitrínu (píky číslo 14 a 15) a tieto látky stále eluujú spoločne.

Tabuľka 5: Gradient 2

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,0	90	10
4,0	85	15
9,0	85	15
15,0	50	50
15,2	90	10
18,0	90	10



Obrázok 4: Chromatogram separácie fenolických látok pre gradient 2 na kolóne YMC-Triart C18 ExRS (150 x 3,0 mm; 1,9  $\mu$ m), prietoková rýchlosť 0,4 ml/min, teplota na kolóne 30 °C



Obrázok 5: Chromatogram separácie fenolických látok pre gradient 2 na kolóne YMC-Triart C18 ExRS (150 x 3,0 mm; 1,9  $\mu$ m), prietoková rýchlosť 0,4 ml/min, teplota na kolóne 35 °C

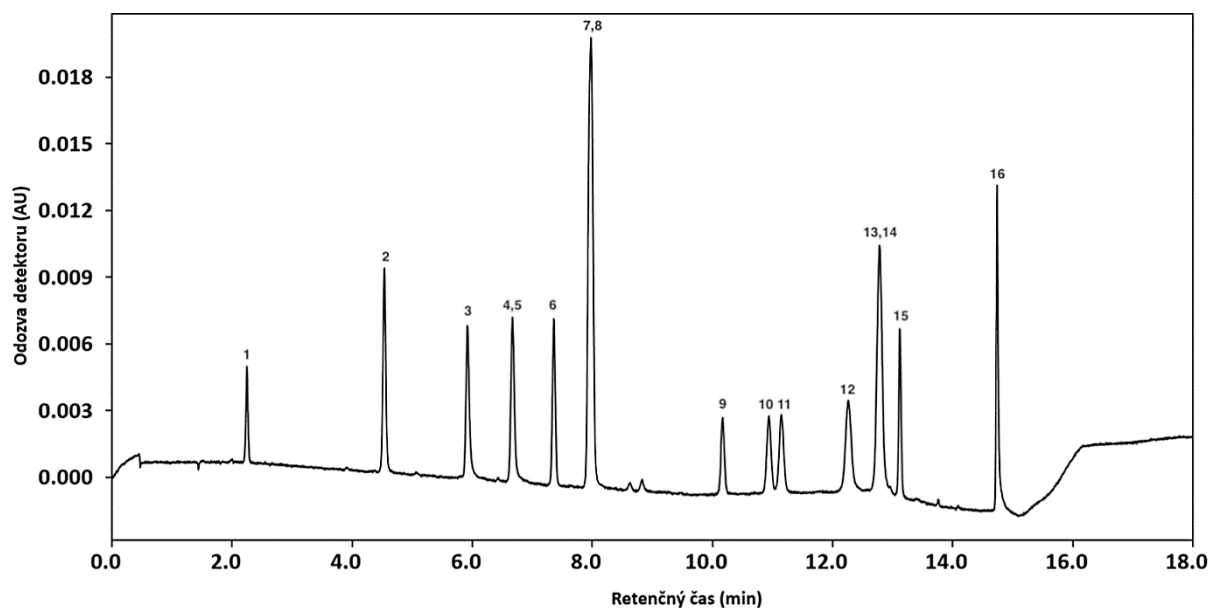
### Gradient 3

V rámci optimalizácie metódy bola na tejto kolóne vyskúšaná aj zmena mobilnej fázy, ktorá pozostávala z acetonitrilu s 10% metanolom (B) v kombinácii s ultračistou vodou, ktorá bola okyslená kyselinou octovou na pH 2,8 (A). Prietok bol nastavený na 0,6 ml/min a teplota na kolóne na 30 °C. Profil gradientu je zobrazený v Tab. 6.

Ako je vidieť na Obr. 6, došlo ku koelúcii katechínu a kyseliny kryptochlorogénovej (píky číslo 4 a 5), epikatechínu a cynarínu (píky číslo 7 a 8), a taktiež guajaverínu a kyseliny izochlorogénovej A (píky číslo 13 a 14). Celkový čas analýzy sa skrátil na 17,5 minút.

Tabuľka 6: Gradient 3

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,0	95	5
8,0	78	22
11,0	78	22
13,7	50	50
13,9	50	50
14,1	95	5
17,5	95	5



Obrázok 6: Chromatogram separácie fenolických látok pre gradient 3 na kolóne YMC-Triart C18 ExRS (150 x 3,0 mm; 1,9  $\mu\text{m}$ ), prietoková rýchlosť 0,6 ml/min, teplota na kolóne 30 °C

### 5.1.2 Kolóna Kinetex® Polar C18

Ďalšou kolónou, ktorá bola použitá, je Kinetex® Polar C18 100 Å (150 x 3,0 mm; 2,6  $\mu\text{m}$ ) s povrchovo poréznymi časticami. Na tejto kolóne bol nastavený prietok 0,6 ml/min, ktorý sa počas optimalizácie nemenil. Medzi testované parametre patrila teplota na kolóne (30 a 35 °C), zloženie mobilnej fázy (ultračistá voda s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej, prípadne okyslená na pH 2,8 kyselinou octovou spolu s acetonitrilom alebo acetonitrilom s 10% metanolom) a profily gradientov.

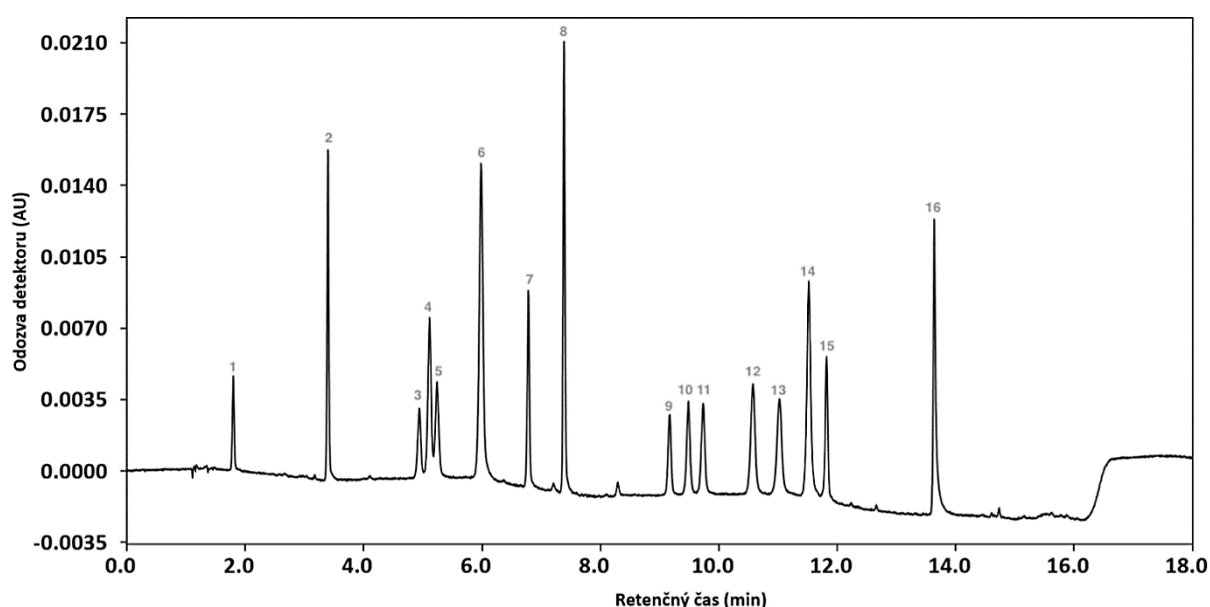
### Gradient 4

Ako mobilná fáza bola znova použitá ultračistá voda s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej (A) v kombinácii s acetonitrilom (B). Gradient, ktorý vidíme v Tab. 7 s prietokom 0,6 ml/min a teplotou kolóny 30 °C, trval 18 minút. Pri takmer všetkých látkach je dostatočná separácia jednotlivých látok, ale problémom je nedostatočná separácia pík číslo 4 a 5 - katechín a kyselina kryptochlorogénová, a takisto aj tvary niektorých pík nie sú symetrické (Obr. 7).



Tabuľka 7: Gradient 4

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,0	97	3
2,0	90	10
4,5	90	10
6,5	82	18
10,0	82	18
15,0	50	50
15,2	97	3
18,0	97	3



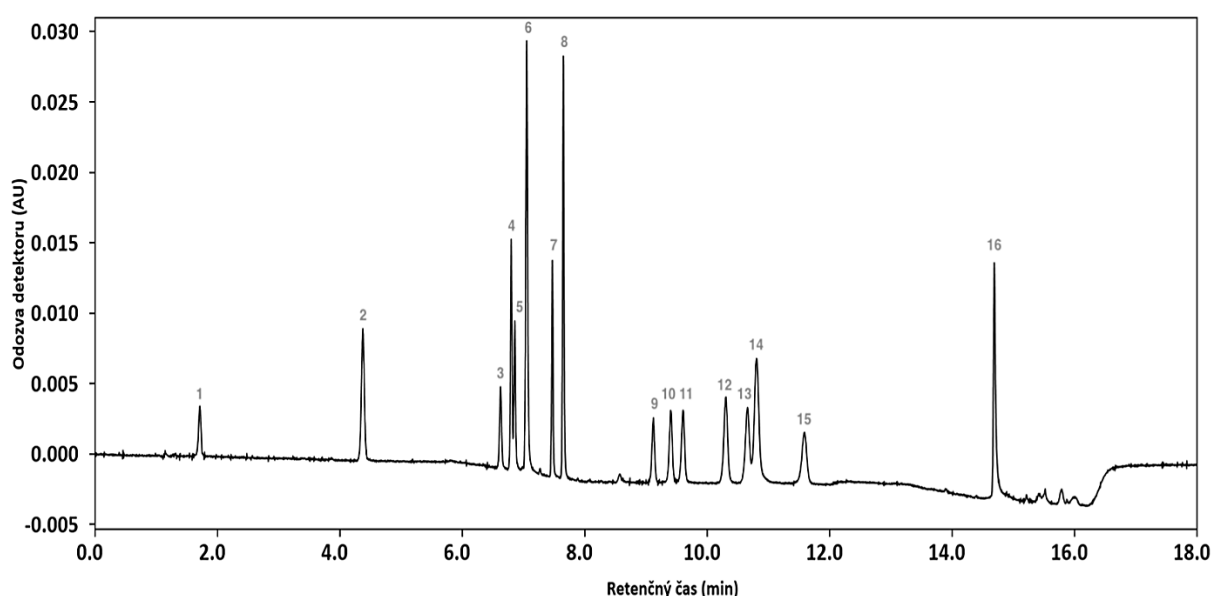
Obrázok 7: Chromatogram separácie fenolických látok pre gradient 4 na kolóne Kinetex® Polar C18 100 Å (150 x 3,0 mm; 2,6 µm), prietoková rýchlosť 0,6 ml/min, teplota na kolóne 30 °C

### Gradient 5

Došlo k zmene mobilnej fázy, ktorú tvoril acetonitril (B) v kombinácii s ultračistou vodou, ktorá bola okyslená kyselinou octovou na pH 2,8 (A). Prietok bol ponechaný na 0,6 ml/min. Teplota kolóny bola zmenená z 30 na 35 °C. Profil gradientu sa od Gradientu 4 líšil len v časových posunoch (viď Tab. 8). Na chromatograme (Obr. 8) je vidieť, že dochádza k zhoršeniu separácie píkovo číslo 4 – 8: katechín, kyselina kryptochlorogénová, kyselina kávová, epikatechín a cynarín, a taktiež aj guajaverínu a kyseliny izochlorogénovej A (píky číslo 13 a 14).

