

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Karel Bartoš

Studium množství antioxidantů v extraktech
z *Melissa officinalis*

Study of the amount of antioxidants in extracts
from *Melissa officinalis*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Anna Kubičková, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

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

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

V Praze dne 16. června 2021.

Karel Bartoš

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením vybraných antioxidantů, konkrétně kyseliny rosmarinové, kyseliny kávové, kyseliny skořicové a kyseliny *t*-4-hydroxyskořicové, ve vodných a ethanolických extraktech z *Melissa officinalis*. Cílem práce bylo zjistit, zda jsou i v extraktech připravených v domácích podmínkách přítomny výše zmíněné antioxidanty. V rámci práce byla vyvinuta nová UHPLC metoda s UV a MS detekcí ke sledování obsahu kyseliny rosmarinové, kyseliny kávové, kyseliny skořicové a kyseliny *t*-4-hydroxyskořicové v extraktech. Pro separaci byla vybrána kolona BEH C18 (2,1 mm × 100 mm, velikost částic 1,7 μm), mobilní fáze byla ve složení methanol a 0,1% vodný roztok kyseliny mravenčí o pH 2,6 přičemž poměr složek se měnil dle gradientového programu. Metoda byla po optimalizaci validována a zjištěna opakovatelnost, meze detekce a stanovitelnosti, linearita, výtěžnost a robustnost. Následně byla provedena analýza 20 vodných a 20 ethanolických extraktů lišících se dobou extrakce, typem rozpouštědla a světelnými podmínkami. Na základě porovnání retečních časů a hmotnostních spekter byla potvrzena přítomnost 3 ze 4 vybraných fenolických kyselin a to konkrétně kyseliny rosmarinové, kyseliny kávové a kyseliny skořicové v ethanolických extraktech. Ve vodných extraktech se bohužel přítomnost kyselin nepodařilo prokázat. K ověření metody byla provedena analýza tří vybraných komerčně dostupných čajů. Byla potvrzena přítomnost dvou kyselin s antioxidantními vlastnostmi, a to konkrétně kyseliny rosmarinové a kyseliny kávové.

Klíčová slova: *Melissa officinalis*, antioxidanty, UHPLC-MS, extrakce

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the determination of selected antioxidants, namely rosmarinic acid, caffeic acid, cinnamic acid and *t*-4-hydroxycinnamic acid in aqueous and ethanolic extracts from *Melissa officinalis*. The aim of the work was to find out whether the above-mentioned antioxidants were present in the extracts prepared at home. A new UHPLC method with UV and MS detection was developed to monitor the content of rosmarinic acid, caffeic acid, cinnamic acid and *t*-4-hydroxycinnamic acid in the extracts. A BEH C18 column (2,1 mm × 100 mm, particle size 1,7 µm) was selected for separation, the mobile phase consisted of methanol (component A) and 0.1% aqueous formic acid solution at pH 2.6 (component B), the ratio of components being changed according to the gradient program. The method was validated and repeatability, limits of detection and limits of quantification, linearity, yield and robustness were determined after optimization. Analysis of 20 aqueous and 20 ethanolic extracts was performed differing in extraction time, type of solvent and lighting conditions. Based on the comparison of retention time and MS detection, the presence of 3 of 4 selected phenolic acids was confirmed, namely rosmarinic acid, caffeic acid and cinnamic acid in ethanolic extracts. Unfortunately, the presence of acids could not be detected in the aqueous extracts. To verify the method analysis of three selected commercially available teas was performed. The presence of two acids with antioxidant properties was confirmed, namely rosmarinic acid and caffeic acid.

Keywords: *Melissa officinalis*, antioxidants, UHPLC-MS, extraction

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat paní RNDr. Anně Kubíčkové, Ph.D. za poznatky a užitečné rady, které mi poskytla v průběhu tvorby diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat paní doc. RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D. za pomoc při zpracování a interpretaci hmotnostních spekter v programu Origin.

Seznam použitých zkratk

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina
C18	Oktadecylová skupina
CAA	Kyselina kávová (z angl. <i>Caffeic acid</i>)
CUPRAC	z angl. Cupric ions reducing assay
CRM	Certifikovaný referenční materiál
DAD	Detektor diodového pole (z angl. Diode array detector)
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
DMPD	N,N-dimethyl- ρ -phenylenediamine
EI	Elektronová ionizace (z angl. Electron ionization)
FRAP	z angl. Ferric reducing antioxidant power
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie (z angl. Liquid chromatography)
LOD	Mez detekce (z angl. Limit of detection)
LOQ	Mez stanovitelnosti (z angl. Limit of quantification)
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. Mass spectroscopy)
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektroskopie
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. Ultra high performance liquid chromatography)
UHPLC-MS	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektroskopií
UV/VIS	Ultrafialová a viditelná oblast
UV-B	Ultrafialové záření typu B
RA	Kyselina rosmarinová (z angl. <i>Rosmarinic acid</i>)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. <i>Reactive oxygens species</i>)
TOF	Průletový detektor (z angl. <i>Time of flight</i>)

Seznam použitých symbolů

b	směrnice kalibrační křivky
c	molární koncentrace ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)
F	pološířka v 5% výšky píku
m/z	poměr hmotnosti ku náboji
R	rozlišení
r^2	koeficient determinance
s	směrodatná odchylka měření
t	čas (s)
T	Tailling faktor
t_R	retenční čas (min)
v/v	objemový poměr
W	šířka píku při základně
x_i	i -tý prvek statistické hodnoty x
\bar{x}	aritmetický průměr
λ	vlnová délka (nm)
φ	objemový zlomek

OBSAH

CÍL PRÁCE.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1.1 <i>Melissa officinalis</i>	11
1.2 Antioxidační vlastnosti fenolických kyselin v rostlinách.....	12
1.2.1 Kyselina rosmarinová.....	13
1.2.2 Kyselina kávová.....	14
1.2.3 Kyselina skořicová a její deriváty.....	14
1.3 Extrakce rostlinných vzorků.....	15
1.4 UHPLC.....	16
1.5 UHPLC-MS.....	17
1.6 Stanovení obsahu antioxidačních látek v <i>Melissa officinalis</i>	18
1.7 Validace chromatografické metody.....	22
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
2.1 Použité chemikálie.....	24
2.2 Použité přístroje.....	24
2.3 Příprava extraktů z meduňky.....	24
2.4 Příprava komerčně dostupných čajů.....	25
2.5 Příprava standardních roztoků.....	25
2.6 Příprava kalibračních roztoků.....	25
2.7 Příprava mobilní fáze.....	26
2.8 Chromatografické podmínky.....	26
2.9 Analytické zpracování dat.....	27
2.9.1 Kalibrační závislost.....	27
2.9.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	27
2.9.3 Opakovatelnost.....	28
2.9.4 Robustnost.....	28
2.9.5 Výtěžnost.....	29
3 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	30
3.1 Vývoj a optimalizace metody.....	30
3.2 Validace metody.....	34
3.2.1 Opakovatelnost.....	34

3.2.2	Kalibrační křivky, hodnoty LOD a LOQ.....	35
3.2.3	Robustnost	38
3.2.4	Výtěžnost	40
3.3	UHPLC stanovení antioxidačních látek v extraktech z meduňky	40
3.4	Vliv světelných podmínek na extrakci	43
3.5	Studium množství vybraných antioxidantů v čajích.....	43
ZÁVĚR.....		45
POUŽITÁ LITERATURA		46

CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce je vyvinout a validovat UHPLC metodu vhodnou ke kvantifikaci vybraných antioxidantů v *Melissa officinalis*. Dále připravit vodné a ethanolické extrakty z meduňky v domácích podmínkách a otestovat je výše zmíněnou metodou na přítomnost vybraných fenolických kyselin s antioxidačními vlastnostmi.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 *Melissa officinalis*

Meduňka lékařská (lat. *Melissa officinalis*) je aromatická a léčebná bylina z čeledi *Lamiaceae* (Obr. 1.1). Původem patří do jižní Evropy, středomořské oblasti, nebo také do tropických zemí. Vegetační období meduňky je v rozmezí června až září. Jedním z charakteristických faktorů rostliny je vůně po citrónu, proto se také v mnoha publikacích setkáváme s označením „lemon balm“. Rostlina má zelené listy srdčitého a kopinatého tvaru. Epidermis nese trichomy z obou stran, které v hojné míře nalezneme na midribu. Meduňka obsahuje značné množství antioxidantních látek, kterým se připisuje důležité biologická hodnota a kterým se připisuje antialergický a antidepressivní účinek. Provedené studie prokázaly, že nejhojněji vyskytující se jsou fenolové sloučeniny, jako je kyselina kávová, kyselina rozmarinová nebo kyselina protocatechová. Mimo jiné se zde objevují i další zástupci antioxidantů, jako jsou taniny, éterické oleje a flavanoidy. Bylo také identifikováno celkem 33 složek představujících 89 % celkového oleje ve složení listu. Mezi tyto nejvýznamnější terpenoidy obsažené v meduňce patří citral, citronellal, geraniol, nerol, linalool, farnesylacetát, humulen, karyofylen a eremofilen. [1–5]

V rostlinách se nachází primární a sekundární metabolity, meziproducty nebo konečné produkty buněčných regulačních drah. Je všeobecně známo, že meduňka obsahuje mnoho sekundárních metabolitů vykazující léčivé vlastnosti. Bylo prokázáno, že vlivem UV-B záření došlo ke zvýšení množství metabolitů trikarboxylových kyselin a kyseliny kávové. [6]

Meduňka se v tradiční medicíně používá k léčbě bolestí hlavy, trávicí poruchy, revmatismu a přecitlivělosti. Bylo zjištěno, že vodné extrakty z meduňky zmírňují Alzheimerova chorobu a regulují centrální nervový systém. [6] Svůj terapeutický potenciál má i z hlediska prevence chronických onemocnění, jako jsou některé typy rakoviny, kardiovaskulární choroby, nebo neurodegenerativních chorob, které přímo souvisejí s oxidačním stresem. [3] Má účinky na štítnou žlázu, antivirové, antifungální, antiparazitní a antispasmolytické. Meduňka také vyvolává menstruaci. [5]



Obr. 1.1 *Melissa officinalis*

1.2 Antioxidační vlastnosti fenolických kyselin v rostlinách

Produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) může v organismech překonat buněčnou antioxidační obranu a může vést ke stavu nazývanému oxidační stres. Odborná literatura uvádí, že tyto formy kyslíku a oxidační stres mohou zhoršit průběh nemoci při cukrovce, kardiovaskulárních onemocněních, chronických neurodegenerativních poruchách, mezi které patří Parkinsonova a Alzheimerova choroba.

