

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studijní program: Chemie (navazující magisterské studium)

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Iveta Rýdlová

**IDENTIFIKACE VYBRANÝCH POLYFENOLICKÝCH LÁTEK
V EXTRAKTECH LÉČIVÝCH ROSTLIN**

**Identification of selected polyphenols in extracts of
medicinal plants**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Rychlovský, CSc.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci Identifikace vybraných polyfenolických látek v extraktech léčivých rostlin vypracovala samostatně a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím, aby tato práce byla dále propůjčena ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Dne

v Praze

Podpis

Abstrakt

Diplomová práce „Identifikace vybraných polyfenolických látek v extraktech léčivých rostlin“ je rozdělena do dvou částí. První část je věnována popisu a obecnému rozdělení polyfenolických látek, jejich antioxidační aktivitě a přehledu metod, které se pro analýzu těchto látek používají.

Druhá část práce se zabývá identifikací těchto vybraných látek pomocí metody RP - HPLC s detekcí UV-DAD, a poté i s tandemovým hmotnostním detektorem s trojitým kvadrupólem. Byla optimalizována metoda, kde se využívala gradientová eluce s 10-90 % acetonitrilem, 0,1 % kyselinou mravenčí a deionizovanou vodou. Čas analýzy byl 38 minut. Eluce látek probíhala od polárnějších k méně polárním látkám. Nejdříve eluovaly látky, které obsahovaly přímo na svém benzenovém jádře hydroxylové skupiny jako např. fenolické kyseliny, dále aglykony s navázaným cukrem, který zajišťuje vyšší polaritu látky (flavanonové glykosidy), dále následovaly flavonoly bez připojené cukerné jednotky, a nejpозději se eluovaly flavony. Takto optimalizovaná metoda se ukázala jako spolehlivá s dobrou opakovatelností a přesností pro separaci polyfenolických látek.

Pomocí UV spektrometrie se měřila stabilita, díky níž se látky prokázaly jako stabilní sloučeniny, kde se jejich UV spektra nemění s časem.

S metodou RP-HPLC-MS/MS se tedy identifikovaly látky v rostlinných extraktech, které byly extrahovány do extrakčních médií – methanolu a vody. V každém extraktu byly identifikovány minimálně dvě polyfenolické látky. Z výsledků vyplývá, že v methanolickeém médiu se projevilo na chromatogramech extraktů mnohem více píků. Je zřejmé, že methanol je jako extrakční médium pro polyfenolické látky více výhodné. Ve vodném extraktu se lépe identifikovaly polárnější fenolické kyseliny, aglykony s připojenými cukry, diglykosidy apod. V extraktech v methanolu se navíc identifikovaly snadněji např. flavony.

Klíčová slova: polyfenolické látky, HPLC, detekce MS, rostlinné extrakty

Abstract

This thesis "Identification of selected polyphenols in extracts of medicinal plants" is divided into two parts. The first part is devoted to describing a general division of polyphenolic compounds, their antioxidant activity and lists of the methods which are used for the analysis of these substances.

The second part deals with the identification of these selected compounds using the RP - HPLC method with UV detection-DAD, and then with the tandem mass spectrometer with a triple quadrupole. The method was optimized, in this method was used gradient elution with 10-90 % acetonitrile, 0,1 % formic acid and deionized water. Analysis time was 38 minutes. Elution agents ran from polar to less polar substances. First of all eluted substances which contained the hydroxyl group directly on the benzene ring as e.g. phenolic acids, further eluted aglycones with bound sugar, which provides a higher polarity of the substance (flavanones glycosides), further followed the flavonols without attached saccharide units, at the latest the flavones eluted. This optimized method has proved to be reliable with good repeatability and accuracy for separation of polyphenols.

Using the UV spectrometry the stability was measured. Due to the stability the substances proved to be stable compounds where their UV spectra don't change with time.