Tabuľka 8: Gradient 5

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,0	97	3
2,0	90	10
5,3	90	10
6,5	82	18
11,0	82	18
15,0	50	50
15,2	97	3
18,0	97	3



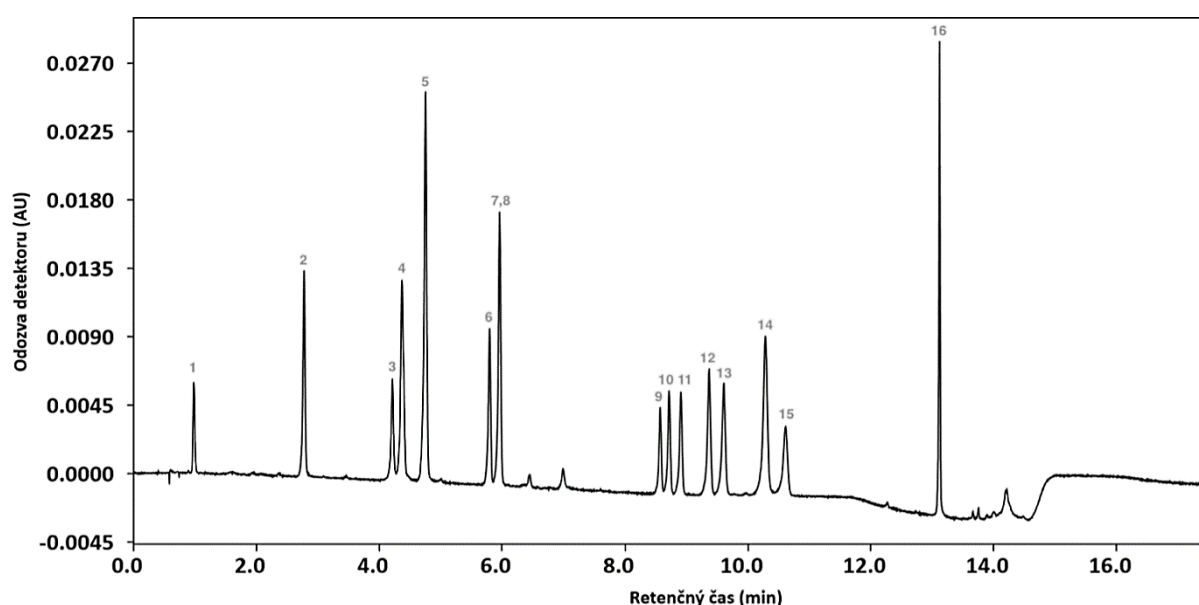
Obrázok 8: Chromatogram separácie fenolických látok pre gradient 5 na kolóne Kinetex® Polar C18 100 Å (150 x 3,0 mm; 2,6 µm), prietoková rýchlosť 0,6 ml/min, teplota na kolóne 35 °C

### Gradient 6

Na tejto kolóne bola vyskúšaná aj ďalšia mobilná fáza. Tá pozostávala z ultračistej vody okyslenej kyselinou octovou na pH 2,8 (A) v kombinácii s acetonitrilom s 10% metanolom (B). Profil gradientovej elúcie je zobrazený v Tab. 9. Celá analýza trvala 17,5 minút s prietokom 0,6 ml/min a teplotou na kolóne 30 °C. Na chromatograme (Obr. 9) je znázornená separácia látok. Môžeme vidieť, že dochádza ku koelúcii medzi epikatechínom a cynarínom (píky číslo 7 a 8).

Tabuľka 9: Gradient 6

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,0	97	3
8,0	82	18
11,0	82	18
12,8	60	40
13,7	50	50
13,9	50	50
14,1	97	3
17,5	97	3



Obrázok 9: Chromatogram separácie fenolických látok pre gradient 6 na kolóne Kinetex® Polar C18 100 Å (150 x 3,0 mm; 2,6 µm), prietoková rýchlosť 0,6 ml/min, teplota na kolóne 30 °C

### 5.1.3 Kolóna Luna® Omega Polar C18

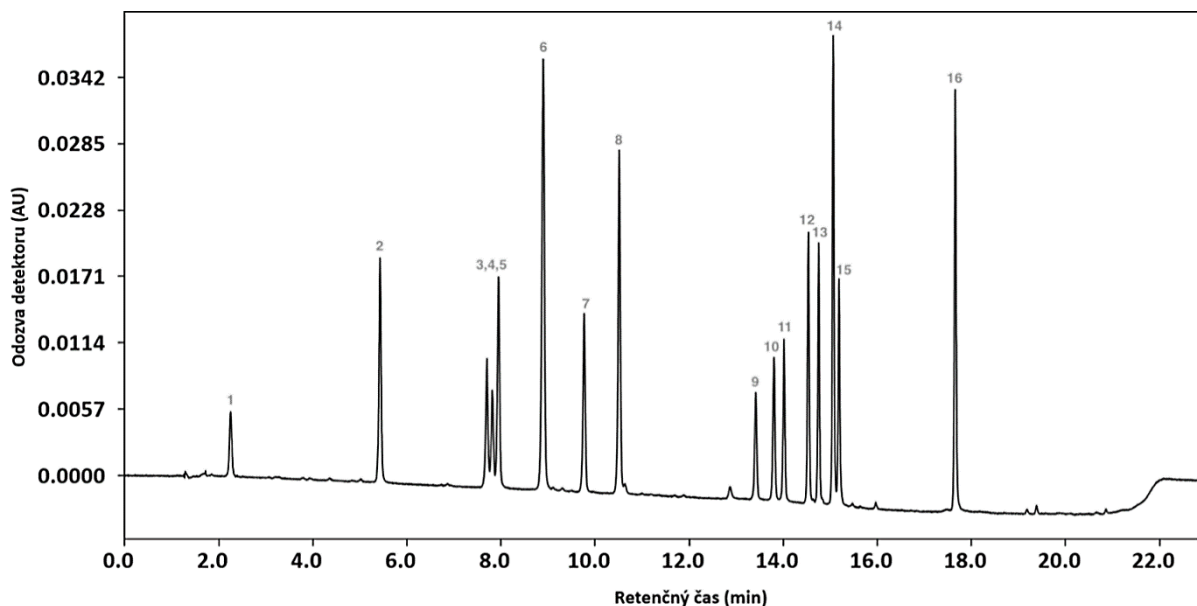
Poslednou skúšanou kolónou bola Luna® Omega Polar C18 100 (150 x 2,1 mm; 1,6 µm) s plne poréznyimi časticami. V rámci vývoja metódy boli na tejto kolóne testované rôzne mobilné fázy (ultračistá voda s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej a ultračistá voda okyslená pomocou kyseliny octovej na pH 2,8 v kombinácii s acetonitrilom, prípadne acetonitrilom s 10% metanolom), profily gradientov, a takisto aj teplota kolóny (30 a 35 °C). Prietoková rýchlosť sa na tejto kolóne nemenila a zostala nastavená na 0,3 ml/min.

## Gradient 7

Najprv bola použitá ako mobilná fáza acetonitril (B) v kombinácii s ultračistou vodou s prídavkom 0,1% kyseliny mravčej (A) a teplota kolóny bola nastavená na 30 °C. Profil gradientu je zobrazený v Tab. 10. Celkový čas analýzy trval 23 minút. Z chromatogramu na Obr. 10 vyplýva, že nedochádza k úplnej separácii píkov číslo 3, 4 a 5 - kyselina chlorogénová, katechín a kyselina kryptochlorogénová, a takisto aj píkov číslo 14 a 15 - kyselina izochlorogénová A a kvercitrín. Ďalšími úpravami sme sa snažili okrem iného aj skrátiť celkový čas analýzy.

Tabuľka 10: Gradient 7

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,0	95	5
4,0	90	10
12,0	80	20
20,0	50	50
20,2	95	5
23,0	95	5



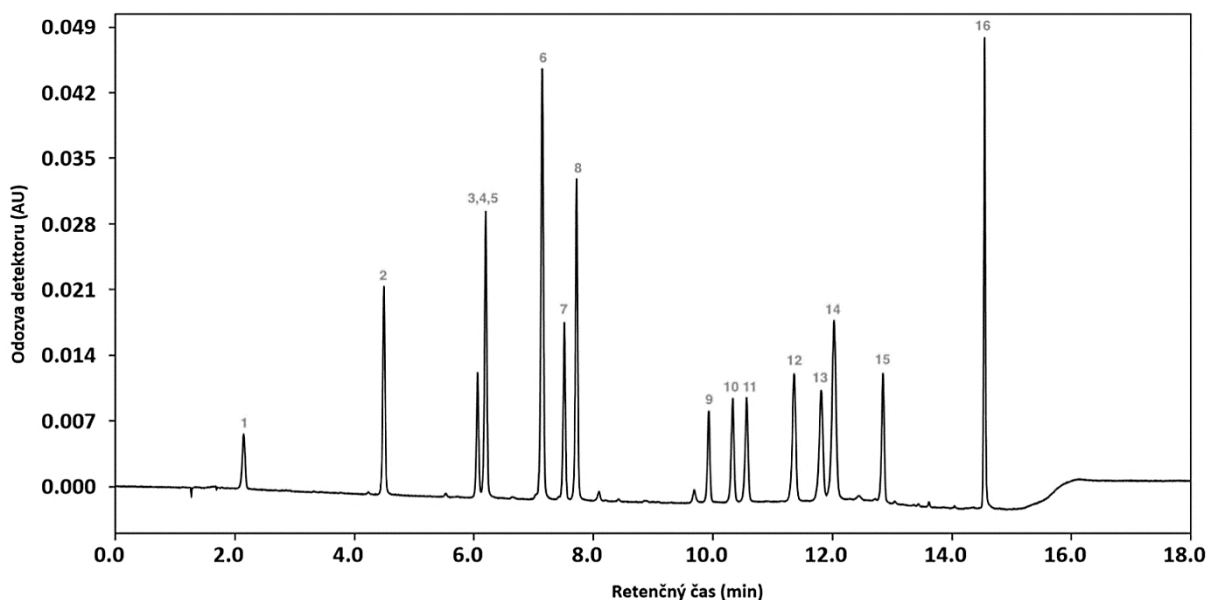
Obrázok 10: Chromatogram separácie fenolických látok pre gradient 7 na kolóne Luna® Omega Polar C18 100 (150 x 2,1 mm; 1,6 µm), prietoková rýchlosť 0,3 ml/min, teplota na kolóne 30 °C

## Gradient 8

Následne bola zmenená mobilná fáza a profil gradientu, ktorý sa nám podarilo skrátiť na 17,5 minút (viď Tab. 11). Mobilnú fázu tvoril acetonitril s 10% metanolom (B) v kombinácii s ultračistou vodou, ktorá bola okyslená na pH 2,8 pomocou kyseliny octovej (A). Prietoková rýchlosť 0,3 ml/min, ako aj teplota kolóny 30 °C zostali nezmenené. Z chromatogramu na Obr. 11 vyplýva, že dochádza ku koelúcii katechínu a kyseliny kryptochlorogénovej (píky číslo 4 a 5).