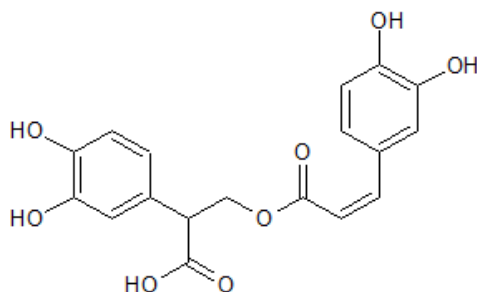
Antioxidanty mají schopnost chránit organismus před poškozením způsobenými oxidanty. Snižují množství volných radikálů, které jsou škodlivé pro lidské zdraví kvůli jejich silné oxidační síle a které jsou odpovědné za urychlení procesu stárnutí buněk. Mohou také inhibovat účinek oxidantů darováním atomu vodíku nebo chelatací volných katalytických kovů. [7] Jedna z příčin antioxidační aktivity je přítomnost hydroxylových kyselin. [8]

Rostliny představují nevyčerpatelný a obnovitelný zdroj účinných látek, jejichž využití v lékařství je již dlouho známé. Fenolickým kyselinám je například připisován významný podíl antioxidačních vlastností ve vybraných rostlinách. Výskyt těchto sloučenin v potravinách významně ovlivňuje stabilitu, barvu, chuť, nutriční hodnotu a další vlastnosti potravin. Antioxidanty přítomné v potravinách tedy chrání molekuly před oxidací, chrání proti karcinogenezi a jsou široce používány také v doplňcích stravy. [5, 9]

Meduňka lékařská, která byla studována v rámci této práce, prokazatelně obsahuje fenolické sloučeniny vykazující antioxidační aktivitu. Jedná se konkrétně o následující kyseliny: kyselina rosmarinová, kyselina kávová, kyselina protokatechová, kyselina chlorogenová, kyselina citrónová a kyselina fumarová. [6, 8, 10]

1.2.1 Kyselina rosmarinová

Kyselina rosmarinová (Obr. 1.2) je přítomna ve všech rostlinách z rodu *Lamiaceae*. Jedná se o přirozeně se vyskytující ester kyseliny kávové. [11] V rostlinách tato kyselina vzniká z aminokyselin fenylyalaninu a tyrosinu. [12] Má čtyři hydroxylové skupiny a významně tak přispívá k antioxidačním vlastnostem rostlinných extraktů.

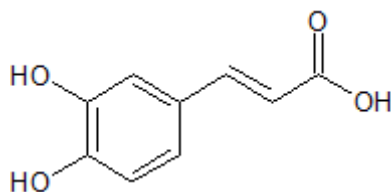


Obr. 1.2 Kyselina rosmarinová

Bylo zjištěno, že stabilita kyseliny rosmarinové je silně závislá na pH. Stabilita byla testována v prostředí gastrointestinálních šťáv člověka. Kyselé pH (pH = 2,5) významně snížilo stabilitu kyseliny, zatímco účinek teploty (37 °C) a mírně zásaditého prostředí (pH = 7,5) nebyl významný. [12] Je nutno ale zohlednit, že koncentrace těchto gastrointestinálních šťáv je individuální u každého jedince a také prostředí lidské zažívací fáze není ztotožnitelná s chromatografickými podmínkami.

1.2.2 Kyselina kávová

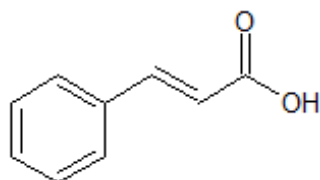
Kyselina kávová (kyselina 3,4-dihydroxyskořicová) je další složkou v rostlinných extraktech rodu *Lamiaceae* (Obr. 1.3), avšak v nižších koncentracích. [9, 10] Je bohatě zastoupena ve víně nebo slunečnicových semenech. Kyselina výrazně ovlivňuje rozpustnost rostlinných bílkovin. Její antioxidační aktivitu lze vysvětlit intramolekulární vodíkovou vazbou, která může nastat v *ortho*- substituovaných fenolech. [11] Bylo zjištěno, že je α -tokoferolovým ochranným činidlem v lipoproteinu s nízkou hustotou. Mimo jiné tento typ fenolové sloučeniny je zodpovědný za enzymatické hnědnutí a působí jako antioxidant v bramborách. [8] Studie prokázala její antioxidační vlastnosti pomocí spektrofotometrických metod ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina) a DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6trinitrofenyl)hydrazyl), které jsou založené na eliminaci stabilních radikálů. [13]



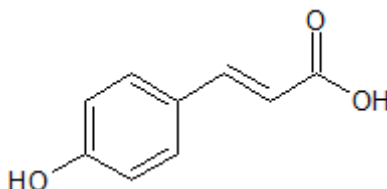
Obr. 1.3 Kyselina kávová

1.2.3 Kyselina skořicová a její deriváty

Kyselina skořicová (Obr. 1.4) je aromatická mastná kyselina složená z fenylového kruhu substituovaného skupinou kyseliny akrylové, která vzniká deaminací fenylalaninu v rostlinné tkáni. [14] Kyselina skořicová a její deriváty se hojně vyskytují v ovoci (jablko, hruška), zelenině (fazole, brambory) a obilovinách (oves, pšenice). [15] Dle Oufensu S. et al., kteří se zaměřují na stanovení antioxidantů v rostlinách rodu *Lamiacea*, nebyla prokázána přítomnost kyseliny skořicové v meduňce [16]. Sybar O. et al. [17] toto tvrzení ale vyvrací a naopak uvádí, že byla prokázána přítomnost kyseliny skořicové v methanolickém extraktu v množství 0,006 mg/g sušiny. Kromě těchto bohatě zastoupených kyselin lze identifikovat i jednodušší kyseliny, jako je kyselina *t*-skořicová nebo *t*-4-hydroxyskořicová (Obr. 1.5). Jejich množství je však těžce detekovatelné, jak již potvrzuje literatura zabývající se stanovením množství antioxidantů pomocí spektrofotometrických metod. [18]



Obr. 1.4 Kyselina skořicová



Obr. 1.5 Kyselina t-4-hydroxyskořicová

1.3 Extrakce rostlinných vzorků

Extrakce kapalinou představuje výhodnou technikou předseparace. Vzorky rostlin jsou extrahovány nejčastěji vodou [18, 19], methanolem [20], ethanolem [21, 22], acetonitrilem, acetonem nebo hexanem [23]. Dále je možné používat i efektivnější metody extrakce rostlinných výtažků, například extrakci superkritickým CO₂, extrakci tlakovou kapalinou a ultrazvukovou asistenci. Tyto metody jsou rychlejší a efektivnější než ty tradiční a výhodou je menší spotřeba organických rozpouštědel. [3] Další ze specifických metod je maticová disperze v pevné fázi (MSPD). Tato technika kombinuje v jednom kroku homogenizaci vzorku a samotnou extrakci analyzovaných sloučenin. [23] Extrakce superkritickou tekutinou byla také použita jako postup extrakce rostlinného materiálu. [10]

Pro izolaci některých antioxidantů z rostlinného materiálu byla publikována metoda se směsí rozpouštědel methanol-voda, chloroformem a ethylacetátem. [4, 10, 24]

Speciálním případem je enzymaticky asistovaná extrakce, která si také získává velkou pozornost jako efektivní postup pro uvolňování bioaktivních látek z rostlin. Enzymy mohou účinně katalyzovat degradaci rostlinných buněčných stěn a upřednostňovat uvolňování bioaktivních složek obsažených uvnitř buněk. Dle Miron et al. [3] enzymatická extrakce představuje efektivnější způsob extrakce antioxidantů z listů meduňky než tradiční způsob extrakce kapalinou.

Neupouští se také i od způsobu extrakce pomocí zařízení zvaného Soxhletův extraktor. Tento typ extrakce je však časově velmi náročný. Do papírové patrony je vložena rostlinná část a z destilační baňky pomocí topného hnízda jsou postranní trubici vyvolávány páry rozpouštědla, které vlivem zpětného chladiče kondenzují. [20]

Jedním z účelů separace rostlinných tkání je získat extrakt dále používaný jako léčivé činidlo ve formě tinktur a extraktů z tekutin. Takto získané produkty z rostlin jsou relativně nečisté kapaliny označované také jako odvary nebo infuze. Druh extrakce, kterým může být tato forma extraktu připravena, nazýváme macerace. [25]

Pro dosažení nejvyššího obsahu antioxidantních látek byl na základě literatury vyhodnocen jako nejlepší zdroj extrakt z čerstvých listů meduňky, který obsahuje deriváty kyseliny hydroxyskořicové, flavonoidy, kyselinu kávovou a rosmarinovou a také kyselinu *m*-kumarovou, eriodictyol-7-O-glukosid, naringin, hesperidin, naringenin a hesperetin. Nejvyšší množství fenolových sloučenin bylo získáno při superkritické extrakci CO₂ při 10 MPa, 323 K po dobu 30 min. [5]

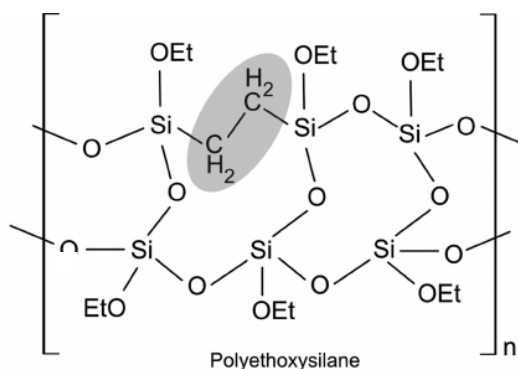
O extrakci v domácích podmínkách nebylo zatím nic publikováno, právě proto je na toto téma práce zaměřena.

1.4 UHPLC

Ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie (Ultra high performance liquid chromatography) je novou separační technikou vycházející z principu HPLC. Díky svému výkonu je velkým pokrokem v oblasti separace kapalinovou chromatografií. Tato technika disponuje možností použití většího rozsahu tlaků (do 120 MPa) a umožňuje tak separaci na malých částicích stacionární fáze (méně než 2,0 μm). Vykazuje vysokou účinnost separace a zvýšené rozlišení oproti klasickému HPLC. [26] Tyto vlastnosti výhodně zkracují celkové trvání analýzy, umožňují tak i zkrátit vývoj nové metody ze dnů na hodiny. Neposlední výhodou je snížení množství spotřeby mobilní fáze pro separaci.

V případě vzorků, které zahrnují celé komplexní spektrum látek, jako jsou např. přírodní extrakty, může zvýšené rozlišení poskytnout mnohonásobně víc informací.

Rovněž používané částice stacionární fáze prošly v poslední dekádě vývojem. Klasický silikagelový základ zajišťuje díky částicím s methylovými skupinami mechanickou sílu, vysokou účinnost a využitelnost v širokém rozmezí pH. Za účelem zlepšení mechanické stability byla vyvinuta technologie přemost'ovaného ethanového hydridu (BEH) (Obr. 1.6). [27–29]



Obr. 1.6 UHPLC kolona založené na technologii hybridního ethylenového můstku (BEH) [30]

1.5 UHPLC-MS

Hmotnostní spektroskopie je široce využívanou technikou při kvalitativních i kvantitativních analýzách. UHPLC ve spojení s MS detekcí dostává nový významný rozměr, kdy metoda vykazuje vysokou separační účinnost chromatografie. Spojením UHPLC s MS se zajistí snížení experimentální chyby a zvýší přesnost v případě kvality, ale především se získají informace o struktuře analytu.