With the RP-HPLC-MS / MS method are identified substances in plant extracts that have been extracted in the extraction media - methanol and water. In each extract were identified at least two polyphenolic substances. The results prove that in methanolic medium resulted on the chromatograms of extracts more peaks. It is obvious that methanol is more preferred as extraction medium for polyphenolic compounds. In the aqueous extract were better identified polar phenolic acids aglycones with attached sugars, diglycoside etc. In extracts in methanol were easily identified e.g. flavones.

Keywords: Polyphenolic Substances, HPLC, MS Detection, Plant Extracts

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli panu Doc. RNDr. Petrovi Rychlovskému, CSc., za jeho cenné rady a připomínky, a za jeho trpělivost v průběhu vytváření této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat panu RNDr. Václavovi Červenému, Ph.D., a panu RNDr. Petrovi Kozlíkovi, Ph.D., za jejich odborné konzultace a rady v průběhu měření v rámci této diplomové práce.

Obsah

1	Úvod a cíl diplomové práce	10
2	Teoretická část.....	11
2.1	Antioxidanty	11
2.1.1	Polyfenolické látky.....	11
2.1.2	Flavonoidy	12
2.1.3	Anthoxantiny.....	12
2.1.4	Flavonoly	13
2.1.5	Flavony a flavan-3-oly (katechiny)	13
2.1.6	Flavanony	13
2.1.7	Isoflavonoidy(fytoestrogeny).....	13
2.1.8	Anthokyany.....	13
2.1.9	Fenolické kyseliny.....	13
2.1.10	Třísloviny (taniny).....	14
2.1.11	Stillbenoidy.....	14
2.1.12	Lignany.....	14
2.2	Antioxidační aktivita polyfenolických látek.....	14
2.3	Flavonoidy a jejich vliv na organismus.....	15
2.4	Popis použitých polyfenolických látek (standardů)	17
2.4.1	Morin	17
2.4.2	Dihydromyricetin	17
2.4.3	Rutin	18
2.4.4	Hesperetin.....	18
2.4.5	Quercitrin.....	19
2.4.6	Chrysin.....	19
2.4.7	Kurkumin.....	20
2.4.8	Baicalin	20
2.4.9	Naringin	21
2.4.10	3-hydroxyflavon.....	21
2.4.11	Quercetin.....	21
2.4.12	4-methylumbelliferon.....	22
2.4.13	Resveratrol.....	22
2.4.14	Diosmin	23
2.4.15	Guajakol.....	23
2.4.16	Hesperidin.....	23
2.4.17	Kyselina ferulová	24

2.4.18	Kyselina skořicová	24
2.4.19	Kyselina <i>p</i> -kumarová	25
2.4.20	Kyselina gallová	25
2.4.21	Vanillin	26
2.4.22	L-fenylalanin	26
2.4.23	β -naftoflavon	27
2.4.24	α -naftoflavon	27
2.4.25	Flavon	27
2.4.26	Flavanon	28
2.5	Přehled metod pro analýzu a identifikaci polyfenolických látek	29
2.5.1	HPLC	29
2.6	Identifikace polyfenolických látek	34
3	Experimentální část	35
3.1	Použité přístroje	35
3.1.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	35
3.1.2	UV-VIS spektrometr	35
3.1.3	Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)	35
3.2	Použité chemikálie	36
3.3	Standardy polyfenolických látek	36
3.4	Příprava mobilní fáze	38
3.5	Vzorky – extrakty léčivých rostlin	38
3.5.1	Příprava vzorků rostlin a podmínky jejich extrakce	38
4	Výsledky měření a diskuse	39
4.1	Měření stability roztoků standardů	39
4.2	Hledání vhodné vlnové délky pro detekci souboru standardů polyfenolických látek	40
4.3	Ověření/modifikace optimálních podmínek pro separaci standardů polyfenolických látek	44
4.3.1	Optimalizace podmínek pro analýzu čistých standardů a směsi standardů polyfenolických látek pomocí metody HPLC	44
4.4	Měření MS spekter jednotlivých standardů polyfenolických látek; identifikace jednotlivých standardů ve směsi	57
4.4.1	Optimalizace MS spektrometru a zjištění ionizovatelnosti jednotlivých standardů	57
4.4.2	Optimalizace MS spektrometru a zjištění fragmentace vybraných ionizovatelných standardů	59
4.4.3	Analýza směsi vybraných standardů polyfenolických látek	59
4.5	Identifikace polyfenolických látek v rostlinných extraktech	62
4.5.1	Chromatogramy jednotlivých rostlinných extraktů	63