Tabuľka 11: Gradient 8

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,0	95	5
8,0	78	22
11,0	78	22
12,8	60	40
13,7	50	50
13,9	50	50
14,1	95	5
17,5	95	5



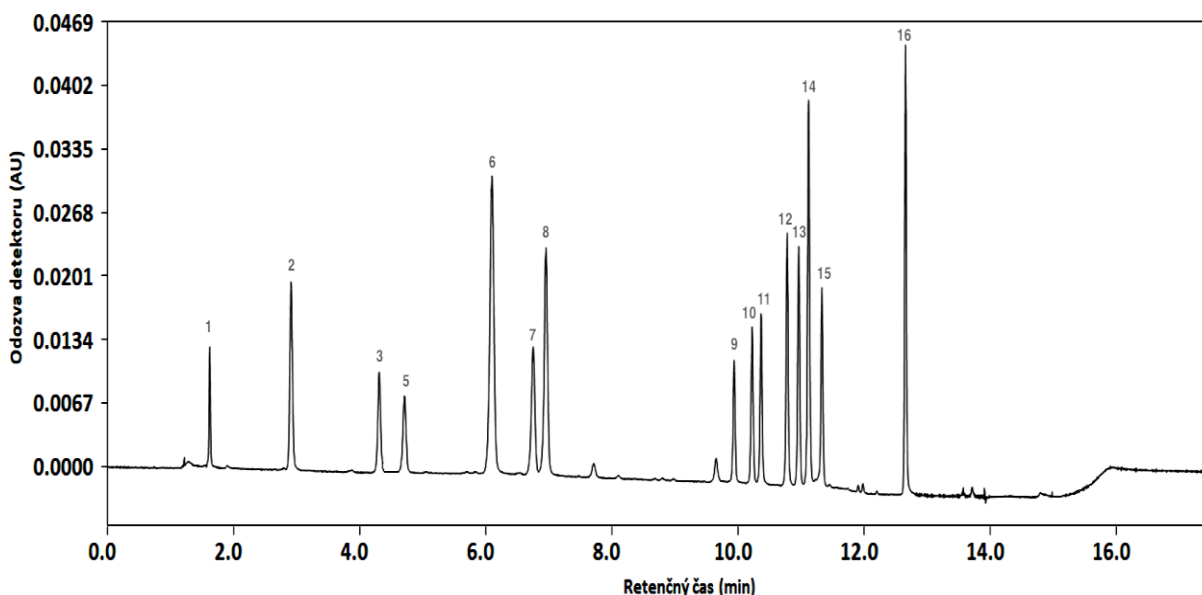
Obrázok 11: Chromatogram separácie fenolických látok pre gradient 8 na kolóne Luna® Omega Polar C18 100 (150 x 2,1 mm; 1,6 µm), prietoková rýchlosť 0,3 ml/min, teplota na kolóne 30 °C

## Gradient 9

Ako najoptimálnejšie zvolená mobilná fáza bola vybraná ultračistá voda okyslená kyselinou octovou na pH 2,8 (A) v kombinácii s acetonitrilom (B). V Tab. 12 je popísaný profil gradientu. Celkový čas analýzy trval 17,5 minút, prietoková rýchlosť bola nastavená na 0,3 ml/min a teplota kolóny na 30 °C. Ako je vidieť na Obr. 12, došlo k separácii všetkých látok a tvary píkov sú optimálne aj z hľadiska symetrie.

Tabuľka 12: Gradient 9

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,0	90	10
2,5	87	13
4,5	87	13
8,0	80	20
10,2	72	28
10,7	60	40
13,7	50	50
13,9	50	50
14,1	90	10
17,5	90	10



Obrázok 12: Chromatogram separácie fenolických látok pre gradient 9 na kolóne Luna® Omega Polar C18 100 (150 x 2,1 mm; 1,6 µm), prietoková rýchlosť 0,3 ml/min, teplota na kolóne 30 °C

Ďalšími úpravami gradientu na všetkých troch použitých kolónach nedošlo k zlepšeniu separácie, z toho dôvodu sa na meranie obsahu fenolických látok v extraktoch zvolil gradient 9, ktorý prebiehal na kolóne Luna® Omega Polar C18 100 (150 x 2,1 mm; 1,6 µm).

## 5.2 Optimalizované podmienky UHPLC-DAD metódy

Chromatografický systém: UPLC systém Acquity

Kolóna: Luna® Omega Polar C18 100 (150 x 2,1 mm; 1,6 µm)

Dávkovaný objem vzorky: 2 µl

Mobilná fáza A: ultračistá voda okyslená kyselinou octovou na pH 2,8

Mobilná fáza B: acetonitril

Prietok: 0,3 ml/min

Gradientová elúcia: vid' Tab. 13

Tabuľka 13: Gradientová elúcia optimalizovanej UHPLC-DAD separácie

čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0,0	90	10
2,5	87	13
4,5	87	13
8,0	80	20
10,2	72	28
10,7	60	40
13,7	50	50
13,9	50	50
14,1	90	10
17,5	90	10

Teplota kolóny: 30 °C

Teplota autosampléru: 6 °C

Detekcia: Diode Array detektor (DAD, detektor diódového poľa)

Detekcia prebiehala na vybraných vlnových dĺžkach:

254 nm: hirsutrín, hyperozid, guajjaverín, kvercitrín, reynoutrín

280 nm: arbutín, epikatechín

320 nm: kyselina chlorogénová, kyselina neochlorogénová, kyselina kryptochlorogénová, kyselina kávová, cynarín, kyselina izochlorogénová A

365 nm: kvercetín, rutín



### 5.3 Výsledky testu vhodnosti chromatografického systému

Medzi parametre, ktoré patria medzi SST, radíme opakovateľnosť retenčného času ( $t_R$ ) a plochy pod píkom, rozlíšenie chromatografických píkov ( $R_s$ ), faktor symetrie chromatografických píkov ( $A_s$ ), píkovú kapacitu ( $P_c$ ) a retenčný faktor ( $k$ ) [40].

V Tab. 14 sú uvedené parametre hodnotenia SST pre DAD detekciu pre naše testované látky. Hodnotilo sa z priemeru zo šiestich nástrekov a koncentrácia zmesného štandardu bola 5  $\mu\text{g/ml}$ . Tieto parametre boli hodnotené pri vlnovej dĺžke 280 nm.

Tabuľka 14: Hodnotenie parametrov SST

testované látky	retenčný čas (min)	rozlíšenie	faktor symetrie	píková kapacita	retenčný faktor
arbutín	1,62	10,8	0,8	191,0	0,3
kyselina neochlorogénová	2,88	22,5	1,1	112,0	1,3
kyselina chlorogénová	4,27	17,5	0,9	118,2	2,5
kyselina kryptochlorogénová	4,59	2,2	1,0	115,5	2,7
kyselina kávová	5,97	13,3	0,9	77,5	3,8
epikatechín	6,59	5,6	0,9	101,1	4,3
cynarín	6,97	3,8	0,9	93,5	4,6
rutín	9,89	37,4	0,9	133,1	7,0
hyperozid	10,17	4,7	0,9	130,6	7,2
hirsutrín	10,32	2,5	0,9	140,5	7,4
reynoutrín	10,74	7,2	0,9	117,8	7,7
guajaverín	10,92	3,2	1,0	138,0	7,9
kyselina izochlorogénová A	11,09	2,9	1,0	122,7	8,0
kvercitrín	11,29	3,5	0,9	139,9	8,2
kvercetín	12,64	-	1,0	133,9	9,3

Hodnoty faktoru symetrie sa pohybovali v blízkosti hodnoty 1, čo znamená takmer symetrický pík. Liekopisný limit faktoru symetrie nadobúda hodnoty od 0,8 do 1,5. Hodnota rozlíšenia by mala nadobúdať hodnoty vyššie než 1,5 [23, 41]. Všetky látky uvedené v Tab. 14 spĺňajú tieto požadované kritériá. Jediný problém bol s hraničnou hodnotou rozlíšenia katechínu (1,49). Z toho dôvodu bola táto látka vyradená zo separácie, a takisto nebola ďalej hodnotená.

## Opakovateľnosť

Opakovateľnosť retenčných časov a plôch píkov bola hodnotená zo zmesného štandardu s koncentráciou 5 µg/ml. Tento štandard bol zmeraný v šiestich po sebe idúcich nástrekoch. Sledoval sa retenčný čas a plocha pod píkom, z ktorých sa následne vypočítal priemer a relatívna smerodajná odchýlka pre každú testovanú látku. Opakovateľnosť bola hodnotená pri vlnových dĺžkach optimálnych pre dané látky. Vypočítané hodnoty pre jednotlivé látky sú uvedené v Tab. 15.

Tabuľka 15: Opakovateľnosť retenčných časov a plôch píkov

testované látky	retenčný čas (min) (priemerné hodnoty)	RSD (%)	plocha pod píkom (priemerné hodnoty)	RSD (%)
arbutín	1,62	0,06	13305	0,94
kyselina neochlorogénová	2,88	0,11	105619	0,13
kyselina chlorogénová	4,27	0,10	111337	0,22
kyselina kryptochlorogénová	4,59	0,09	103005	0,61
kyselina kávová	5,97	0,10	191572	0,47
epikatechín	6,59	0,10	29391	0,94
cynarín	6,97	0,09	122389	0,49
rutín	9,89	0,04	68903	0,29
hyperozid	10,17	0,03	109004	0,37
hirsutrín	10,32	0,03	106062	0,37
reynoutrín	10,74	0,02	95860	0,36
guaijaverín	10,92	0,02	124606	0,67
kyselina izochlorogénová A	11,09	0,02	123351	0,33
kvercitrín	11,29	0,02	124606	0,67
kvercetín	12,64	0,01	143265	0,49

Hodnoty relatívnych smerodajných odchýlok retenčných časov a plôch píkov by mali byť menšie než 1 % [23]. Všetky látky majú hodnoty RSD retenčných časov aj plôch píkov, ktoré spĺňajú túto podmienku.

## 5.4 Linearita

Linearita bola hodnotená pomocou kalibračných štandardov, ktorých koncentrácia bola: 0,1; 0,5; 1; 2; 5; 10; 15; 20 a 25 µg/ml. Každá koncentrácia bola zmeraná trikrát a zo získaných hodnôt bola pre každú látku vytvorená kalibračná závislosť. Linearita bola

hodnotená pri vlnových dĺžkach, ktoré sú optimálne pre dané látky. Rovnice kalibračných priamok a koeficientov determinácie pre každú látku sú zobrazené v Tab. 16.

Tabuľka 16: Rovnice kalibračných priamok a hodnoty determinačných koeficientov

testované látky	koncentrácia ( $\mu\text{g/ml}$ )	rovnica KP	$R^2$
arbutín	0,1 - 25	$y = 2195,4x + 1062,7$	0,9995
kyselina neochlorogénová	0,1 - 25	$y = 17270x - 1834,4$	0,9999
kyselina chlorogénová	0,1 - 25	$y = 17365x - 3327$	0,9988
kyselina kryptochlorogénová	0,1 - 25	$y = 16267x - 3593,8$	0,9995
kyselina kávová	0,1 - 25	$y = 38744x - 7229,2$	0,9998
epikatechín	0,1 - 25	$y = 6199,8x - 475,94$	0,9997
cynarín	0,1 - 25	$y = 18331x - 1801,3$	0,9998
rutín	0,1 - 25	$y = 11665x - 938,38$	0,9999
hyperozid	0,1 - 25	$y = 22468x - 1294,8$	0,9998
hirsutrín	0,1 - 25	$y = 18559x - 550,64$	0,9997
reynoutrín	0,1 - 25	$y = 22494x + 570,64$	0,9996
guaijaverín	0,1 - 25	$y = 20531x - 1322,3$	0,9998
kyselina izochlorogénová A	0,1 - 25	$y = 25260x - 5872,8$	0,9996
kvercitrín	0,1 - 25	$y = 23173x - 1237,8$	0,9997
kvercetín	0,1 - 25	$y = 29527x - 3307,1$	0,9997

Všetky látky majú hodnotu determinačného koeficientu, ktorá je vyhovujúca.

## 5.5 Stanovenie obsahu fenolických látok

Optimalizovaná UHPLC-DAD metóda bola použitá na stanovenie obsahu pätnástich fenolických látok v extraktoch z listov hrušiek s využitím rôznych extrakčných rozpúšťadiel. Medzi testované extrakčné rozpúšťadlá sme zaradili etanol a metanol v ultračistej vode v rôznych koncentráciách. K 0,05 g dôkladne zhomogenizovanej zmesi listov hrušiek získaných z rôznych odrôd bolo pridané extrakčné rozpúšťadlo s objemom 2 ml. Následne prebiehala extrakcia v ultrazvukovom kúpeli počas 30-tich minút, centrifugácia a filtrácia supernatantu. Úplná príprava extraktov je popísaná v kapitole 4.5 Príprava extraktov. Detekcia fenolických látok prebiehala pomocou DAD detektora na vybraných vlnových dĺžkach, ktoré sú optimálne pre dané látky. Jednotlivé fenolické látky boli identifikované na základe retenčného času štandardov týchto látok a obsah bol hodnotený pomocou plochy pod píkom.