Hmotnostní detekce je vhodná v případě složitějších směsí, kdy není dosaženo dokonalé separace, je zde spoléháno na signály m/z popřípadě fragmenty. Typicky se jedná o analýzy bylinného složení a identifikaci struktury, identifikaci metabolitů, vícesložkovou kvantitativní analýzu a farmakokinetiku, metabolomickou analýzu, které umožňují prozkoumat molekulární mechanismy terapeutických účinků rostlinných léčivých přípravků. [31] Aplikace UHPLC-MS by se také mohla použít pro případ studie rostlinných léčiv *in vivo* [32] nebo v analýzách rostlinných flavonoidů s důrazem na extrakci vzorků, separaci flavonoidů a detekci MS. [33]

Ve srovnání s jednoduchým MS tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) poskytuje významné výhody týkající se selektivity. Charakteristické fragmentační chování umožňuje identifikaci molekul nebo předběžnou charakterizaci chemických

složek, jelikož právě chybějící strukturní informace lze získat MS/MS spektrometrií. V případě použití žádané vícenásobné fragmentace lze odlišit různé látky, např. pro stanovení některých neurotransmiterů jako norepinefrin, dopamin, serotonin a normetanefrin. Tyto metody mohou být užitečné při diagnostice neurologických poruch a poruch mozku. [34]

1.6 Stanovení obsahu antioxidačních látek v *Melissa officinalis*

Ke stanovení celkové antioxidační aktivity fenolických sloučenin v rostlinách se používají určité typy spektrofotometrických metod. Jednou z možností jsou postupy založené na schopnosti zachytit syntetické volné radikály pomocí různých systémů generujících radikály a metod detekce koncového bodu oxidace. Konkrétně se jedná kolorimetrickou metodu Folin Ciocalteu, ABTS, DPPH, DMPD, CUPRAC či FRAP [7]. Bylo prokázáno, že vyšší antioxidační aktivita je ve vodě než ve ethanolickém extraktu. Tato skutečnost byla potvrzena testy DPPH a DMPD [18]. Dále bylo prokázáno, že kyselina rosmarinová má nejsilnější schopnost zachycovat DPPH a kyselina kávová nejvyšší účinnost v inhibici při oxidaci lipidů. [8]

Pro stanovení jednotlivých antioxidantů byl ve většině publikovaných studií použit HPLC systém s UV detekcí. Separace probíhala na koloně s C18 [2, 4, 10, 35] nebo C8 [18, 21]. Primárně byla používána gradientová eluce [2, 4, 10, 18, 21, 36], ale v některých případech bylo využito i isokratické eluce [19]. Mobilní fáze byla nejčastěji ve složení methanol nebo acetonitril a voda. Hodnota pH byla upravena kyselinou mravenčí nebo fosforečnou na pH = 2-3 [2, 4, 10, 18, 19, 21]. Průtoková rychlost 0,4–1,0 ml · min⁻¹ a dávkované množství vzorku extraktu 10–20 µl. [2, 10, 18], UV spektra byla zaznamenávána v rozmezí 200–550 nm. [10, 19]. Přehled publikovaných chromatografických metod je uveden v Tab. 1.1. Jediná publikovaná UHPLC separace probíhala na fenylové koloně a používala MF o složení acetonitril a mravenčanový pufr (pH = 3,8–4,74). Detekce pomocí PDA detektoru byla v rozmezí vlnových délek 275 až 345 nm. [20]

Dalším možným metodickým postupem stanovení antioxidantů v meduňce lékařské je plynová chromatografie (GC), která je však ve většině publikací využívána ke stanovení esenciálních těkavých olejů. Mezi metabolity, které byly zaznamenány a identifikovány

v meduňce pomocí GC-MS, byla mimo jiné i kyselina kávová, případně její deriváty. K separaci byla použita kolona na bázi nepolárního fenylarylenového polymeru o délce 30 m a vnitřním průměru 0,25 mm. Teplota nástřiku byla v rozmezí 230–280 °C. [6, 37]

Tab. 1.1 Přehled publikovaných chromatografických metod pro stanovení antioxidantních látek v *Melissa officinalis*

rostlinná část (čerstvá/sušená)	identifikované antioxidanty	stanovené množství	extrakční čínidlo	způsob stanovení	použitá SF	použitá MF	literatura
sušené listy	RA CAA	27,4 mg/g 0,3 mg/g	EtOH:H ₂ O	HPLC	C18	MeOH:H ₂ O	[2]
sušené listy	RA DCA	5–160,0 µg/ml 5–1000,0 µg/ml	EtOH:H ₂ O	HPLC- MS/MS	C18	ACN:H ₂ O	[3]
sušená	RA CAA	48,6 ± 0,8 mg/g 0,7 ± 0,1 mg/g	MeOH:H ₂ O	HPLC	C18	MeOH:H ₂ O	[4]
listy	CAA	—	MeOH:CCl ₃ :H ₂ O	GC-MS	DB-5MS	He	[6]
sušená	RA CAA	16,9 mg/g 1,9 mg/g	MeOH:H ₂ O	HPLC	C18	MeOH:H ₂ O	[10]
sušená	RA CAA	255,5 ± 11,1 mg/l 32,4 ± 1,3 mg/l	H ₂ O	HPLC	RX-C8	H ₂ O:ACN:MeOH	[18]
čerstvé i sušené	RA	suš.: 0,5–0,8 mg/ml čerst.: 0,1–0,4 mg/ml	H ₂ O	HPLC	C18	ACN:H ₂ O	[19]

rostlinná část (čerstvá/sušená)	identifikované antioxidanty	stanovené množství	extrakční čínidlo	způsob stanovení	použitá SF	použitá MF	literatura
sušená	RA CAA	12,2 % (<i>w</i>) 0,3 % (<i>w</i>)	MeOH	UHPLC	fenyl- hexyl	ACN:H ₂ O	[20]
listy	RA	1,78–4,35 %	EtOH	HPLC	SB-C18	MeOH:H ₂ O	[21]
čerstvá	RA CAA	0,5 ± 0,1 mg/g 14 ± 2 mg/g	EtOH	HPLC	C18	ACN:H ₂ O	[22]
sušená	RA CAA	16,8 mg/g 88,8 µg/g	MeOH:H ₂ O	HPLC	C18	MeOH:H ₂ O	[23]
listy	RA CAA	919,3 ± 84,1 ng/ml 12,6 ± 2,9 ng/ml	MeOH:H ₂ O	HPLC	C18	MeOH:H ₂ O	[24]
sušená	RA CAA	21 ± 2,3 mg/g 0,2 ± 3,7 mg/g	H ₂ O	HPLC	C18	MeOH:H ₂ O	[35]

*RA – kyselina rosmarinová, CAA – kyselina kávová
(zaměřeno na látky studované v této diplomové práci)

1.7 Validace chromatografické metody

„Validace je postup používaný k prokázání toho, že testovaná metoda důsledně poskytuje to, co se od ní očekává a co se od ní vyžaduje, s dostatečnou přesností a precizností." [38] Slouží k ověření metody při výzkumu, vývoji, řízení procesu či kontrole kvality. Ověření se skládá z plánování, experimentální části a dokumentace. Na základě terminologie se ověřují následující kritéria: přesnost, mez stanovitelnosti, mez detekce, linearita, specificita, citlivost a robustnost. Nutno posoudit proveditelnost nebo přenositelnost mezi laboratořemi.

U linearity je požadavkem, aby hodnoty byly v mezích spolehlivosti regresní přímky. Slouží nám pro výpočet koncentrace neznámého analytu v reálných vzorcích. Korelační koeficient, kromě stopových analýz, by měl být obvykle větší než 0,99. Tvar kalibrační rovnice popisuje Rovnice 1.1:

$$y = bx + a \quad (1.1)$$

kde y je měřená odezva (výška, plocha, absorbance); x je koncentrace analytu; b je směrnice a a je úsek na ose y .

Pro měření kalibračních křivek je nutno zvolit dostatečný koncentrační rozsah. U chromatografických analýz rostlinných extraktů jsou očekávány vyšší koncentrační rozmezí, a proto je nutné připravit kalibrační křivku s více koncentračními úrovněmi.

Citlivost je parametrem popisujícím, jak moc se mění odezva při změně koncentrace analytu. Závisí na povaze analytu a detekční technice.

Limit detekce (LOD) popisuje nejmenší koncentraci analytu ve vzorku, kterou lze oddělit od šumu pozadí přístroje použitého pro měření. Hodnoty LOD jsou vyjádřeny v jednotkách analytických výsledků jako trojnásobek šumu.

Limit stanovitelnosti (LOQ) je ukazatel, který udává minimální hodnotu hladiny analytu, kterou lze měřit s přijatelnou přesností. Volí se úroveň koncentrace produkující signál přesahující desetinásobek relativní standardní odchylky šumu nebo šumu slepého vzorku.

Preciznost, též nazývaná jako opakovatelnost, se měří opakovaným testováním stejného vzorku. Směrodatná odchylka těchto nezávislých stanovení poskytuje odhad přesnosti testování.

Přesnost (výtěžnosti) dokazuje, že žádné interferující sloučeniny neovlivňují hodnoty zkoumaných sloučenin. Dává nám informaci, jak blízko je naměřená hodnota hodnotou „správná, skutečná“. Musí být prokázána specificita detekce a selektivita separace. Tento parametr studujeme na základě porovnání výsledků metody s výsledky získanými pro stejný vzorek s referenční metodou, analýzou certifikovaných referenčních materiálů (CRM), standardních referenčních materiálů (SRM) nebo zkouškami výtěžnosti. Zkoušky výtěžnosti jsou prováděny přípravou zkušebních vzorků na příslušných koncentračních úrovních analytu. Následně se vzorky zpracují a vypočtou se procenta zpětně získaného množství. Tzv. „spiking“ je nejběžnější metodou pro vyhodnocení přesnosti, protože referenční materiály nejsou obvykle k dispozici a druhá analytická metoda nemusí být snadno dostupná. Matrice pak zůstane téměř konstantní. [39]

Opakovatelnost je odhad přesnosti metody v situaci, kdy je stejný vzorek analyzován stejným postupem, stejným nástrojem, v krátkém časovém intervalu a stejným analytikem. Parametr udávající stupeň spolehlivosti je obvykle roven 95 % nebo vyšší než tato hodnota.

Robustnost určuje stabilitu, tedy do jaké míry lze provést změny, aniž by došlo ke snížení spolehlivosti metody. Toto kritérium je považováno za výkonnostní, tj. určující praktičnost a přenositelnost metody. Cílem je změnit parametry metody kontrolovaným způsobem a tímž způsobem následně lokalizovat kritické limity. [38, 40, 41]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie

Kyselina mravenčí (čistota $\geq 98,0$ %, Honeywell, Německo)

Kyselina octová (čistota $\geq 96,0$ %, Merck, Německo)

Kyselina rosmarinová (čistota 96,0 %, Sigma Aldrich, USA)

Kyselina skořicová (čistota 98,0 %, Acros Organics, USA)

Kyselina kávová (čistota 99,0 %, Acros Organics, USA)

Kyselina *t*-4-hydroxyskořicová (čistota 98,0 %, Acros Organics, USA)

Acetonitril CHROMASOLV[®] (gradient grade $\geq 99,9$ %, Honeywell, Německo)

Methanol CHROMASOLV[®] (gradient grade $\geq 99,9$ %, Honeywell, Německo)

Ethanol CHROMASOLV[®] (gradient grade $\geq 99,9$ %, Honeywell, Německo)

Deionizovaná voda upravená pomocí přístroje Milli-Q plus (Millipore, USA)

2.2 Použité přístroje

UHPLC Acquity H-Class Waters s QDa detektorem (USA)

Analytické váhy 262 SMA-FR, Precisa (Švýcarsko)

pH metr – konduktometr Jenway 3540 Bibby Scientific (Velká Británie)

Vortex, Chromservis (Česká republika)

2.3 Příprava extraktů z meduňky

Melissa officinalis byla vypěstována v domácích podmínkách při pokojové teplotě v rozsahu 19–23 °C (osivo firmy MoravoSeed[®]). Pro extrakci byly použity čerstvé části byliny, konkrétně listy a stonky.

Jako rozpouštědla pro extrakci meduňky byly zvoleny ethanol a voda. Extrahováno bylo vždy 10 g čerstvé rostliny ve 100 ml rozpouštědla. Extrakce byla prováděna v prostředí s denním světlem a v prostředí bez přístupu světla, vždy po dobu 1 až 10 dní. Extrakční

směs byla každý den ručně protřepávána po dobu 1,5 min. Každý den byly odebrány 2 ml extraktu k analýze. Celkem bylo připraveno 40 extraktů lišících se dobou extrakce, rozpouštědlem a světelnými podmínkami extrakce.

Před UHPLC-MS analýzou byl extrakt vždy 10x zředěn methanolem a přefiltrován přes PTFE filtr s velikostí pórů 0,45 μm .

2.4 Příprava komerčně dostupných čajů

Postup přípravy čaje byl dodržen dle instrukcí výrobce. Sáček byl zalit 250 ml vroucí vody a nechán 10–15 min louhovat. Vylouhovaný extrakt čaje byl následně 10x zředěn methanolem a přefiltrován přes PTFE filtr.