4.5.2	Polyfenolické látky nalezené v jednotlivých rostlinných extraktech.....	69
5	Závěr	76
6	Použitá literatura.....	78
7	Zdroje obrázků.....	84

Seznam zkratek

A β peptid	amyloidový beta-peptid
AUD	poruchy spojené s užíváním alkoholu (Alcohol Use Disorders)
C18	oktadecylový uhlíkový řetězec
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
CZE	kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)
DAD	detektor diodového pole (Diode Array Detector)
GABA _A	receptor pro kyselinu gama-aminomáselnou (Receptor for γ -aminobutyric Acid)
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LDL	nízkodenzitní lipoprotein (Low Density Lipoprotein)
MRM	Multiple Reaction Monitoring
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (Messenger Ribonucleic Acid)
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spektrometry)
mV	milivolt, jednotka el. napětí
NMR	nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
NO	oxid dusnatý
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi (Reversed Phase - High-performance Liquid Chromatography)
SIM	záznam vybraného iontu (Selected Ion Monitoring)
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (Thin-layer Chromatography)
TNF- α	faktor nádorové nekrózy α (Tumor Necrosis Factor alfa)
UV-A	ultrafialové záření A (Ultraviolet A)
°C	Celsiův stupeň, jednotka teploty

1 Úvod a cíl diplomové práce

Civilizační choroby a karcinomy jsou dnes příčinou mnoha úmrtí, proto je dnes kladen velký důraz na vývoj nových látek, které by mohly být nová potenciální léčiva pro tyto nemoci. Zvýšený zájem nyní připadá na výzkum polyfenolických látek, patřících do skupiny přírodních antioxidantů. Ukázalo se, že tyto látky velice pozitivně ovlivňují léčbu různých nemocí a působí preventivně proti různým škodlivým faktorům. Nejnovější studie se také přiklání k využití dávno používaných léčivých bylin, jako je máta, dobromysl, rozmarýn a čaj, ve kterých je hojně zastoupení těchto polyfenolů. Mnoho těchto látek se mimo jiné nachází v ovoci, hlavně v ovocných slupkách, a v zelenině, v kávě, vínu, pivu, kakau a v mnoha dalších potravinách.

Cílem předkládané diplomové práce je přispět k identifikaci vybraných polyfenolických látek (26 standardů) v některých extraktech léčivých rostlin (máta, řebříček, dobromysl,...) pomocí metody HPLC s UV a MS detekcí. Tato problematika je řešena v rámci rozsáhlého projektu UNCE # 42 nazvaného „Moderní technologie pro identifikaci a optimalizaci nádorových léčiv nové generace“, s cílem hledání nových chemických látek jakožto potenciálních onkologických léků.

2 Teoretická část

2.1 Antioxidanty

Jsou to látky, které zachytávají v organismu volné kyslíkové radikály, které vznikají při metabolismu. Jedná se o reaktivní formy kyslíku (superoxidový anion, peroxid vodíku a hydroxylový anion). Tyto radikály mohou vznikat ze znečištěného ovzduší, z UV záření, z kouření (nikotin snižuje hladinu antioxidantů v krvi), pesticidů a mnoho dalších nepříznivých vlivů. Antioxidanty pak pomáhají bránit vzniku oxidacím tuků v buněčných membránách, které by se tímto mohly poškodit. Sehrávají důležitou roli i v metabolismu NO. Při nedostatku těchto antioxidantních látek se mohou buňky v těle poškodit [1], [2].