### 5.5.1 Výber extrakčného rozpúšťadla

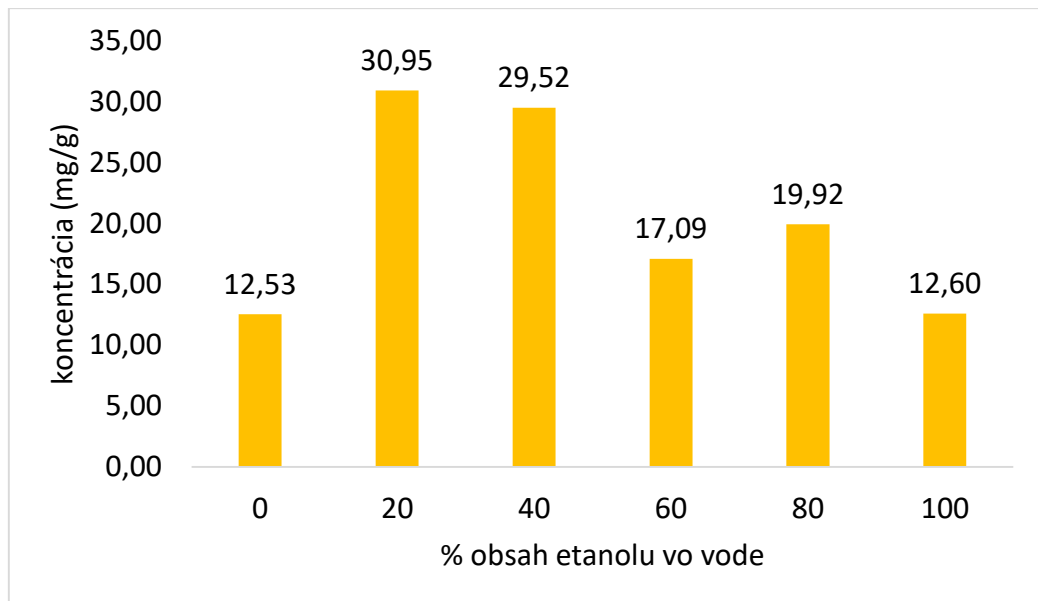
Ako skúšané extrakčné rozpúšťadlo bola použitá zmes ultračistej vody s 0, 20, 40, 60, 80 a 100% obsahom etanolu, prípadne metanolu. Na základe veľkosti plôch pík boli vypočítané koncentrácie jednotlivých fenolických látok v extraktoch.

#### Etanol

Ako prvé extrakčné rozpúšťadlo bol použitý etanol s koncentráciou 0, 20, 40, 60, 80 a 100% vo vode. Vypočítané koncentrácie analyzovaných látok v extraktoch sú uvedené v Tab. 17 pre každú látku zvlášť, aj ako súčet všetkých látok v danom pomere etanolu s vodou v miligramoch na gram vzorky. Graf 1 je znázornený pre lepšiu predstavivosť, kde sú zobrazené celkové koncentrácie fenolických látok v danej koncentrácii etanolu.

Tabuľka 17: Koncentrácia jednotlivých fenolických látok v mg/g extrahovaná extrakčným rozpúšťadlom s rôznym obsahom etanolu vo vode

analyzované látky	% EtOH	obsah fenolických látok (mg/g)					
		0	20	40	60	80	100
arbutín		5,80	13,11	11,85	6,87	8,53	6,13
kyselina neochlorogénová		0,50	1,16	1,07	0,60	0,68	0,36
kyselina chlorogénová		3,42	8,30	8,15	4,61	5,04	2,15
kyselina kryptochlorogénová		0,21	0,49	0,52	0,30	0,39	0,29
kyselina kávová		0,03	0,06	0,04	0,02	0,03	0,02
epikatechín		0,16	0,42	0,37	0,16	0,25	0,18
cynarín		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
rutín		0,47	1,24	1,12	0,67	0,70	0,44
hyperozid		0,24	0,70	0,64	0,39	0,45	0,28
hirsutrín		0,39	1,11	1,05	0,63	0,71	0,44
reynoutrín		0,18	0,52	0,54	0,33	0,31	0,17
guaijaverín		0,18	0,47	0,42	0,25	0,26	0,19
kyselina izochlorogénová A		0,72	2,74	3,17	1,90	2,20	1,70
kvercitrín		0,19	0,58	0,57	0,33	0,37	0,24
kvercetín		0,03	0,04	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>súčet</b>		<b>12,53</b>	<b>30,95</b>	<b>29,52</b>	<b>17,09</b>	<b>19,92</b>	<b>12,60</b>



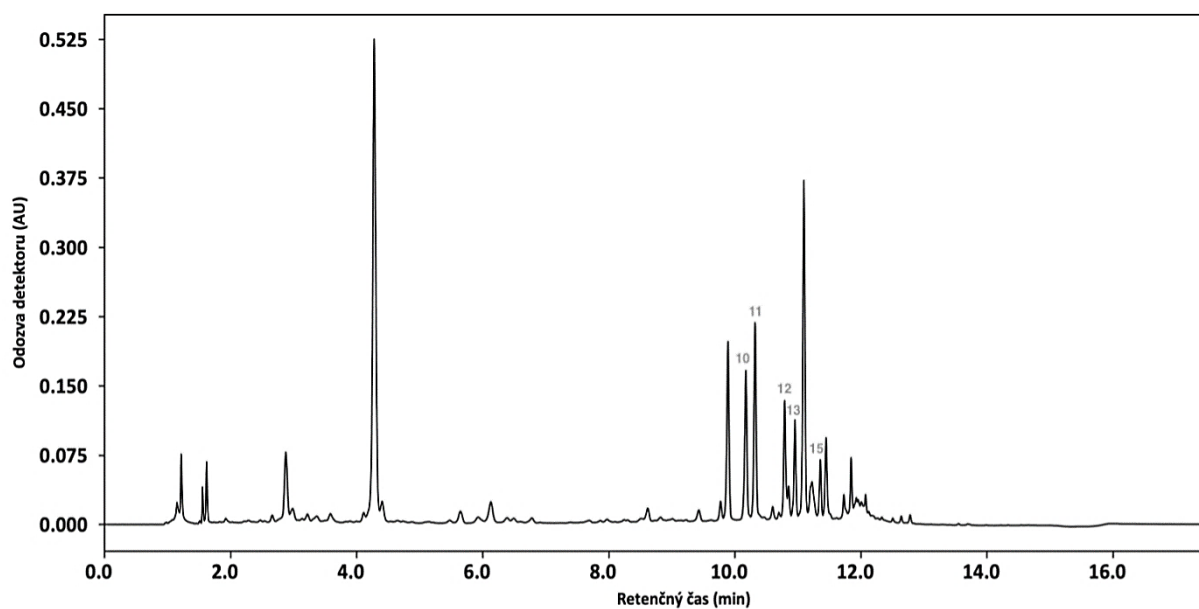
*Graf 1: Celková koncentrácia fenolických látok extrahovaných extrakčným rozpúšťadlom s rôznym obsahom etanolu vo vode*

Z výsledkov je zjavné, že najväčšie množstvo látok sa nachádza v extrakčnom rozpúšťadle s 20% etanolom vo vode s celkovou koncentráciou 30,95 mg/g. Naopak najmenej vyextrahovaných látok sme namerali pri 0 a 100% etanole vo vode. Koncentrácia fenolických látok sa pri týchto obsahoch etanolu líšila od maximálneho obsahu fenolických látok skoro o 60 %. Najväčšie zastúpenie z fenolických látok má arbutín (13,11 mg/g) a kyselina chlorogénová (8,30 mg/g) taktiež pri 20% etanole vo vode. Kyselina kryptochlorogénová, reynoutrín a kyselina izochlorogénová A vykazujú najväčšie koncentrácie pri 40% etanole vo vode. Kyselina kávová a kvercetín sa v extraktoch nachádzajú v zanedbateľnom množstve a cynarín sa nenachádza vôbec.

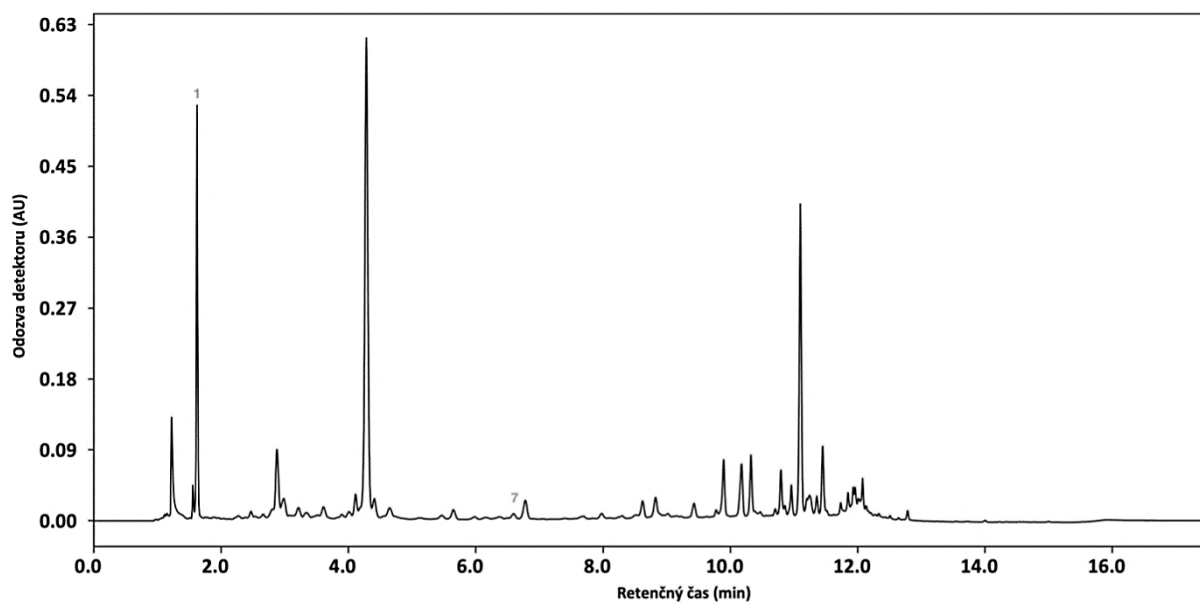
Pre lepšiu prehľadnosť bola zhotovená Tab. 18, v ktorej sú uvedené fenolické látky, ktoré sú prítomné v našich vzorkách s číslom píku, pod ktorým sú uvedené v nasledujúcich chromatogramoch. Takisto je v tejto tabuľke uvedená aj vlnová dĺžka, ktorá je optimálna pre konkrétnu látku. Na Obr. 13 je zobrazený chromatogram separácie fenolických látok v extrakčnom rozpúšťadle s 20% etanolom vo vode pri 254 nm, na Obr. 14 pri 280 nm, na Obr. 15 pri 320 nm a na Obr. 16 pri 365 nm.