2.5 Příprava standardních roztoků

Zásobní roztoky standardů o koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním vypočteného množství standardu v methanolu a skladovány v lednici při teplotě 5 $^{\circ}\text{C}$. Vzhledem ke stabilitě kyselin, zejména kyseliny rozmarinové, byly každých 14 dní připraveny standardy nové.

2.6 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky standardů byly připraveny v koncentračním rozmezí 0,05–1,0 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ postupným ředěním standardního roztoku. Koncentrace v jednotkách $\text{mmol}\cdot\text{ml}^{-1}$ jednotlivých kyselin jsou uvedeny v Tab. 2.1.

Tab. 2.1 Koncentrace kalibračních roztoků

c (mg·ml ⁻¹)	CA c (mmol·l ⁻¹)	CAA c (mmol·l ⁻¹)	<i>t</i> HCA c (mmol·l ⁻¹)	RA c (mmol·l ⁻¹)
1	6,75	5,55	6,09	2,78
0,2	1,35	1,11	1,22	0,56
0,1	0,67	0,56	0,61	0,28
0,05	0,34	0,28	0,30	0,14
0,01	0,07	0,06	0,06	0,03
0,005	0,03	0,03	0,03	0,01

*CA – kyselina skořicová, CAA – kyselina kávová, *t*HCA – kyselina *t*-4-hydroxyskořicová, RA – kyselina rosmarinová

2.7 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze sestávala z methanolu (složka A) s přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí a vodné složky, jejíž pH bylo upraveno přidavkem 0,1% kyseliny mravenčí na hodnotu pH = 2,6 (složka B). Hodnota pH byla upravena pomocí pH metru Jenway 3540.

2.8 Chromatografické podmínky

Separace a detekce analytů byla prováděna pomocí systému Waters Acquity UPLC H-class (USA), který byl vybaven PDA absorpčním detektorem (rozsah λ v intervalu 210–400 nm) a QDa detektorem nastaveným v negativním módu (hmotnostní rozsah 100.00–250.00 Da). Sběr dat QDA detektorem probíhal od 0,01 min do 7 min analýzy. Použita byla kolona BEH C18 (2,1 mm × 100 mm, velikost částic 1,7 μ m). Tlakový limit byl nastaven na 12 000 psi. Chromatografická data byla shromážděna a zpracovávána pomocí chromatografického softwaru Waters® Empower2.

Optimalizovaná mobilní fáze sestávala z metanolu (složka A) a vodného roztoku 0,1% kyseliny mravenčí o pH 2,6 (složka B). Poměr složek se měnil dle gradientového programu, který trval 6 min a celková doba analýzy i s ekvilibrací trvala 7 min. (Tab. 2.2). Průtok mobilní fáze byl 0,25 ml·min⁻¹, teplota kolony 30 °C, teplota dávkovače 20 °C a dávkovaný objemu vzorku 1 μ l.

Tab. 2.2 Optimální gradientový program

t/min	φ (A)%	φ (B)%
0	20	80
2,0	70	30
4,0	70	30
4,5	20	80
6,0	20	80

*φ (A)% = methanol; φ (B)% = vodná složka

2.9 Analytické zpracování dat

2.9.1 Kalibrační závislost

Pomocí optimalizované metody byly změřeny kalibrační sady standardů v koncentračním rozmezí 0,005–1,00 mg·ml⁻¹, které pokrývaly rozsahy koncentrací očekávané v roztocích vzorků. Následně po integraci ploch píků byly sestaveny kalibrační křivky jednotlivých kyselin vynesemím koncentrace standardu proti hodnotám ploch píků.

2.9.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) byla vypočtena dle Rovnice 2.1:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot h_n}{m} \quad (2.1)$$

Mez stanovitelnosti (LOQ) byla vypočtena dle Rovnice 2.2:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot h_n}{m} \quad (2.2)$$

kde h_n je šum základní linie a m je směrnice kalibrační křivky, která je sestrojena v závislosti výšky píku na koncentraci standardu. [42]

2.9.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla ověřena na 10 následných měřeních pro dvě koncentrační úrovně (0,05 mg·ml⁻¹; 0,0001 mg·ml⁻¹). Opakovatelnost byla vyhodnocena pomocí směrodatné odchylky (Rovnice 2.3) a relativní směrodatné odchylky RSD (Rovnice 2.4) zjištěných ploch píků.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.3)$$

$$\text{RSD} = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \cdot 100 \quad (2.4)$$

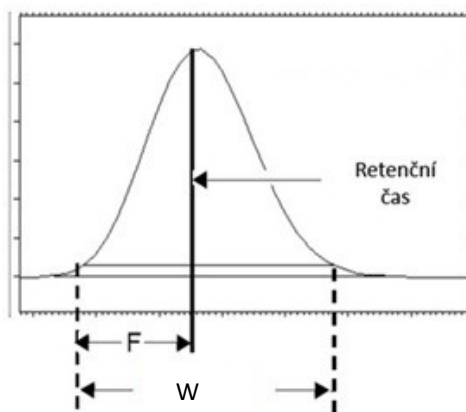
kde x_i je i -tý prvek ze statistického souboru, \bar{x} je aritmetický průměr hodnot signálů, n je počet měření, s je medián měření. Pokud je hodnota RSD ≤ 2 %, pak je metoda považována za přesnou. [41, 43]

2.9.4 Robustnost

Robustnost metody byla ověřena pro změnu pH o +/- 0,2 jednotky pH použitím nižší, resp. vyšší koncentrace kyseliny mravenčí, změnu teploty o +/- 5 °C a změnu poměru MeOH: H₂O v gradientovém programu o +/- 2 % (v/v). Sledován byl retenční čas, rozlišení kritického páru kyselin a dále tzv. USP tailing factor, který stanovuje maximální přípustnou asymetrii. Je definován jako podíl šířky píku v 5% výšky píku děleno dvojnásobkem pološířky píku (Obr. 2.1). USP tailing faktor byl vypočten dle Rovnice 2.5:

$$T = \frac{W}{2 \cdot F} \quad (2.5)$$

kde T je Tailing faktor, W je šířka píku při 5 % výšky píku, F je čas od počátečního bodu šířky při 5 % vrcholu výška do t_R . [44]



Obr. 2.1 Schéma popisující výpočet asymetrie píku. Převzato a upraveno z [44]

2.9.5 Výtěžnost

Výtěžnost byla ověřena na základě přidavku standardu o známém objemu a koncentraci nazývané v literatuře také jako „spike“. Množství 10 μl standardu kyseliny o koncentraci $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bylo přidáno do vodného extraktu, aby se otestovalo, zda je odezva na vzorek stejná jako odpověď očekávaná z kalibrační křivky.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Vývoj a optimalizace metody

Pro vývoj metody byla zvolena technika UHPLC, disponující vysokou účinností separace, která byla vyvinuta a optimalizována pro stanovení antioxidantů v extraktech z *Melissa officinalis*. Pro separaci vybraných antioxidačních látek byla v této studii na základě literární rešerše zvolena reverzní fáze typu C18. Jako počáteční podmínky byly zvoleny: teplota kolony byla zvolena 30 °C. Pro detekci látek byl nastaven rozsah detektoru UV-VIS $\Delta\lambda = 200\text{--}400$ nm a MS v negativním módu, aby byly zaznamenány disociované formy fenolických kyselin po ztrátě vodíku. Mobilní fáze sestávala z methanolu a vodného roztoku kyseliny mravenčí o pH = 2,5 a následně použita v gradientovém programu. Pro separaci vybraných standardů byly vybrány vlnové délky detektoru 220, 260 a 280 nm. Studované fenolické kyseliny absorbují při 260 nm více než veškeré kyseliny při 280 a 320 nm. Proto byla pro další separaci a kvantifikaci studovaných fenolických kyselin zvolena jako kompromis vlnová délka 260 nm. Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na $0,25\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Při této rychlosti byl udržen tlak na koloně pod hranicí $p = 10\,000$ psi a nedocházelo tak k překročení tlakového limitu kolony.

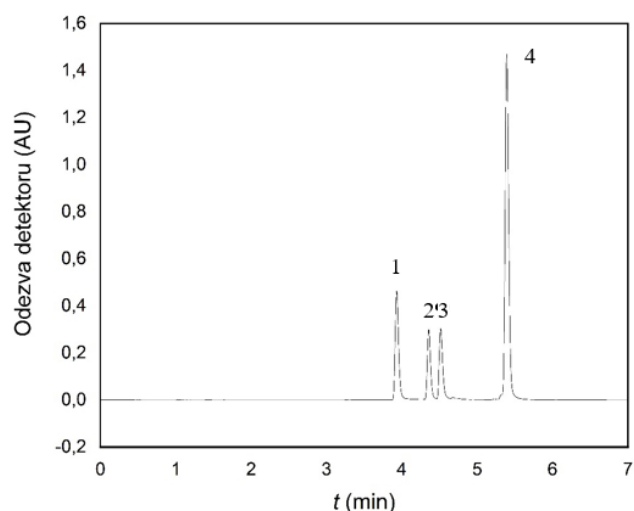
Po výběru vhodného vlnové délky, rychlosti průtoku MF kolonou následovalo testování optimálního typu programu pro eluci analytů. Byl vyzkoušen isokratický program, kde MF byla ve složení MeOH:H₂O v poměru 30:70 (v/v). Druhá vyzkoušená varianta MF v isokratickém programu byla ve složení MeOH:H₂O v poměru 50:50 (v/v). V případě MF MeOH:H₂O v poměru 30:70 (v/v) docházelo k výraznému zvýšení doby eluce posledního analytu (kyseliny skořicové), která překračovala 10 min. V případě MF o složení MeOH:H₂O v poměru 50:50 (v/v) se retenční čas zkrátil na $t_R = 3,767$, avšak projevilo se nežádoucí rozmývání píků. Na základě získaných informací byl změněn typ programu na gradientový. Pro optimalizaci gradientového programu byly testovány různé programy lišící se dobou eluce (rozmezí 7–15 min), rychlostí změny složení a také počáteční a finální koncentrací MeOH (MeOH:H₂O = 30:70; MeOH:H₂O = 20:80).

Jako optimální byl vybrán gradientový program popsáný na str. 28, v Tab. 2.2, jelikož v tomto modu bylo dosaženo nejlepší symetrie píků a nejkratších retenčních časů za současného zachování rozdělení všech píků až na základní linii.

Bylo optimalizováno vhodné pH mobilní fáze. Pro optimalizaci byla vybrána kyselina mravenčí a kyselina octová. Kyselina octová měla ve vodné složce MF hodnotu $\text{pH} = 3,3$. Kyselina mravenčí měla ve vodné složce MF měla hodnotu $\text{pH} = 2,5$. V případě použití kyseliny octové byla prokázána rychlejší separace jednotlivých analytů, tedy nižší t_R jednotlivých kyselin, ale zhoršila se symetrie píků. Pomocí kyseliny mravenčí bylo dosaženo lepší intenzity píku, vyšší symetrie, ale v případě kyseliny kávové a kyseliny skořicové delších t_R . Jako optimálnější byla zvolena kyselina mravenčí.

Dále byl testován vliv teploty kolony při 20 °C, 30 °C a 40 °C na separační proces. Jako optimální byla vyhodnocena teplota 30 °C, při které měla většina píků v chromatogramech vyhovující rozlišení, všechny analyty byly separovány až na základní linii Teplota 20 °C a 40 °C u kyselin ovlivnila selektivitu separace z hlediska zdržení některých analytů na koloně a také snížila nepatrně rozlišení píků, proto bylo nutno zvolit kompromis. Z naměřených dat je zřejmé, že s rostoucí teplotou na koloně klesá retenční čas t_R jednotlivých analytů.