2.1.1 Polyfenolické látky

Jsou to velice různorodé skupiny látek, které jsou složkou mnoha rostlin a různých druhů zeleniny a ovoce a patří mezi antioxidanty [2]. Fenolické látky obsahují ve své struktuře minimálně jedno aromatické jádro, které má dvě a více hydroxylových skupin [1]. Jsou vytvářeny v rostlinách při stresu, jakožto sekundární metabolity rostlin [3].

Dnes je již známo mnoho konkrétních účinků těchto polyfenolických látek. Nejdůležitějším efektem v lidském těle, jaký mají tyto látky, je deaktivace a stabilizace volných kyslíkových radikálů, které mají neblahý vliv na oxidaci lipidů a proteinů, a mohou tak poškozovat buněčné membrány nebo vytvářet mutagenní DNA. Kromě polyfenolických látek působí jako antioxidanty i vitamíny (A,E) a různá oxidační činidla nacházející se fyziologicky v lidském těle (gluthathion). Vzniklé volné radikály zneutralizují a znemožní jim další negativní působení. Polyfenolické látky se také podílí na léčbě a prevenci kardiovaskulárních chorob, kde ovlivňují pružnost cév a správné krevní okysličování, na neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba), inhibují proliferaci a indukují apoptózu karcinogenních buněk. Dále také ovlivňují mnoho enzymů a hormonů v lidském organismu.

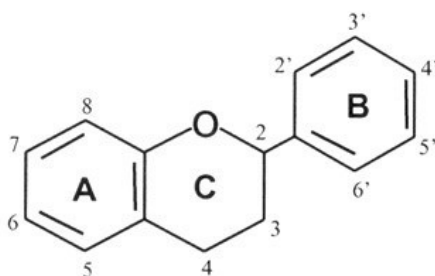
Polyfenolické látky se vyskytují v rostlinách jako sekundární metabolity, které vznikají na jejich obranu a ochranu před různým poškozením. Těchto látek existuje až 8000. Dělí se do několika skupin, z nichž nejrozsáhlejší je skupina flavonoidů. Ta se dále dělí do dvou tříd: anthoxantiny a anthokyany. Anthoxantiny se rozdělují na několik podtříd: flavonoly, flavony, isoflavony, flavanony a flavan-3-oly. Mezi další látky patřící do polyfenolických látek jsou fenolové kyseliny (deriváty kyseliny benzoové a

hydroxyskořicové), stilbeny (resveratrol) a lignany. Všechny tyto skupiny se liší strukturou a pozicemi či postrádáním OH skupin.

Obsah fenolických látek v zelenině se pohybuje okolo 3000 mg/kg. Denní dávka pro dospělého člověka by měla být zhruba 20 mg/den [2]. Bylo nedávno zjištěno, že průměrný denní celkový příjem flavonoidů, což je nejrozsáhlejší skupina polyfenolů, činí až 190 mg/den. Vyskytují se v potravinách většinou jako glykosidy, zatímco flavonoly (patřící mezi flavonoidy) obvykle jako aglykony [3].

2.1.2 Flavonoidy

Za nejrozsáhlejší skupinu fenolických látek se mohou považovat flavonoidy. V jejich struktuře se nachází dva substituované aromatické kruhy (A, B) a jeden kruh pyranový (C), který je připojený (kondenzovaný) ke kruhu A. [4] Nejčastěji, hlavně v přírodě, se vyskytují ve formě konjugované s cukry, které jsou charakteristické pro každý aglykon -necukerná část. Díky cukrům se lépe rozpouštějí ve vodě. Takto jsou nazývány jako glykosidy [1].



Obr. 2.1 Základní struktura flavonoidů [75]

Pokud jsou na jádře přítomny spíše methylové skupiny, rozpustnost ve vodě se snižuje, což slouží také pro efektivnější transport přes lipidovou membránu [4].