Tabuľka 18: Vybrané fenolické látky s číslom píkou a vlnovou dĺžkou, ktorá je optimálna pre konkrétnu látku

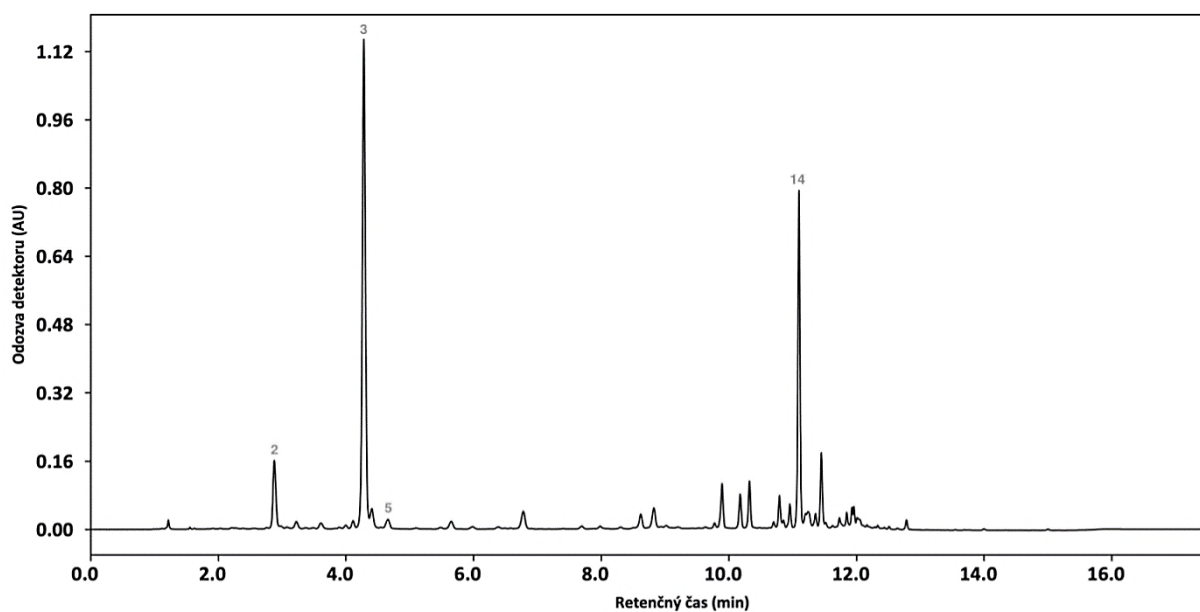
ČÍSLO PÍKU	FENOLICKÁ LÁTKA	VLNOVÁ DĹŽKA (nm)
1	arbutín	280
2	kyselina neochlorogénová	320
3	kyselina chlorogénová	320
5	kyselina kryptochlorogénová	320
7	epikatechín	280
9	rutín	365
10	hyperozid	254
11	hirsutrín	254
12	reynoutrín	254
13	guajjaverín	254
14	kyselina izochlorogénová A	320
15	kvercitrín	254



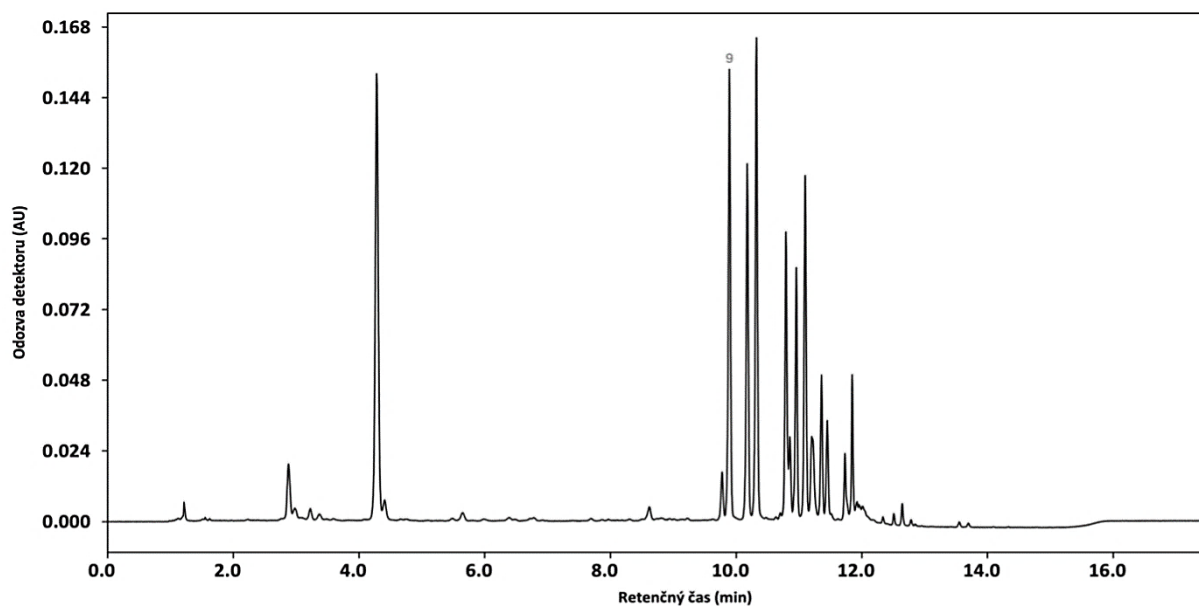
Obrázok 13: Chromatogram separácie fenolických látok v extrakčnom rozpúšťadle s 20% etanolom vo vode pri 254 nm



Obrázok 14: Chromatogram separácie fenolických látok v extrakčnom rozpúšťadle s 20% etanolom vo vode pri 280 nm



Obrázok 15: Chromatogram separácie fenolických látok v extrakčnom rozpúšťadle s 20% etanolom vo vode pri 320 nm



Obrázok 16: Chromatogram separácie fenolických látok v extrakčnom rozpúšťadle s 20% etanolom vo vode pri 365 nm

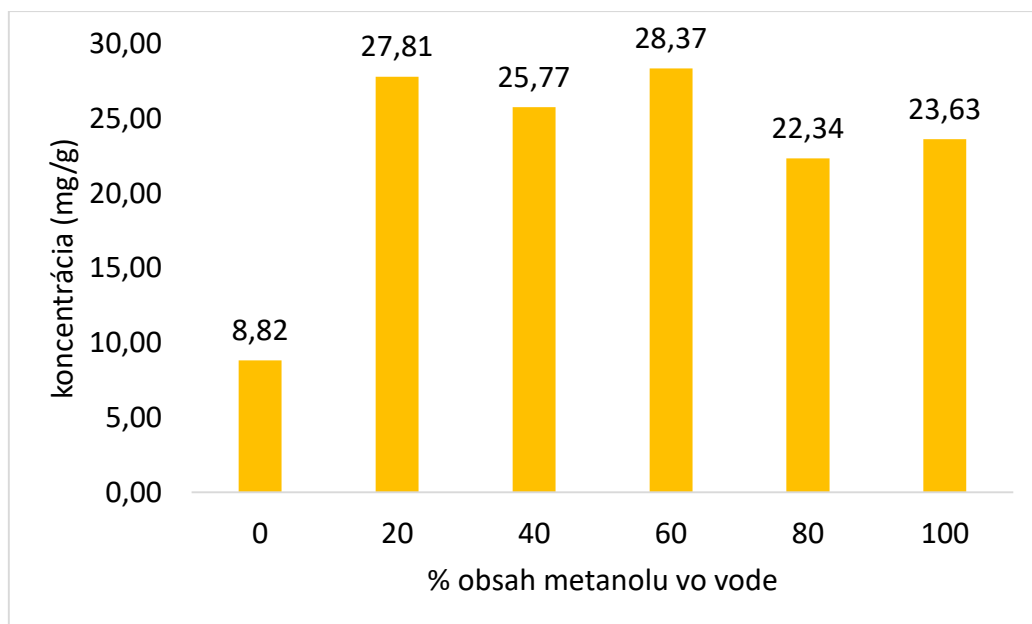
### Metanol

Ako druhé extrakčné rozpúšťadlo bola testovaná zmes: 0, 20, 40, 60, 80 a 100% metanolu vo vode. Výsledky koncentrácií fenolických látok, ako aj ich súčet pre daný pomer metanolu s vodou sú zhrnuté v Tab. 19 a uvedené v miligramoch na gram vzorky. Z výsledkov bol vytvorený Graf 2, v ktorom je prezentovaný celkový obsah fenolických látok v závislosti od koncentrácie metanolu vo vode.



Tabuľka 19: Koncentrácia jednotlivých fenolických látok v mg/g extrahovaná extrakčným rozpúšťadlom s rôznym obsahom metanolu vo vode

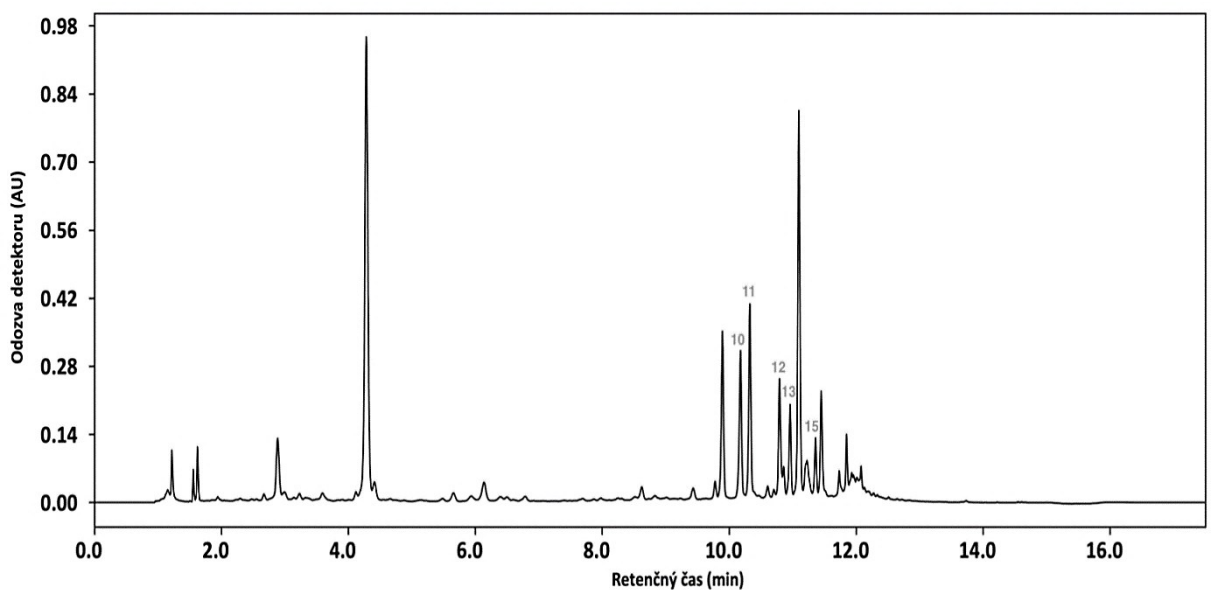
analyzované látky	% MeOH	obsah fenolických látok (mg/g)					
		0	20	40	60	80	100
arbutín		4,12	11,82	9,96	10,77	8,89	10,33
kyselina neochlorogénová		0,39	1,31	1,17	1,21	0,95	0,86
kyselina chlorogénová		2,18	7,15	6,44	7,04	5,21	4,54
kyselina kryptochlorogénová		0,18	0,54	0,54	0,59	0,53	0,60
kyselina kávová		0,02	0,06	0,04	0,05	0,04	0,04
epikatechín		0,11	0,51	0,54	0,53	0,49	0,56
cynarín		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
rutín		0,38	1,34	1,24	1,36	0,95	1,04
hyperozid		0,21	0,73	0,76	0,88	0,70	0,77
hirsutrín		0,31	1,11	1,10	1,32	1,01	1,08
reynoutrín		0,15	0,53	0,63	0,63	0,42	0,42
guajaverín		0,15	0,51	0,47	0,52	0,37	0,40
kyselina izochlorogénová A		0,48	1,61	2,32	2,80	2,23	2,40
kvercitrín		0,14	0,57	0,54	0,66	0,54	0,58
kvercetín		0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>súčet</b>		<b>8,82</b>	<b>27,81</b>	<b>25,77</b>	<b>28,37</b>	<b>22,34</b>	<b>23,63</b>