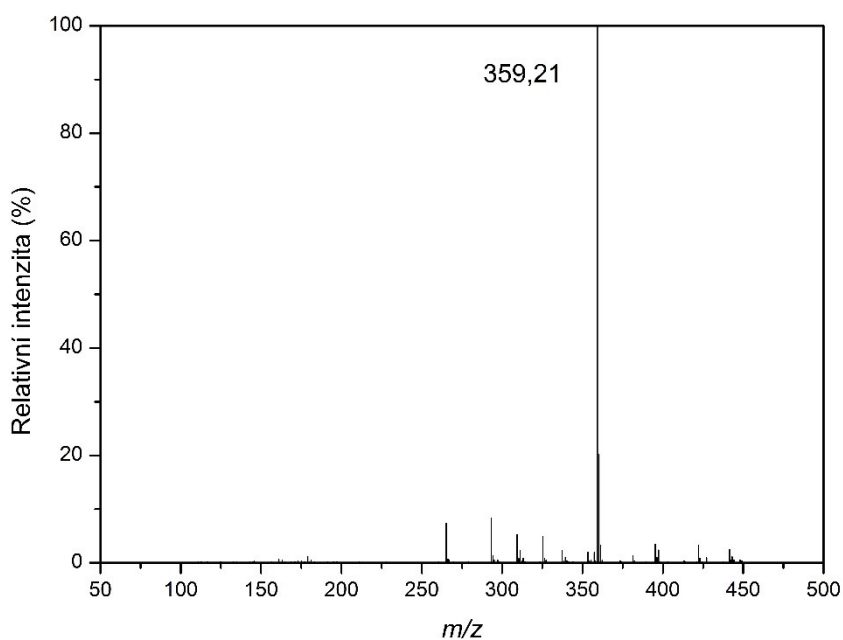
Chromatogram směsi čtyř vybraných karboxylových kyselin po optimalizaci všech důležitých parametrů je uveden na Obr. 3.1.



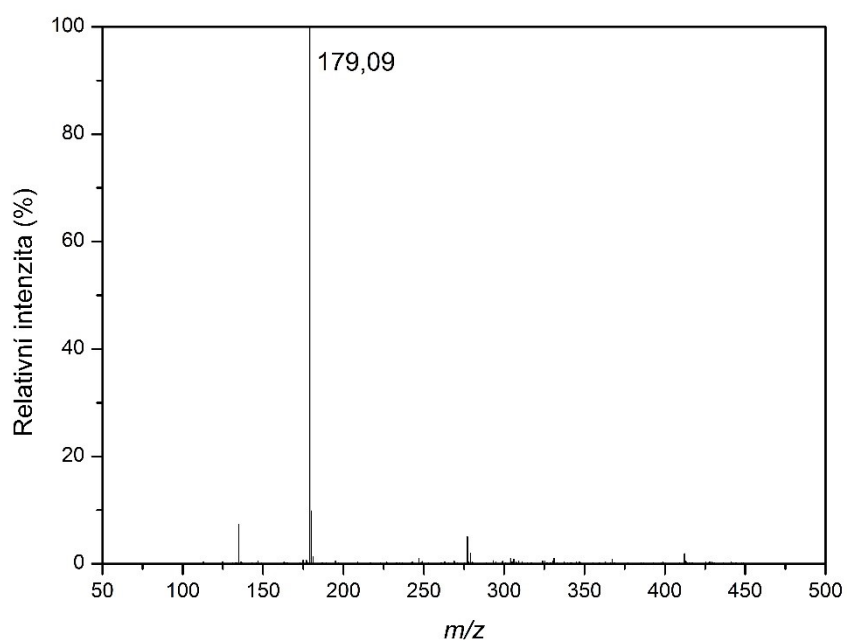
Obr. 3.1 Chromatogram separace standardů kyselin

Měřeno za optimálních podmínek. 1 – kyselina kávová, 2 – kyselina t-4-hydroxyskořicová, 3 – kyselina rosmarinová, 4 – kyselina skořicová

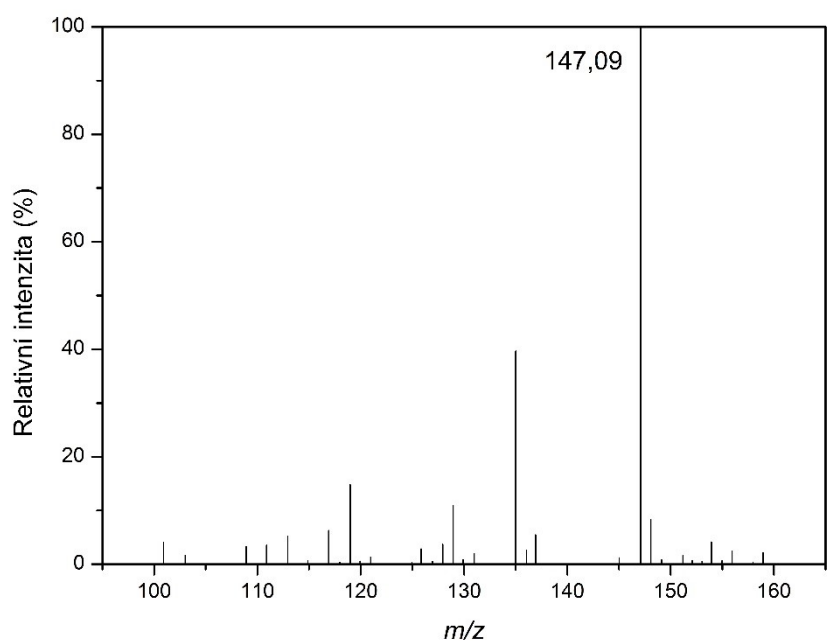
V rámci kvalitativní analýzy byla provedena hmotnostní detekce antioxidantů v meduňce. Celé měření bylo prováděno v negativním módu v hmotnostním rozsahu 100,00 – 250,00 Da. Mono-kvadrupól, který byl použit neumožňoval fragmentační spektra pro lepší potvrzení struktury. Pro každou kyselinu bylo změřeno MS spektrum, které sloužilo k identifikaci antioxidantů v extraktech. Na Obr. 3.2 můžeme vidět hmotnostní spektrum kyseliny rosmarinové ($m/z = 359,21$). Kyselina rozmarinová společně s kyselinou kávovou ($m/z = 179,09$) (Obr. 3.3) byla prokázána v každém ethanolickém extraktu a také ve všech 3 komerčně dostupných čajích. Přítomnost kyselina skořicové (Obr. 3.4) byla potvrzena pouze v ethanolických extraktech. Kyselina *t*-4-hydroxyskořicová (Obr. 3.5) nebyla prokázána ani v extraktech ani v čaji.



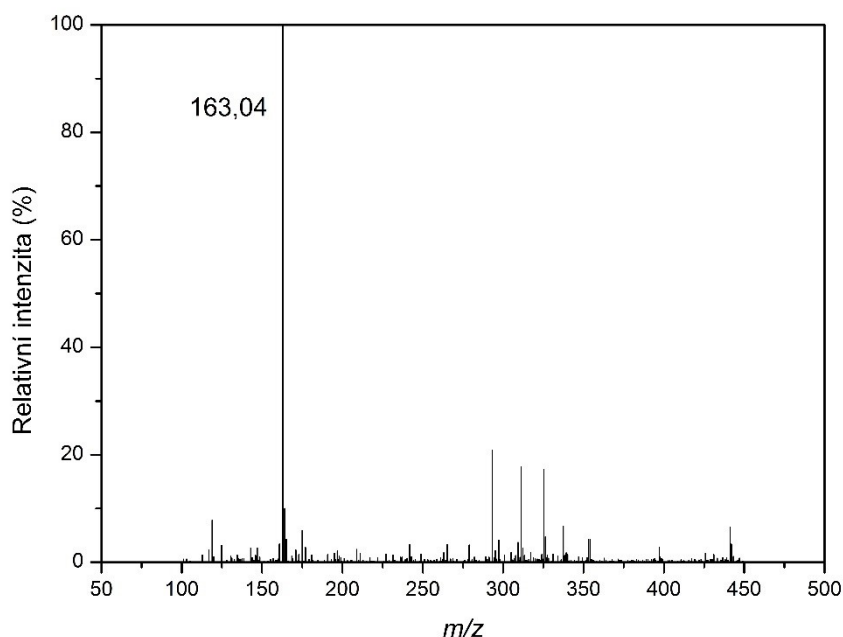
Obr. 3.2 Hmotnostní spektrum kyseliny rosmarinové



Obr. 3.3 Hmotnostní spektrum kyseliny kávové



Obr. 3.4 Hmotnostní spektrum kyseliny skořicové



Obr. 3.5 Hmotnostní spektrum kyseliny t-4-hydroxyskořicové

3.2 Validace metody

3.2.1 Opakovatelnost

Po optimalizaci bylo provedeno validování metody. Opakovatelnost metody byla ověřena na 10 následných měření pro dvě koncentrační úrovně ($0,05 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; $0,0001 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a vypočtena dle směrodatné odchylky (Rovnice 2.3) a relativní směrodatné odchylky (Rovnice 2.4). Pro koncentrační úroveň $0,05 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ se RSD retenčního času pohybuje v intervalu 0,22-1,08 % a RSD pro plochu píku v rozsahu 0,72-2,26 %. Pro koncentrační úroveň $0,0001 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ se RSD retenčního času pohybuje v intervalu 0,07-1,12 % a RSD pro plochu píku v rozsahu 0,72-2,26 %. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3.1 a Tab. 3.2.

Tab. 3.1 Opakovatelnost měření při koncentrační úrovni 0,05 mg·ml⁻¹

tr/min	s/min	RSD/%	plocha píku	s/μV·s	RSD/%
CAA	0,04	1,09	CAA	6991	2,26
tHCA	0,02	0,53	tHCA	4056	1,55
RA	0,01	0,22	RA	3091	1,38
CA	0,02	0,36	CA	7733	0,72

*CA – kyselina skořicová, CAA – kyselina kávová, tHCA – kyselina *t*-4-hydroxyskořicová, RA – kyselina rosmarinová

Tab. 3.2 Opakovatelnost měření při koncentrační úrovni 0,0001 mg·ml⁻¹

tr	s/min	RSD/%	plocha	s/μV·s	RSD/%
CAA	0,004	0,12	CAA	89	1,81
tHCA	0,003	0,06	tHCA	106	2,65
RA	0,003	0,07	RA	87	2,41
CA	0,004	0,07	CA	150	0,91

*CA – kyselina skořicová, CAA – kyselina kávová, tHCA – kyselina *t*-4-hydroxyskořicová, RA – kyselina rosmarinová

3.2.2 Kalibrační křivky, hodnoty LOD a LOQ

Pomocí optimalizované metody byly dále změřeny kalibrační křivky jednotlivých kyselin v koncentračním rozmezí 0,005–1,00 mg·ml⁻¹. Kalibrační křivka pro kyselinu kávovou je uvedena na Obr. 3.6 a pro kyselinu *t*-4-hydroxyskořicovou na Obr. 3.7. V případě kalibračních křivek kyseliny rosmarinové (Obr. 3.8) a kyseliny skořicové (Obr. 3.9) nebyl zahrnut bod pro koncentraci 1,00 mg·ml⁻¹, jelikož při této koncentraci byl překročen rozsah detektoru a docházelo tak k nepříznivému ovlivňování linearitu kalibrace. Jednotlivé rovnice regresí kalibračních křivek a jejich koeficienty determinance (r^2) jsou uvedeny v Tab. 3.3 společně s hodnotami limity detekce (LOD) a limity stanovitelnosti (LOQ). Hodnoty relativních směrodatných odchylek ploch z kalibračních křivek jednotlivých kyselin jsou uvedeny v Tab. 3.4.