Flavonoidy se rozdělují na dvě podtřídy: anthoxantiny a anthokyany. Bývají hlavní složkou chuti, vůně a barvy. Vyskytují se v rostlinách na rozdílných místech, záleží na podmínkách pěstování, klimatu, zralosti atd [1].

2.1.3 Anthoxantiny

Anthokyany bývají zodpovědné za barvu rostlin v tmavších odstínech (fialová). Anthoxantiny naopak nemají chromofor tak silný, tudíž jejich zbarvení je spíše světlý, až do žluta. Jejich barva závisí na pH. Mezi anthoxantiny se řadí: flavonoly, flavony, flavan-3-oly, flavanony a isoflavonoidy [1].

2.1.4 Flavonoly

Mají nejrozmanitější zastoupení v rostlinách. Jsou to např. quercetin, myricetin, morin a rutin. Mají na pozici uhlíku C-3 hydroxylovou skupinu. Výskyt: cibule, jablka a víno atd. [1].

2.1.5 Flavony a flavan-3-oly (flavanoly)

Flavony narozdíl od flavonolů postrádají hydroxylovou skupinu. Výskyt: petržel, celer atd. Příklad: chrysin [1].

Flavanolům chybí kyslík na pozici C-4. Jsou nejčastěji konjugovány s kyselinou gallovou a vznikají galláty. Výskyt: čokoláda, zelený čaj- hlavní složka, víno atd. [1], [4].

2.1.6 Flavanony

Nepatří zrovna mezi majoritní složky rostlin. Nevyskytují se četně v zelenině, na rozdíl od přechodných flavonoidů. Jsou přítomny hlavně v citrusových plodech a bývají nositeli hořké chuti například v grepu. Jsou také konjugovány a vyskytují se nejčastěji tedy ve formě glykosidů, kde jako aglykon působí hesperetin a naringenin. Příklady flavanonů jsou: hesperidin a naringin (glykosidy) [1].

2.1.7 Isoflavonoidy (fytoestrogeny)

Tyto látky vycházejí ze struktury flavonoidů, ale při syntéze dochází ke změně struktury a migraci akrylové skupiny z pozice C-2 na pozici C-3. Váží se, díky chemické podobnosti s estrogeny, na estrogenní receptory [1]. Díky podobě s estrogeny se využívají na potlačení karcinogenity prsu a prostaty. Výskyt: luštěniny- zejména sója [1], [4].

2.1.8 Anthokyany

Patří mezi nejvýznamnější rostlinná barviva. Bývají ve formě glykosidů, stejně jako ostatní flavonoidy.

Výskyt: tmavé ovoce - borůvky, třešně aj. [1].

2.1.9 Fenolické kyseliny

Jejich struktura obsahuje fenolický kruh a karboxylovou skupinu. Tyto kyseliny jsou účinné proti oxidaci LDL cholesterolu v organismu. Zabraňují také šíření rakovinných buněk a to tak, že vytvoří komplex s karcinogenem, a tak již nemůže vstupovat do DNA a tvořit tak mutace při transkripci. Rozdělují se na deriváty kyseliny benzoové a deriváty kyseliny hydroxyskořicové. Ty tvoří zhruba polovinu polyfenolických látek v rostlinách [1], [4].

Deriváty kyseliny benzoové:

Výskyt: v čaji, cibule, brusinky aj.

Příklad : kyselina gallová [1].

Deriváty kyseliny hydroxyskořicové:

Výskyt je častější než u první skupiny fenolických kyselin a to hlavně v obilovinách, bramborech, luštěninách, ovoci, zelenině atd.) [1]. Konjugací s kyselinou vinnou a chinovou vzniká kyselina chlorogenová, která je při mechanickém poškození oxidována na chinon (hnědý polymer), a vzniká tak hnědé zbarvení jablka [5].

Příklady: kumarová kyselina, ferulová kyselina [1].