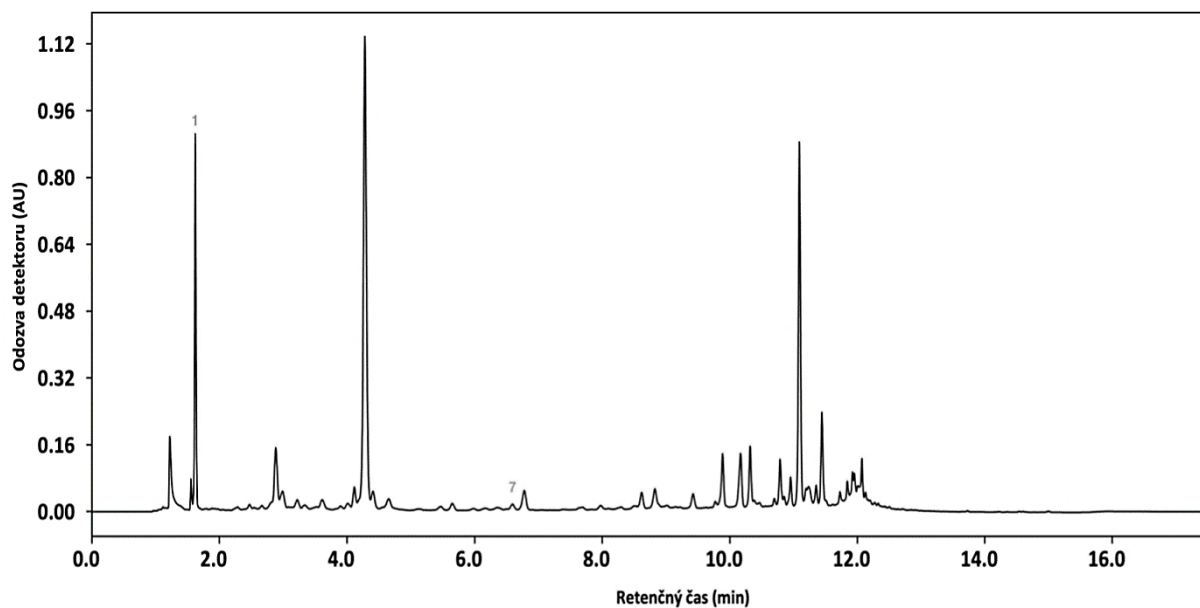
Graf 2: Celková koncentrácia fenolických látok extrahovaných extrakčným rozpúšťadlom s rôznym obsahom metanolu vo vode

Na základe výsledkov merania možno konštatovať, že celkový obsah aj väčšina fenolických látok sa nachádza pri extrakcii 60% metanolu vo vode. Celková koncentrácia fenolických látok pri tejto koncentrácii metanolu je 28,37 mg/g, čo predstavuje 91,67 % z obsahu fenolických látok extrahovaných pri 20% etanole vo vode. Najmenší obsah látok sa vyextrahoval v čistej vode bez použitia metanolu. Arbutín (11,82 mg/g), kyselina chlorogénová (7,15 mg/g) a kyselina neochlorogénová vykazujú najväčší obsah pri koncentrácii 20% metanolu vo vode. Z Tab. 19 tiež vyplýva, že pri použití 100% metanolu nájdeme najväčší podiel kyseliny kryptochlorogénovej a epikatechínu. Takisto ako pri použití etanolu sa v extraktoch kyselina kávová a kvercetín nachádzajú v zanedbateľnom množstve a cynarín nie je vo vzorkách detegovaný.

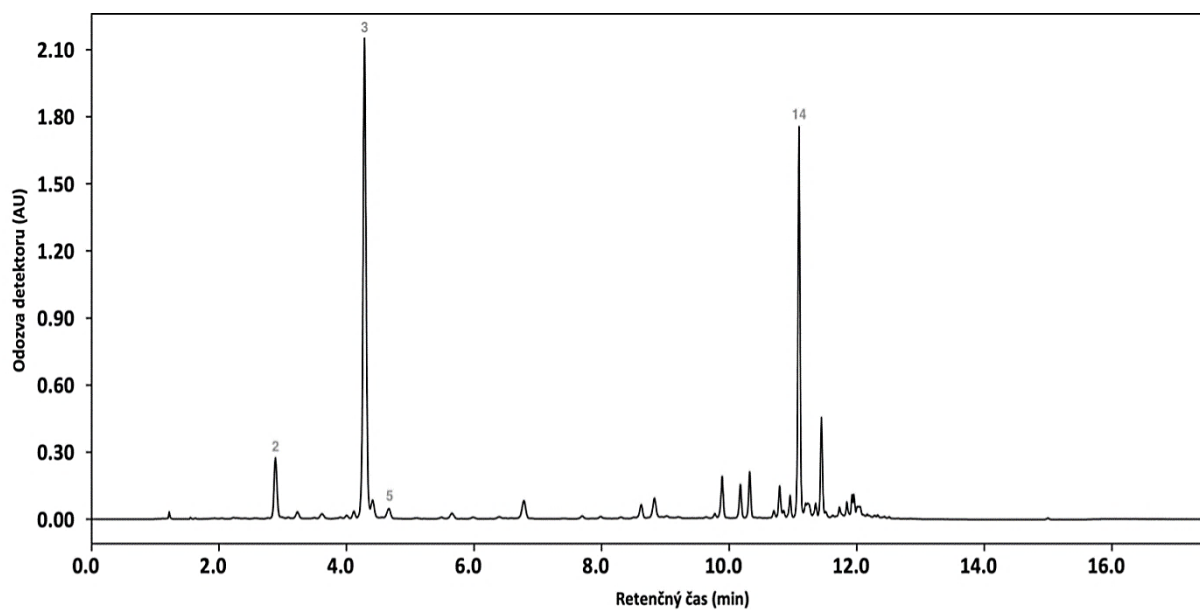
Obr. 17 zobrazuje chromatogram separácie fenolických látok v extrakčnom rozpúšťadle s koncentráciou 60% metanolu vo vode pri 254 nm, Obr. 18 pri 280 nm, Obr. 19 pri 320 nm a Obr. 20 pri 365 nm.



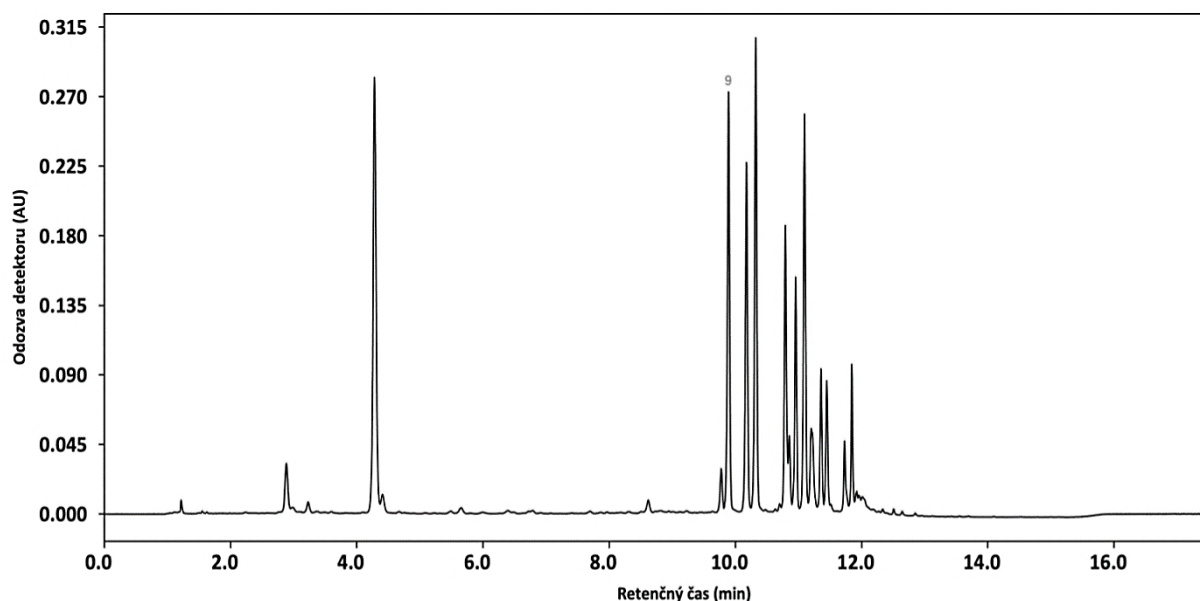
Obrázok 17: Chromatogram separácie fenolických látok v extrakčnom rozpúšťadle so 60% metanolom vo vode pri 254 nm



Obrázok 18: Chromatogram separácie fenolických látok v extrakčnom rozpúšťadle so 60% metanolom vo vode pri 280 nm



Obrázok 19: Chromatogram separácie fenolických látok v extrakčnom rozpúšťadle so 60% metanolom vo vode pri 320 nm



Obrázok 20: Chromatogram separácie fenolických látok v extrakčnom rozpúšťadle so 60% metanolom vo vode pri 365 nm

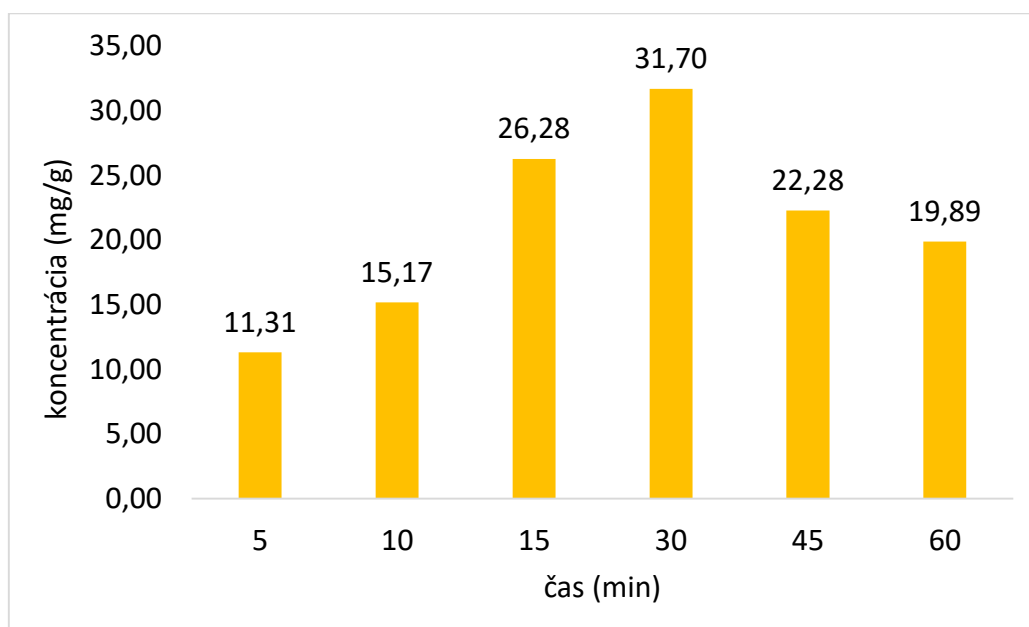
Hlavným parametrom na výber extrakčného rozpúšťadla pre ďalšie testovanie bola výťažnosť extrakcie vybraných látok. Zásadný bol takisto aj nižší obsah organickej fázy a vyššia bezpečnosť pre životné prostredie.

### 5.5.2 Vplyv dĺžky extrakcie na výťažnosť

Na základe predchádzajúcich výsledkov bol použitý 20% etanol vo vode ako extrakčné rozpúšťadlo. Jednotlivé extrakty boli extrahované 5, 10, 15, 30, 45 a 60 minút v ultrazvuku. Získané výsledky obsahu jednotlivých fenolických látok, ako aj ich súčet sú uvedené v Tab. 20 a uvedené v miligramoch na gram vzorky. Následne je celková koncentrácia látok v závislosti od času vynesená do grafu (Graf 3).