Tab. 3.3 Parametry kalibračních křivek pro jednotlivé kyseliny

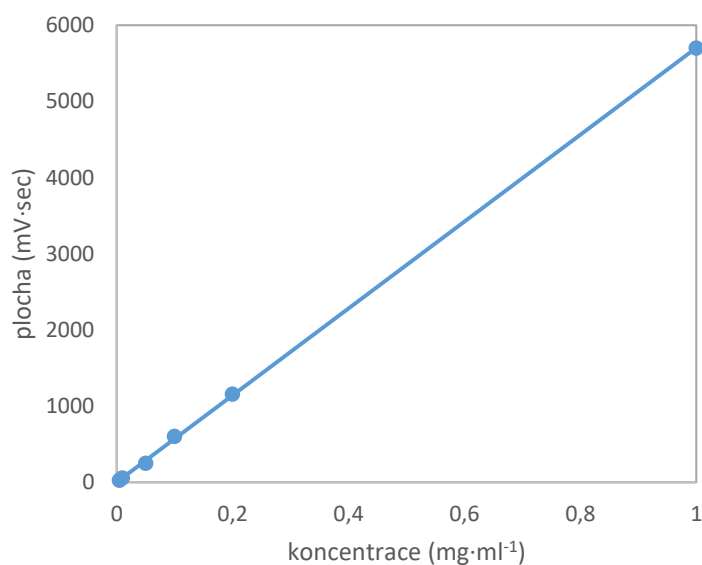
Standard	rovnice regrese	koeficient r^2	LOD ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	LOQ ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)
RA	$y = 11\,369,5x - 61,9$	0,995	0,0013	0,0096
CA	$y = 23\,2440x - 25,9$	0,997	0,0007	0,0095
CAA	$y = 5\,700,8x + 1,93$	0,999	0,0029	0,0044
<i>t</i> HCA	$y = 5\,335,2x + 7,81$	0,999	0,0029	0,0022

*CA – kyselina skořicová, CAA – kyselina kávová, *t*HCA – kyselina *t*-4-hydroxyskořicová, RA – kyselina rosmarinová

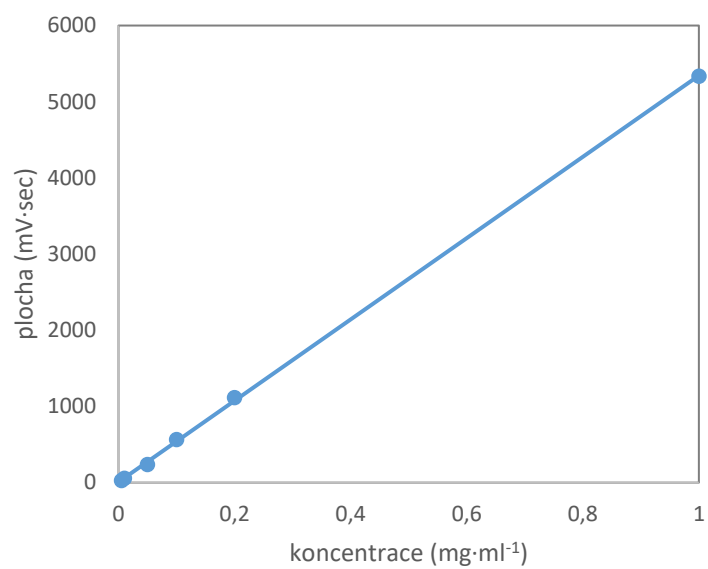
Tab. 3.4 Hodnoty relativních směrodatných odchylek ploch kalibrační křivky

c ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	RSD/% CAA	RSD/% <i>t</i> HCA	RSD/% RA	RSD/% CA
1	1,13	0,33	0,43	0,15
0,2	0,82	0,54	18,53	1,01
0,1	1,85	0,57	9,09	0,54
0,05	1,87	1,50	0,54	0,41
0,01	1,12	0,36	15,36	1,10
0,005	2,18	3,25	1,99	1,43

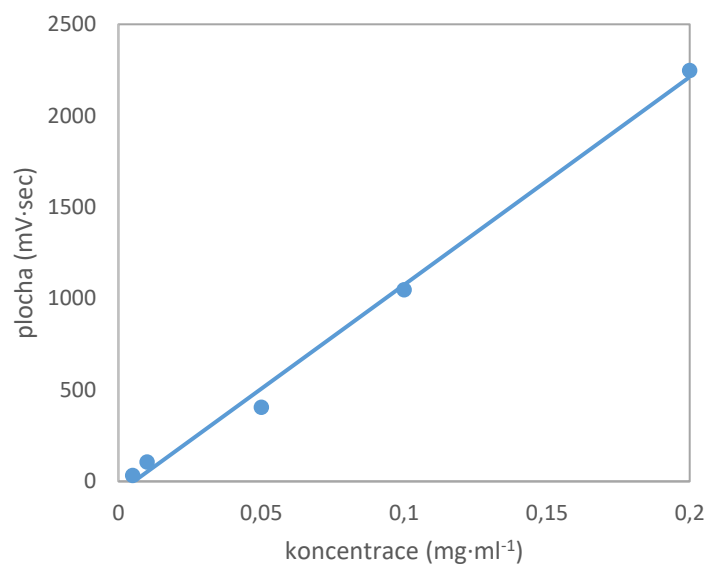
*CA – kyselina skořicová, CAA – kyselina kávová, *t*HCA – kyselina *t*-4-hydroxyskořicová, RA – kyselina rosmarinová



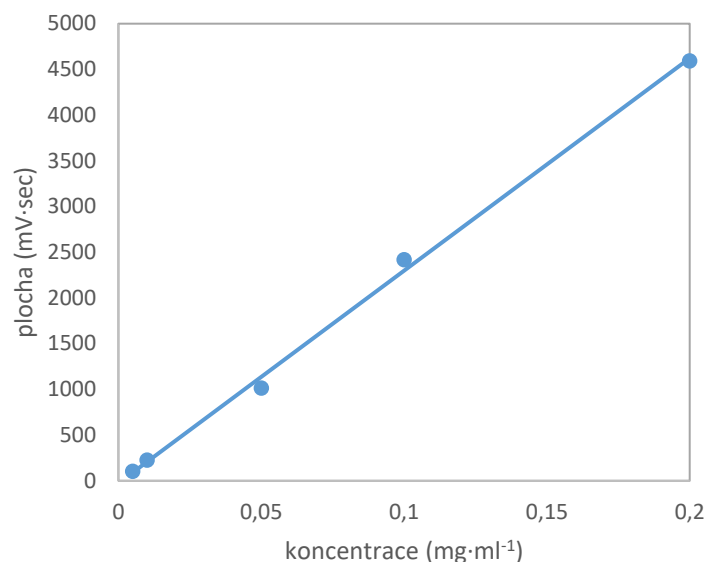
Obr. 3.6 Kalibrační křivka kyseliny kávové



Obr. 3.7 Kalibrační křivka *t*-4-hydroxyskořicové kyseliny



Obr. 3.8 Kalibrační křivka kyseliny rosmarinové



Obr. 3.9 Kalibrační křivka kyseliny skořicové

Na základě publikovaných prací lze konstatovat, že bylo v této studii dosaženo vyšších hodnot LOD a LOQ než při UHPLC analýze publikované Komes, D. et al. [20] nebo HPLC analýze publikované Wang H. et al. [2].

3.2.3 Robustnost

Robustnost metody byla ověřena pro změnu pH o +/- 0,2 jednotky pH, teploty o +/- 5 °C a poměru MeOH:H₂O v gradientu o +/- 2 % (v/v). Sledován byl retenční čas, rozlišení kritického páru kyselin a symetrický faktor USP Tailling. Hodnoty robustnosti byly vypočteny jako procentuální změna mediánu tří měření od hodnoty získané při měření optimální metodou. Na základě vypočtených hodnot uvedených v Tab. 3.5 lze usuzovat z pohledu t_R , že je metoda méně robustní při změnách teploty, avšak změny pH či obsahu MeOH v mobilní fázi neměli veliký vliv na analýzu. V případě hodnocení asymetričnosti na základě hodnot (Tab. 3.6) faktoru USP Tailling můžeme říct, že je metoda méně robustní při změnách obsahu MeOH v mobilní fázi a při změnách teploty, ale při změně pH nebyl zjištěn veliký vliv na symetrii. Kyselina rosmarinová nebyla součástí testování robustnosti z důvodu malého množství standardu.

Tab. 3.5 Vypočtené hodnoty změn retenčního času v % při testování robustnosti metody

provedené změny	0,2 mg·ml ⁻¹			provedené změny	0,01 mg·ml ⁻¹		
	CAA (%)	tHCA (%)	CA (%)		CAA (%)	tHCA (%)	CA (%)
+5 °C	-9	-7	-5	+5 °C	-3	-2	-2
-5 °C	+4	+3	+3	-5 °C	+8	+6	+5
+2% MeOH	-5	-4	-4	+2% MeOH	-3	-2	-2
-2% MeOH	+1	+1	+2	-2% MeOH	+5	+4	+4
+0,2 pH	-2	-2	-1	+0,2 pH	+2	+2	+1
-0,2 pH	-4	-3	-2	-0,2 pH	0	0	0

*CA – kyselina skořicová, CAA – kyselina kávová, tHCA – kyselina *t*-4-hydroxyskořicová

Tab. 3.6 Vypočtené hodnoty faktoru USP Tailing v % při testování robustnosti metody

provedené změny	0,2 mg·ml ⁻¹			provedené změny	0,01 mg·ml ⁻¹		
	CAA (%)	tHCA (%)	CA (%)		CAA (%)	tHCA (%)	CA (%)
+5 °C	-4	-2	1	+5 °C	-3	-2	0
-5 °C	4	-1	-1	-5 °C	4	-1	-1
+2% MeOH	-5	-5	1	+2% MeOH	-3	-4	0
-2% MeOH	-2	-6	-1	-2% MeOH	1	-3	-2
+0,2 pH	1	-3	2	+0,2 pH	-2	-1	-3
-0,2 pH	3	-2	4	-0,2 pH	-1	0	-2

*CA – kyselina skořicová, CAA – kyselina kávová, tHCA – kyselina *t*-4-hydroxyskořicová

V rámci robustnosti bylo testováno rozlišení kritického páru. Pro vyhodnocení rozlišení kritického páru byl vybrán pár kyselina kávová a kyselina *t*-4-hydroxyskořicová. Na základě získaných hodnot změny rozlišení v % lze říct, že největší změna nastává

v případě změny teploty. I tak dojde k separaci až na základní linii. Jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v Tab. 3.7.

Tab. 3.7 Hodnoty rozlišení kritického páru CAA a tHCA

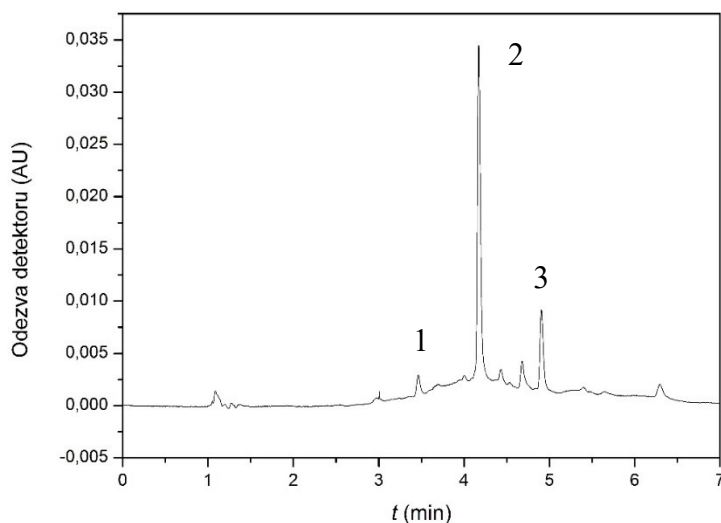
<i>R</i> (%)	+5 °C	-5 °C	+2% MeOH	-2% MeOH	+0,2 pH	-0,2 pH
0,2 mg·ml ⁻¹	11	-6	5	2	3	4
0,01 mg·ml ⁻¹	4	-9	1	-3	0	0

3.2.4 Výtěžnost

V závěru byla v rámci validace metody testována výtěžnost. Dle popsaného postupu v experimentální části byl vybrán jako vhodný vodný extrakt, jelikož v něm nebyla potvrzena přítomnost žádné z vybraných fenolických kyselin, a proto jej bylo možné použít k tomuto účelu. Bylo přidáno vždy spike 10 µl každé kyseliny o koncentraci 0,01 mg·ml⁻¹. Výsledné hodnoty koncentrací vypočtené dle příslušných rovnic kalibračních rovnic uvedených v Tab. 3.3 jsou: kyselina skořicová o $c = 0,0119 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, kyselina kávová o $c = 0,0101 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, kyselina *t*-4-hydroxyskořicová o $c = 0,0095 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a kyselina rosmarinová o $c = 0,0091 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Bylo zjištěno, že procentuální hodnota výtěžnosti kyseliny skořicové je 118,7 %, kyseliny kávové 99,5 %, kyselinu *t*-4-hydroxyskořicovou 105,2 % a kyseliny rosmarinové 109,5%. Dle uvedených hodnot koncentrací a procent lze říci, že je metoda přesná a hodnoty výtěžku se shodují s přidaným množstvím standardu.

3.3 UHPLC stanovení antioxidantních látek v extraktech z meduňky

Optimální metodou bylo celkem proměřeno 20 vodných, 20 ethanolických extraktů a 3 extrakty ze zakoupených čajů. Bylo zjištěno, že studované tři ze čtyř očekávaných fenolických kyselin se nacházely pouze v ethanolických extraktech. Jedná se konkrétně o kyselinu kávovou, kyselinu rosmarinovou a kyselinu skořicovou. Ve vodných extraktech přítomnost těchto látek detekována nebyla. Na Obr. 3.10 je pro ilustraci znázorněn chromatogram ethanolického extraktu, který byl extrahován za přístupu denního světla po dobu 10 dní. Při separaci nedocházelo k interferenci rostlinné matrice.

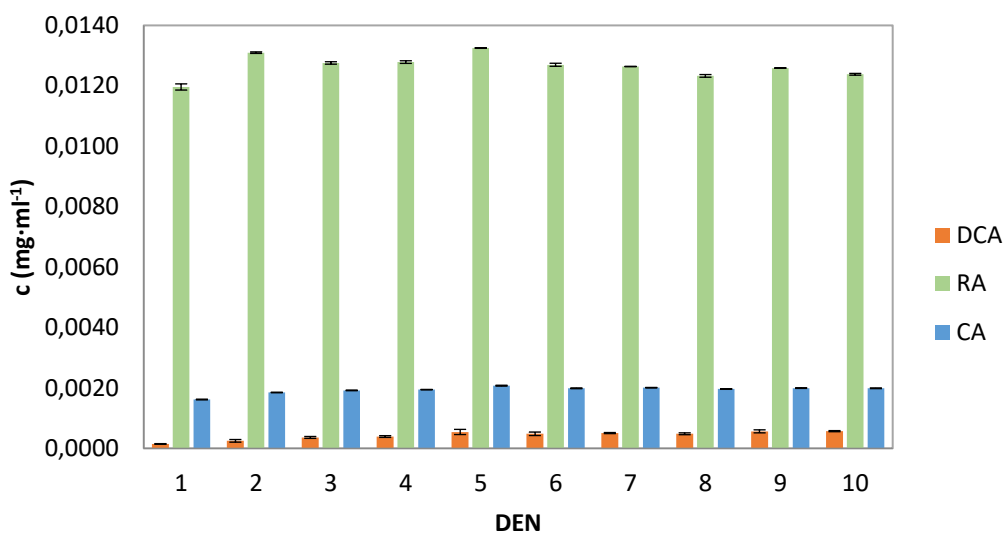


Obr. 3.10 Chromatogram ethanolickeho extraktu (10. den; denni svetlo). Měreno optimální metodou.

1 – kyselina kávová, 2 – kyselina rosmarinová, 3 – kyselina skořicová

Byly vypočteny koncentrace jednotlivých kyselin v extraktech z *Melissa officinalis*, které jsou zobrazeny na Grafu 3.1. Maximálního množství jednotlivých kyselin bylo dosaženo zhruba 5. den a dále se koncentrace již prakticky neměnily. Z grafu je zjevné, že se nejvíce extrahovala kyselina rosmarinová, která je dle literatury nejhojněji zastoupena z řad fenolických kyselin. Další bohatě zastoupenou byla kyselina skořicová. Na základě literární rešerše můžeme potvrdit tvrzení Sytar O. et al. [17] o přítomnosti kyseliny skořicové v meduňce. Nejméně zastoupena byla kyselina kávová. Hodnoty koncentrací v 10. den extrakce jsou pro všechny vybrané fenolické kyseliny uvedené v Tabulce 3.8. Na Obr. 3.11 je znázorněn chromatogram vodného extraktu, který byl odebrán 10. den bez přístupu světa. Z chromatogramu je patrné, že nejsou přítomny žádné charakteristické píky vybraných fenolických kyselin.

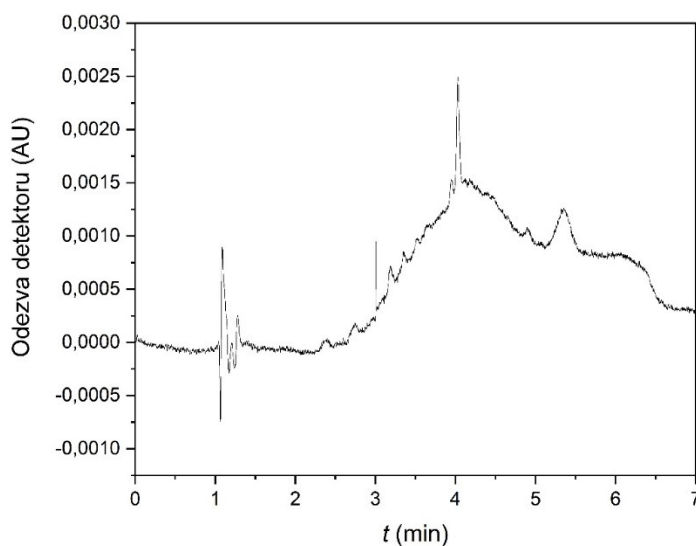
Obsah kyselin v *Melissa officinalis* (denní světlo)



Graf 3.1 Obsah kyselin v *Melissa officinalis* (denní světlo, ethanolický extrakt)

Tab. 3.8 Hodnoty koncentrací vybraných fenolických kyselin v 10. dni extrakce

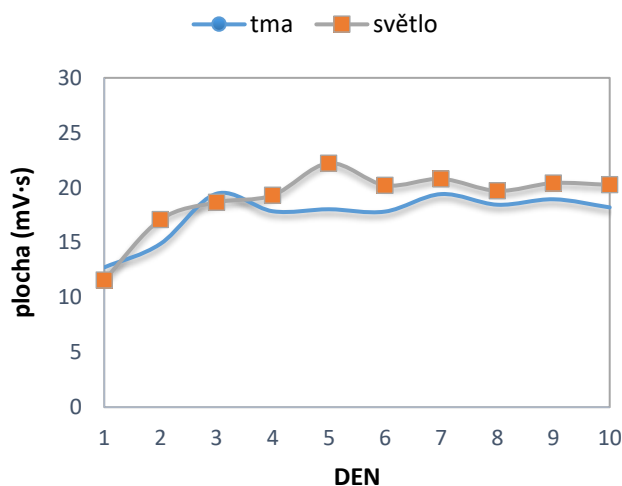
(mg·ml ⁻¹)	EtOH světo	H ₂ O světo	EtOH tma	H ₂ O tma
RA	0,012	—	0,012	—
CA	0,001	—	0,001	—
CAA	0,001	—	0,001	—
tHCA	—	—	—	—



Obr. 3.11 Chromatogram vodného extraktu (10. den; denní světlo). Měřeno optimální metodou

3.4 Vliv světelných podmínek na extrakci

Průběh extrakce byl vyhodnocen pro každou detegovanou kyselinu. Jako reprezentativní příklad byla vybrána kyselina skořicová. Kinetický průběh pro kyselinu skořicovou je zobrazen na Grafu 3.2, kde jsou porovnány rozdílné světelné podmínky. Extrakce za přístupu světla dosáhla maxima o dva dny později než-li extrakce bez přístupu světla. Znatelný nárůst je viditelný do 2. až 4. dne, ale následující dny byly hodnoty spíše konstantní. Tyto rozdílné světelné podmínky nemají na extrakci významný vliv. Rychlost extrakce byla vyhodnocena pouze pro etanolické extrakty, jelikož ve vodných extraktech nebyla potvrzena přítomnost vybraných antioxidantů.



Graf 3.2 Rychlost extrakce kyseliny skořicové

3.5 Studium množství vybraných antioxidantů v čajích

V poslední řadě byla UHPLC metoda využita k ověření obsahu antioxidantů v komerčně dostupných čajích v České republice. Vybráni byly tři zástupci: Valdemar Grešík – Natura s. r. o., MegaFyt Pharma s. r. o. a Apotheke – Mediate s. r. o. Pomocí optimální UHPLC-MS metody byly v čaji detegovány dvě kyseliny s antioxidačními vlastnostmi, a to konkrétně kyselina rosmarinová a kyselina kávová. Hodnoty koncentrací kyselin v jednotlivých čajích jsou uvedeny v Tab. 3.9. Z výsledku je vidět, že koncentrace kyseliny kávové jsou srovnatelné ve všech uvedených typech čajů. Nejvyšší koncentrační zastoupení kyseliny rosmarinové je v čaji od firmy Apotheke-

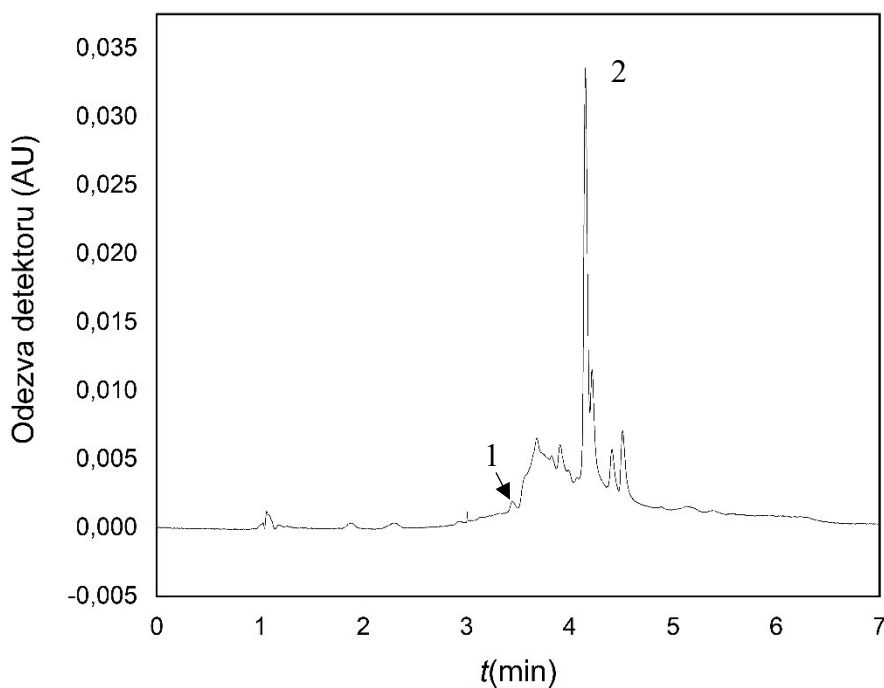
Mediate s. r. o., avšak v porovnání se zbylými čaji se nejedná o zásadní rozdíl. Oproti vodným extraktům došlo u čaje k účinné extrakci za poměrně krátký čas. Patrně jde o vliv teploty na rozpustnost.