Tabuľka 20: Koncentrácie jednotlivých fenolických látok v mg/g v rôznych časoch extrakcie

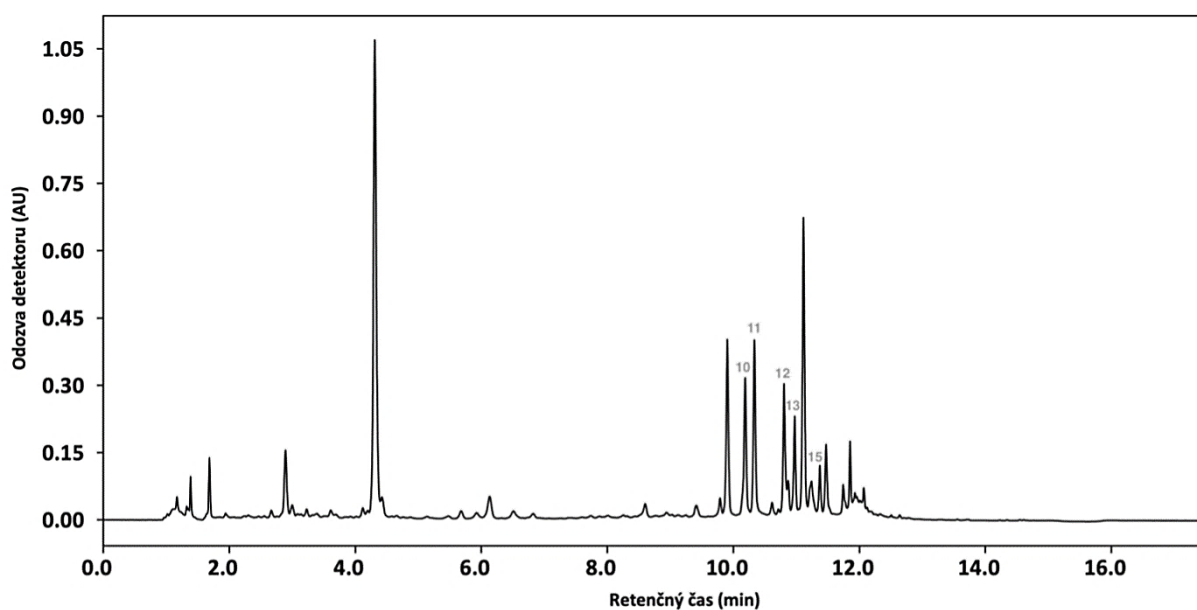
analyzované látky	čas (min)	obsah fenolických látok (mg/g)					
		5	10	15	30	45	60
arbutín		4,39	6,15	10,61	12,72	8,94	7,93
kyselina neochlorogénová		0,46	0,60	1,02	1,28	0,88	0,78
kyselina chlorogénová		3,60	4,67	8,03	9,49	6,81	6,09
kyselina kryptochlorogénová		0,17	0,23	0,39	0,48	0,34	0,30
kyselina kávová		0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01
epikatechín		0,13	0,16	0,30	0,37	0,22	0,21
cynarín		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
rutín		0,46	0,60	1,03	1,27	0,87	0,78
hyperozid		0,27	0,34	0,60	0,75	0,52	0,46
hirsutrín		0,38	0,48	0,85	1,07	0,73	0,65
reynoutrín		0,22	0,29	0,52	0,64	0,44	0,39
guajjaverín		0,18	0,23	0,41	0,50	0,33	0,29
kyselina izochlorogénová A		0,99	1,31	2,31	2,89	2,04	1,84
kvercitrín		0,07	0,09	0,18	0,22	0,15	0,13
kvercetín		0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>súčet</b>		<b>11,31</b>	<b>15,17</b>	<b>26,28</b>	<b>31,70</b>	<b>22,28</b>	<b>19,89</b>



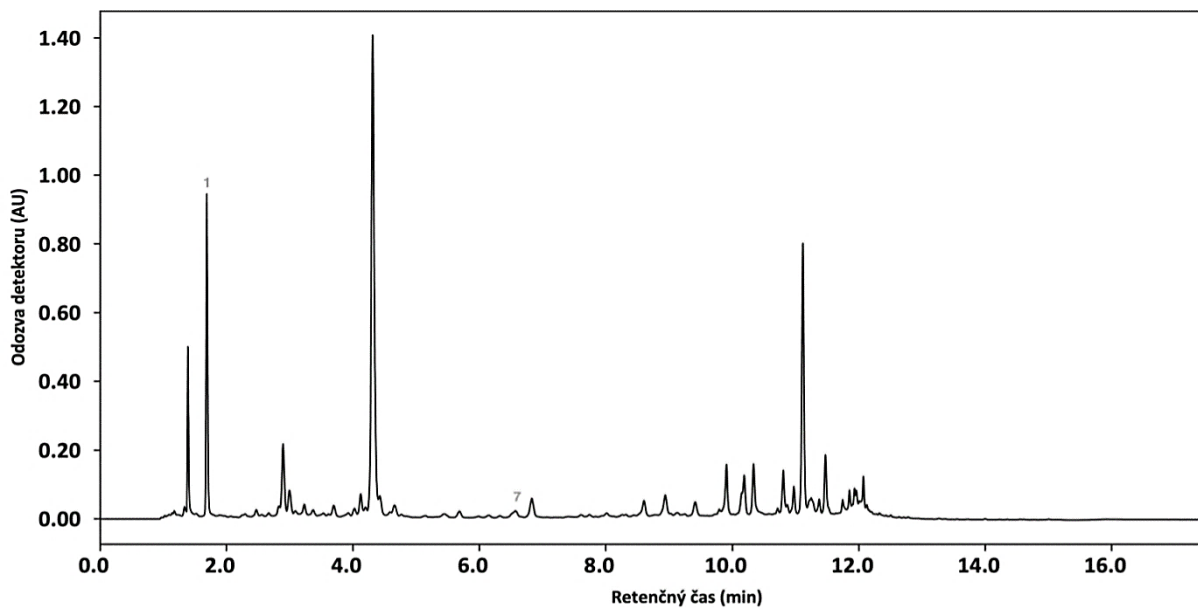
Graf 3: Závislosť celkovej koncentrácie fenolických látok na čase

Z Tab. 20 a Grafu 3 vyplýva, že najväčšia koncentrácia látok bola získaná po 30 minútach extrakcie. Postupne od 5 do 30 minút koncentrácia fenolických látok stúpala s časom extrakcie. Ultrazvuk zlepšil uvoľňovanie fenolických látok z extrakčného materiálu a zvyšovanie ich koncentrácie v rozpúšťadle. Po 30 minútach začala koncentrácia látok klesať, čo mohlo byť spôsobené ich rozkladom, prípadne spätným vychytávaním na matricu vzorky [42].

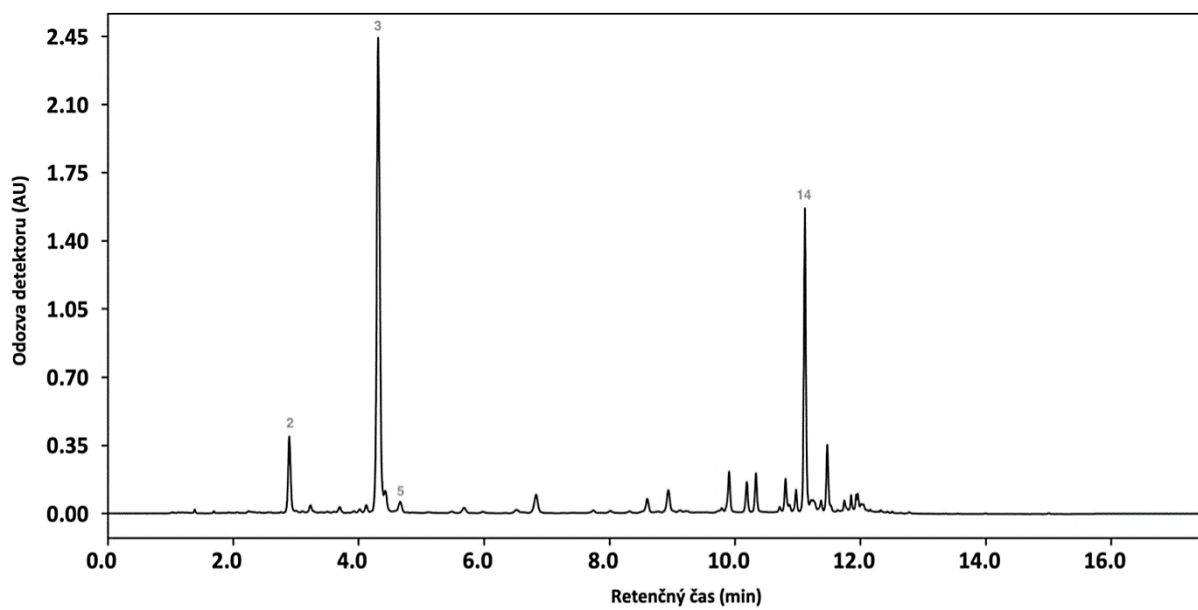
Na Obr. 21 je znázornený chromatogram separácie extraktu po 30 minútach extrakcie pri 254 nm, na Obr. 22 pri 280 nm, na Obr. 23 pri 320 nm a na Obr. 24 pri 365 nm.



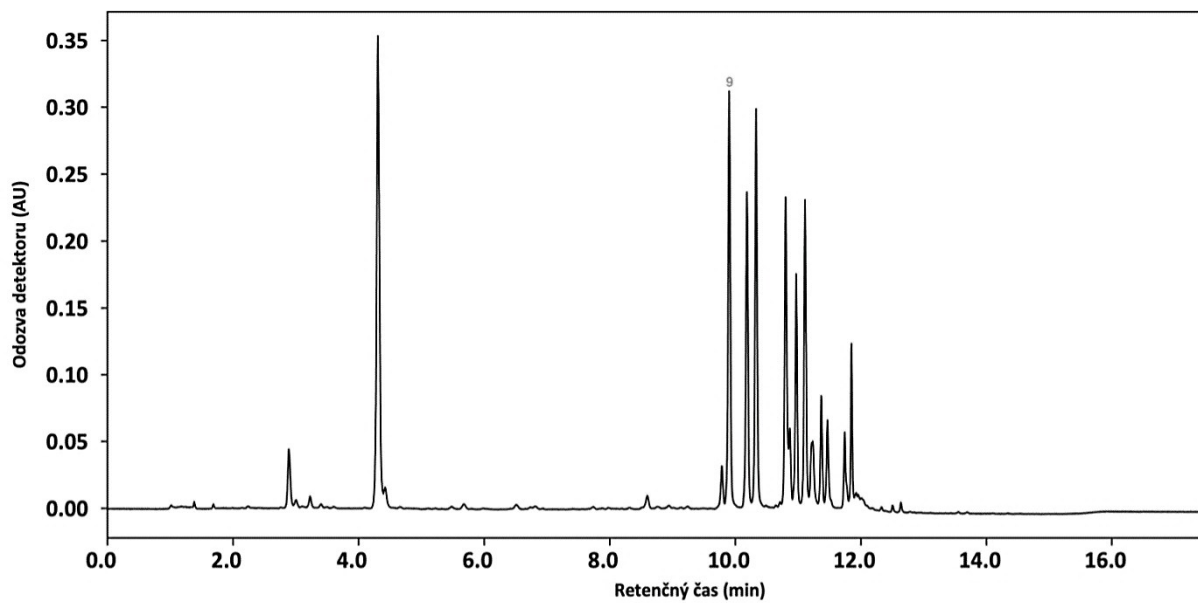
Obrázok 21: Chromatogram separácie extraktu po 30 minútach extrakcie pri 254 nm



Obrázok 22: Chromatogram separácie extraktu po 30 minútach extrakcie pri 280 nm



Obrázok 23: Chromatogram separácie extraktu po 30 minútach extrakcie pri 320 nm



Obrázok 24: Chromatogram separácie extraktu po 30 minútach extrakcie pri 365 nm



## 6 Záver

Táto diplomová práca sa zaoberala vývojom UHPLC-DAD metódy pre vybrané fenolické látky. Testovaním rôznych chromatografických kolón, mobilných fáz, profilov gradientovej elúcie, prietokových rýchlostí aj teplôt na kolóne boli vybrané optimálne separačné podmienky.

Stanovenie obsahu týchto látok v extraktoch prebiehal na kolóne Luna® Omega Polar C18 100 (150 x 2,1 mm; 1,6  $\mu\text{m}$ ) s prietokom 0,3 ml/min a teplotou na kolóne 30 °C. Ako mobilná fáza bola použitá zmes acetonitrilu v kombinácii s ultračistou vodou, ktorá bola okyslená kyselinou octovou na pH 2,8. Detekcia prebiehala pomocou DAD detektora na vybraných vlnových dĺžkach (254, 280, 320 a 365 nm), ktoré sú optimálne pre dané látky.

Bol vykonaný test vhodnosti chromatografického systému (rozlíšenie, faktor symetrie, píkova kapacita a retenčný faktor), opakovateľnosť retenčných časov aj plôch píkovo a linearita analyzovaných látok. Všetky hodnoty testovaných látok spĺňali požadované kritériá.

Takisto prebehla aj optimalizácia extrakčného rozpúšťadla a čas potrebný na extrakciu vybraných fenolických látok v listoch hrušky. Ako najvhodnejšie extrakčné rozpúšťadlo bol zvolený 20% etanol v ultračistej vode a čas extrakcie 30 min.