Tab. 3.9 Hodnoty koncentrací kyselin v komerčně dostupných čajích v ČR

	V.Grešík-Natura s.r.o. c (mg·ml ⁻¹)	MegaFyt Pharma s.r.o. c (mg·ml ⁻¹)	Apotheke-Mediate s.r.o. c (mg·ml ⁻¹)
CAA	0,0005	0,0004	0,0005
RA	0,0099	0,0086	0,0103

* CAA – kyselina kávová, RA – kyselina rosmarinová

Jako reprezentativní byl vybrán chromatogram čaje značky Megafyt (Obr. 3.12).



Obr. 3.12 Chromatogram čaje MegaFyt. Měřeno optimální metodou. 1 – kyselina kávová, 2 – kyselina rosmarinová

ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla vyvinuta, optimalizována a validována UHPLC-MS metoda pro kvantifikaci antioxidantů v *Melissa officinalis*. Pomocí optimální metody byla v ethanolických extraktech, připravených v domácích podmínkách, potvrzena přítomnost kyseliny kávové ($m/z = 179,09$; $t_R = 3,48$ min), kyseliny rosmarinové ($m/z = 359,21$; $t_R = 4,195$ min) a kyseliny skořicové ($m/z = 147,01$; $t_R = 4,94$ min). Kyselina *t*-4-hydroxyskořicová detekována v žádném extraktu nebyla. Ve vodných roztocích přítomnost kyselin potvrzena nebyla. Dále bylo zjištěno, že přítomnost světla během extrakce nemá na obsah kyselin v extraktu zásadní vliv. V této studii analýza také ukázala, že komerčně dostupné bylinné čaje z *Melissa officinalis* obsahují kyselinu rosmarinovou a kyseliny kávovou. Lze tedy usuzovat, že antioxidanty se do vodných extraktů uvolňují pouze při vyšších teplotách.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Abdel-Naime, W. A., Fahim, J. R., Fouad, M. A., Kamel, M. S. Botanical studies of the leaf of *Melissa officinalis* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. **2016**, Sv. 5, 98-104.
- [2] Wang, H., Provan, G. J., Helliwell, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic. Elsevier. *Food Chemistry*, **2004**, Sv. 307-311, 87.
- [3] Miron, T.L., Herrero, M., Ibáñez, E. Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme-assisted extraction. Elsevier. *Journal of Chromatography A*, **2013**, Sv. 1288, 1-9.
- [4] Arceusz, A., Wesolowski, M. Quality consistency evaluation of *Melissa officinalis* L. commercial herbs by HPLC fingerprint and quantitation of selected phenolic acids. Elsevier. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2013**, Sv. 83, 215– 220.
- [5] Miraj S., Kopaei, R., Kiani, S. *Melissa officinalis* L: A Review Study With an Antioxidant Prospective. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*. **2017**, Sv. 22 (3), 385-394.
- [6] Kim, S., Yun, E. J., Hossain, M. A., Lee, H., Kim, K. H. Global profiling of ultraviolet-induced metabolic disruption in *Melissa officinalis* by using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. **2012**, Sv. 404, 553– 562.
- [7] Koksál, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu, F., Gulcin, I. Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*. **2011**, Sv. 5 (2), 217-222.
- [8] Chen, J. H., Ho, Ch.-T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal Agricultural Food Chem*. **1997**, Sv. 45, 2374-2378.

- [9] Penchev, P., Angelov, G., Condoret, J.-S. Extraction des agents antioxydants (acide rosmarinique) à partir de la mélisse (*Melissa officinalis* L.). *Revue de génie industriel*. **2010**, Sv. 5, 115-123.
- [10] Brandsteterova, E., Caniova, A. HPLC analysis o phenolic acids in *Melissa Officinalis*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2001**, Sv. 24:17, 2647-2659.
- [11] Sova, M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **2012**, Sv. 12, 749-767.
- [12] Zorić, Z., Markić, J., Pedisić, S., Bučević-Popović, V. Stability of Rosmarinic Acid in Aqueous Extracts from Different Lamiaceae Species after in vitro Digestion with Human Gastrointestinal Enzymes. *Food Technol. Biotechnol. Gastrointestinal Stability of Rosmarinic Acid*, **2016**, Sv. 54 (1), 97–102.
- [13] Ilhami, G. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). Elsevier. *Toxicology*, **2006**, Sv. 217, 213–220.
- [14] Liu, L., Hudginss, W. R. , Shack, S. ,Yin, M. Q., Samid, D. Cinnamic acid: A natural product with potential use in cancer intervention. *Int. J. Cancer*. **1995**, Sv. 62, 345-350.
- [15] Oufensou, S., Casalini, S., Balmas, V., Carta, P., Chtioui, W., Dettori, M. A., Fabbri, D., Migheli, Q., Delogu, G. Prenylated Trans-Cinnamic Esters and Ethers against Clinical *Fusarium* spp.: Repositioning of Natural Compounds in Antimicrobial Discovery. *Repositioning of Natural Compounds in Antimicrobial Discovery. Molecules*. **2021**, Sv. 26 (3), 658.
- [16] Milevskaya, V.V., Prasad, S., Temerdashev, Z.A. Extraction and chromatographic determination of phenolic compounds from medicinal herbs in the Lamiaceae and Hypericaceae families: A review. Elsevier. *Microchemical Journal*, **2019**, Sv. 145, 1036-1049.

- [17] Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauh, C., Brestic, M. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*. **2018**, Sv. 25, 631-641.
- [18] Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., Rusak, G., Likić, S., Berendika, M. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Some Traditionally Used Medicinal Plants Affected by the Extraction Time and Hydrolysis. *Phytochemical Analysis*. **2010**, Sv. 22, 172-180.
- [19] Canelas, V., Teixeira da Costa, C. Quantitative HPLC Analysis of Rosmarinic Acid in Extracts of *Melissa officinalis* and Spectrophotometric Measurement of Their Antioxidant Activities. *Journal of Chemical Education*. **2007**, Sv. 84, 9.
- [20] Kendir, G., Dinç, E., Köroglu, A. Quantitative Analysis of *Melissa officinalis* L. Samples by Chromatographic Multivariate Calibration Methods. *Chromatographia*. **2016**, Sv. 79, 189-198.
- [21] Maleš, Ž., Antolić, A., Babić, I., Jurić, S., Bojića, M. Quantitative Analysis of Phenolic Acids and Antiplatelet Activity of *Melissa officinalis* Leaf Extracts. *Natural Product Communication*. **2017**, Sv. 12, 93-94.
- [22] Milevskaya, V.V., Temerdashev, Z.A., Butyl'skaya, T. S., Kiseleva, N.V. Determination of Phenolic Compounds in Medicinal Plants from the Lamiaceae Family. *Journal of Analytical Chemistry*. **2017**, Sv. 72, 342–348.
- [23] Žiaková, A., Brandšteterová, E., Blahová, E. Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. Elsevier. *Journal of Chromatography A*, **2003**, Sv. 983, 271–275.
- [24] Aslipashaki, S. N., Hadjmohammadi, M. R. Air assisted - vesicle based microextraction (AAVME) as a fast and green method for the extraction and determination of phenolic compounds in *M. officinalis* L samples. Elsevier. *Talanta*, **2019**, Sv. 195, 807-814.

- [25] Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., Rakesh, D. D. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. Trieste : International Centre for Science and High Technology, **2008**.
- [26] Douglas, A. S., Donald M. W., Holler, F. J., Crouch, S. R. Analytická chemie. Praha : VŠCHT Praha, **2019**. 978-80-7592-043-0.
- [27] Swartz, M. E. UPLC: An Introduction and Review. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. **2005**, Sv. 28, 1253–1263.
- [28] Wren, S. A. C., Tchelitcheff, P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. Elsevier. Journal of Chromatography A, **2006**, Sv. 1119, 140-146.
- [29] Naresh, K., Bhawani, S., Kumar, T. M. Ultra performance liquid chromatography. Int. J. Pharm. Med. & Bio. Sc. **2014**, Sv. 3, 3.
- [30] Jakimska, A., Kot-Wasik, A., Namiesnik, J. The Current State-of-the-Art in the Determination of Pharmaceutical Residues in Environmental Matrices Using Hyphenated Techniques. Critical Reviews in Analytical Chemistry. **2014**, Sv. 44, 277–298.
- [31] Wang, X., Zhang, A., Yan, G., Han, Y., Sun H. UHPLC-MS for the analytical characterization of traditional Chinese medicines. Elsevier. Trends in Analytical Chemistry, **2014**, Sv. 63, 180–187.
- [32] Ma, H., Su, S., Duan, J., Tang, Y., Zhou, J., Guo, J., Zhan, Z. Evaluation of the analgesic activities of the crude aqueous extract and fractions of Shao Fu Zhu Yu decoction. Pharmaceutical Biology. Pharmaceutical Biology, **2011**, Sv. 49(2), 137–145.
- [33] Lei, Z., Sumner, B. W., Bhatia, A., Sarma, S. J., & Sumner, L. W. UHPLC-MS Analyses of Plant Flavonoids. Current Protocols in Plant Biology. **2019**, Sv. 1, 4.
- [34] González, R. R., Fernández, R. F., Vidal, J. L. M., Frenich, A. G., Pérez, M. L. G. Development and validation of an ultra-high performance liquid

chromatography–tandem mass-spectrometry (UHPLC–MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. Elsevier. *Journal of Neuroscience Methods*, **2011**, Sv. 198, 187–194.

- [35] Ziaková, A., Brandšteterová, E. Validation of HPLC Determination of Phenolic Acids Present in Some Lamiaceae Family Plants. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2003**, Sv. 26 (3), 443-453.
- [36] Carnat, A.P., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L. The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. Elsevier. *Pharmaceutica acta helvetiae*, **1998**, Sv. 72, 301-305.
- [37] Kim, S., Shin, M. H., Hossain, A., Yun, E. J., Lee, H., Kim, K. H. Metabolite profiling of sucrose effect on the metabolism of *Melissa officinalis* by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. **2011**, Sv. 339, 3519–3528.
- [38] Erni, F., Steuer, W., Bosshardt, H. Automation and Validation of HPLC-Systems. *Chromatographia*. **1987**, Sv. 24.
- [39] Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. New York, USA : W. H. Freeman and Company, **2007**. 0-7167-7041-5.
- [40] Bruce, P., Minkinen, P., Riekkola, M.-L. Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. *Mikrochimica Acta*. **1998**, Sv. 128, 93-106.
- [41] Ermer, J., Miller, J. H. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. Weinheim: Wiley-VCh Verlag GmbH & Co. KGaA, **2006**. 978-3-527-60447-0.
- [42] Douša, M. HPLC. HPLC. [Online] 19. Leden **1999-2020**. [Citace: 21. března 2020.] http://www.hplc.cz/Tip/lod_loq.htm.
- [43] Khan, M.F., Zuthi, S. S., Kayser, M. S., Islam, M. S., Asad, S., Rashid, M. A. A Simple RP-HPLC Method Development and Validation for the Simultaneous

Estimation of Naproxen and Rabeprazole. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **2016**, Sv. 6(11), 147-152.

[44] Waters. Waters Knowledge Base. [Online] 26. září **2018**. [Citace: 21. březen 2020.]

https://support.waters.com/@api/deki/files/2061/System_Suitability_Quick_Guide.pdf?revision=1.71500031605.