## 7 Použitá literatura

- [1] MANACH, Claudine, Augustin SCALBERT, Christine MORAND, Christian RÉMÉSY a Liliana JIMÉNEZ. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2004, **79**(5), 727–747 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/79.5.727
- [2] BALASUNDRAM, Nagendran, Kalyana SUNDRAM a Samir SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* [online]. 2006, **99**(1), 191-203 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042
- [3] CALEJA, Cristina, Andreia RIBEIRO, Maria Filomena BARREIRO a Isabel C.F.R. FERREIRA. Phenolic Compounds as Nutraceuticals or Functional Food Ingredients. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2017, **23**(19), 2787-2806 [cit. 2022-03-04]. Dostupné z: doi:10.2174/1381612822666161227153906
- [4] CUMMING, Hemi a Christoph RÜCKER. Octanol–Water Partition Coefficient Measurement by a Simple <sup>1</sup>H NMR Method. *ACS Omega* [online]. 2017, **2**(9), 6244–6249 [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.7b01102
- [5] *PubChem* [online]. [cit. 2022-04-19]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [6] *Human Metabolome Database* [online]. [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: <https://hmdb.ca>
- [7] ZHOU, Hangyu, Jing ZHAO, Aitao LI a Manfred T. REETZ. Chemical and Biocatalytic Routes to Arbutin. *Molecules* [online]. 2019, **24**(18), 3303 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24183303
- [8] HOLLMAN, Peter C. H. a Martijn B. KATAN. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition* [online]. 2001, **131**(1), 66-71 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1093/jn/131.1.66
- [9] NAVARRO-ORCAJADA, Silvia, Adrian MATENCIO, Cristina VICENTE-HERRERO, Francisco GARCIA-CARMONA a Jose Manuel LOPEZ-NICOLAS. Study of the fluorescence and interaction between cyclodextrins and neochlorogenic acid, in comparison with chlorogenic acid. *Scientific Reports* [online]. 2021, **11**(1), 3275 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-82915-9

- [10] LI, Jie, Xiaohe CHEN, Xiang LI, Jiayang TANG, Yan LI, Bin LIU a Shuzhen GUO. Cryptochlorogenic acid and its metabolites ameliorate myocardial hypertrophy through a HIF1 alpha-related pathway. *Food & Function* [online]. 2022, **13**(4), 2269-2282 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1039/d1fo03838a
- [11] STOJKOVIC, Dejan, Jovana PETROVIC, Marina SOKOVIC, Jasmina GLAMOCLIIJA, Jelena KUKIC-MARKOVIC a Silvana PETROVIC. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *The Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2013, **93**(13), 3205-3208 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.6156
- [12] WANG, Jing, Guoxiu CAO, Hong WANG, Hui YE, Yunxi ZHONG, Guangji WANG a Haiping HAO. Characterization of isochlorogenic acid A metabolites in rats using high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*[online]. 2017, **31**(8) [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.3927
- [13] MEINHART, Adriana Dillenburg, Lucas CALDEIRAO, Fernanda Mateus DAMIN, Jose TEIXEIRA FILHO a Helena Teixeira GODOY. Analysis of chlorogenic acids isomers and caffeic acid in 89 herbal infusions (tea). *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2018, **73**, 76-82 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfca.2018.08.001
- [14] DIAS, Tiago, Mara Reis SILVA, Clarissa DAMIANI a Flavio Alves DA SILVA. Quantification of Catechin and Epicatechin in Foods by Enzymatic-Spectrophotometric Method with Tyrosinase. *Food Analytical Methods* [online]. 2017, **10**(12), 3914-3923 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1007/s12161-017-0955-6
- [15] GEZER, Ceren. Potential health effects of the popular compound of artichoke: Cynarin. *Progress in Nutrition* [online]. 2017, **19**(1), 5-9 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.23751/pn.v19i1-S.4967
- [16] ENOGIERU, Adaze Bijou, William HAYLETT, Donavon Charles HISS, Soraya BARDIEN a Okobi Eko EKPO. Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2018, **2018** [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1155/2018/6241017
- [17] KONG, Yinghui, Weiguo SUN a Pengfei WU. Hyperoside exerts potent anticancer activity in skin cancer. *Frontiers in Bioscience-Landmark* [online]. 2020, **25**(3), 463-479 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.2741/4814

- [18] KIM, Sang Min, Kyungsu KANG, Eun Hye JHO, Yu-Jin JUNG, Chu Won NHO, Byung-Hun UM a Cheol-Ho PAN. Hepatoprotective Effect of Flavonoid Glycosides from *Lespedeza cuneata* against Oxidative Stress Induced by tert-Butyl Hydroperoxide. *Phytotherapy Research* [online]. 2011, **25**(7), 1011-1017 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1002/ptr.3387
- [19] YANG, Wenkai, Hanjian TU, Kai TANG, Haozhong HUANG, Shi OU a Jianguo WU. Reynoutrin Improves Ischemic Heart Failure in Rats Via Targeting S100A1. *Frontiers in Pharmacology* [online]. 2021, **12** [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2021.703962
- [20] RENDA, Gulin, Arzu OZEL, Burak BARUT, Busra KORKMAZ, Michal SORAL, Ummuhan KANDEMIR a Tibor LIPTAJ. Bioassay Guided Isolation of Active Compounds from *Alchemilla barbatiflora* Juz. *Records of Natural Products* [online]. 2018, **12**(1), 76-85 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.25135/rnp.07.17.07.117
- [21] LI, Yao, Jiaying YAO, Chunyan HAN, Jiaxin YANG, Maria Tabassum CHAUDHRY, Shengnan WANG, Hongnan LIU a Yulong YIN. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients* [online]. 2016, **8**(3), 167 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.3390/nu8030167
- [22] YIN, Yuanqin, Wenqi LI, Young-Ok SON, et al. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2013, **269**(2), 89-99 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2013.03.015
- [23] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi. I. 2. prepracované a rozšírené vydanie*. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021, 448 strán : farebné ilustrácie. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [24] HUTNÍKOVÁ, Michaela. *Separácia tokoferolov s využitím HPLC techniky* [online]. Hradec Králové, 2019 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/20.500.11956/106801>. Diplomová práca. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytickej chémie. Vedúci práce Lenka Kujovská Krčmová.
- [25] ZOTOU, Anastasia. An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal of Chemistry* [online]. 2012, **10**(3), 554-569 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: doi:10.2478/s11532-011-0161-0
- [26] ZIVKOVIC, Jelena, Katarina SAVIKIN, Gordana ZDUNIC, Biljana DOJCINOVIC a Nebojsa MENKOVIC. Phenolic and mineral profile of Balkan indigenous apple and pear cultivars. *Journal of the Serbian Chemical Society* [online]. 2016, **81**(6), 607-621 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:10.2298/JSC151026023Z

- [27] BRAHEM, Marwa, Catherine M. G. C. RENARD, Severin EDER, Michele LOONIS, Rim OUNI, Messaoud MARS a Carine LE BOURVELLEC. Characterization and quantification of fruit phenolic compounds of European and Tunisian pear cultivars. *Food Research International* [online]. 2017, **95**, 125-133 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2017.03.002
- [28] WANG, Tingting, Xia LI, Bin ZHOU, Jie ZENG a Wenyuan GAO. Anti-diabetic activity in type 2 diabetic mice and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory potential of chemically profiled pear peel and pulp extracts (*Pyrus* spp.). *Journal of Functional Foods* [online]. 2015, **13**, 276-288 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:doi:10.1016/j.jff.2014.12.049
- [29] LI, Xia, Tingting WANG, Bin ZHOU, Wenyuan GAO, Jingguo CAO a Luqi HUANG. Chemical composition and antioxidant and anti-inflammatory potential of peels and flesh from 10 different pear varieties (*Pyrus* spp.). *Food Chemistry* [online]. 2014, **152**, 531-538 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2013.12.010
- [30] SCHIEBER, Andreas, Petra KELLER a Reinhold CARLE. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2001, **910**(2), 265-273 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9673(00)01217-6
- [31] RAJA, Maria, Joel HERNANDEZ-REVELLES, Santiago HERNANDEZ-CASSOU a Javier SAURINA. Determination of polyphenols in the pear pulp matrix by solvent extraction and liquid chromatography with UV-Vis detection. *Analytical Methods* [online]. 2014, **6**(24), 9769-9776 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:10.1039/c4ay02558j
- [32] YMC [online]. [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: [https://www.ymc.co.jp/en/columns/ymc\\_triart\\_c18\\_exrs/](https://www.ymc.co.jp/en/columns/ymc_triart_c18_exrs/)
- [33] Phenomenex [online]. [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://www.phenomenex.com/Products/HPLCDetail/Luna/Omega%20Polar%20C18>
- [34] SLOVÁČEK, Jan. *Separční vlastnosti klasických porézních kolon a povrchově porézních kolon v analýze ambroxolu a jeho tří nečistot* [online]. Praha, 2016 [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/74097>. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie. Vedúci práce Petr Kozlák.

- [35] DĚD, Jozef. *Vývoj a validácia analytickej metódy pre hodnotenie čistoty Nalbufin hydrochloridu* [online]. Brno, 2019 [cit. 2022-04-24]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/177396>. Diplomová práca. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnológií. Vedúci práce Viera Mrázová.
- [36] HOLLÁ, Marcela, Aneta BÍLKOVÁ, Pavel JAKUBEC, Stanislava KOŠKOVÁ, Hana KOČOVÁ VLČKOVÁ, Dalibor ŠATÍNSKÝ, František ŠVEC a Hana SKLENÁŘOVÁ. Benefits and Pitfalls of HPLC Coupled to Diode-Array, Charged Aerosol, and Coulometric Detections: Effect of Detection on Screening of Bioactive Compounds in Apples. *Molecules* [online]. 2021, **26**(11), 3246 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: [doi:10.3390/molecules26113246](https://doi.org/10.3390/molecules26113246)
- [37] BÍLKOVÁ, Aneta, Pavel JAKUBEC, Pavlína KNAPOVÁ, Pavol SURAN, Jiří KWIECIEN a Hana SKLENÁŘOVÁ. Effect of storage conditions on content of pesticide residues in sweet cherries. *Food Chemistry: X* [online]. 2022, **13**, 100185 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.fochx.2021.100185](https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100185)
- [38] BÍLKOVÁ, Aneta, Kristýna BAĐUROVÁ, Pavlína SVOBODOVÁ, Radek VÁVRA, Pavel JAKUBEC, Petr CHOCHOLOUŠ, František ŠVEC a Hana SKLENÁŘOVÁ. Content of major phenolic compounds in apples: Benefits of ultra-low oxygen conditions in long-term storage. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2020, **92**, 103587 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: [doi:10.1016/j.jfca.2020.103587](https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103587)
- [39] SKLENÁŘOVÁ, Hana, Aneta BÍLKOVÁ, Martina PECHOVÁ a Petr CHOCHOLOUŠ. Determination of major phenolic compounds in apples: Part I—Optimization of high-performance liquid chromatography separation with diode array detection. *Journal of Separation Science* [online]. 2018, **41**(15), 3042-3050 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: [doi:10.1002/jssc.201800302](https://doi.org/10.1002/jssc.201800302)
- [40] PAPADOYANNIS, Ioannis N. a Victoria F. SAMANIDOU. Validation of HPLC instrumentation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2004, **27**(5), 753-783 [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: [doi:10.1081/JLC-120029697](https://doi.org/10.1081/JLC-120029697)
- [41] *Český lékopis 2017*. Praha: Grada Publishing, 2017. ISBN 859-404-924-045-6.
- [42] LIU, Yong, Shoulian WEI, Min WU a Shuqiu YANG. Phenolic compounds from date pits: ultrasonic-assisted extraction, antioxidant activity and component identification. *Food Measurement and Characterization* [online]. 2018, **12**(2), 967-973 [cit. 2022-04-17]. Dostupné z: [doi:10.1007/s11694-017-9711-2](https://doi.org/10.1007/s11694-017-9711-2)