2.1.10 Třísloviny (taniny)

Mají velkou molekulovou hmotnost na rozdíl od ostatních flavonoidů, a po konjugaci s cukry nejsou vůbec rozpustné, nebo jen málo, ve vodě. Hrají důležitou roli při příjmu celkových sacharidů a proteinů z potravy do organismu. Po pozření se třísloviny navážou na proteiny obsažené ve slinách a snižují tak vlhkost v ústní dutině (vzniká trpká chuť) [6]. Objevují se ve formách dimerů až polymerů.

Výskyt: obiloviny, ovoce, luštěniny atd [1].

2.1.11 Stillbenoidy

Pochází z kyseliny skořicové. Nejčastější výskyt je ve víně. Hlavním zástupcem je resveratrol. Inhibuje oxygenásové enzymy, které jsou spojeny s agregací trombocytů a brání tak potenciálnímu nadměrnému krevnímu srážení [1].

2.1.12 Lignany

Jsou to látky z rozmanité skupiny feny]propanoidů. Cesta vzniku jejich struktury se odvíjí z redukce alkoholů, které pocházejí z kyseliny skořicové a kyseliny *p*-kumarové (šikimátovou dráhou) [64]. Experimentální důkazy u zvířat ukázaly jasné antikarcinogenní účinky u mnoha typů rakoviny [65].

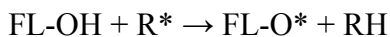
2.2 Antioxidační aktivita polyfenolických látek

Studie prokazují, že polyfenolické látky mají antioxidační vlastnosti. Mechanismus účinku spočívá v reakci s radikálovým aniontem nebo kationtem, ve které probíhá neutralizace a stabilizace [7]. Radikály jsou většinou nestabilní atomy nebo molekuly, které obsahují alespoň jeden nepárový elektron ve svém obalu. Jsou proto velmi reaktivní. Vznikají např.

UV zářením nebo reakcí $O_2 + e^- \rightarrow O_2^*$, kdy vzniká superoxidový radikál. Tyto radikály jsou vytvářeny v buňkách i fyziologicky, ale pokud existuje v těle biologická rovnováha, jsou v největší míře degradovány [4].

Typická antioxidační reakce je přenos atomu vodíku z hydroxylových skupin, připojené na benzenovém jádře antioxidantu, na volný radikálový ion [7]. Je prokázáno, že je více důležitá poloha těchto hydroxylových (popřípadě methylových skupin), než jejich počet [4]. Tato reakce je výchozí pro stanovení celkové antioxidační reakce v biologickém materiálu [1].

Nedostatek flavonoidů v organismu může mít tedy za následek zvýšení vzniku rakoviny [1].



Antioxidační aktivita souvisí s oxidačně-redukčním potenciálem, který je majoritní při stanovení antioxidační aktivity. Využívá se měření kinetiky při inaktivaci radikálu, reakčního mechanismu a rozpustnosti látek. Pro redukci radikálu je typický rozsah 0,3 až 0,7 V [7].

Látky s negativnějšími oxidačně redukčními potenciály odštěpují lépe elektrony a samy se redukují. Oxidované radikály mající tento potenciál vyšší, tedy oxidují látky, které ho mají nižší.

Potenciál antioxidační aktivity závisí na pH, a tím na deprotonaci hydroxylové skupiny na benzenovém jádře, a to přímou úměrností - čím více stoupá míra deprotonace, tím vzrůstá potenciál. Pro měření oxidační schopnosti se využívá elektrochemická metoda s půlvlnovým potenciálem, který určuje, jak rychle se fenolické látky oxidují. Používají se dvě elektrody, kde pracovní elektrodou je elektroda platinová a srovnávací je elektroda kalomelová. Pozorují se změny napětí článku v mV. Je zjištěno, že čím vyšší je $E_{1/2}$ látky (antioxidantu), tím nižší je jeho antioxidační aktivita.

Bylo zjištěno, že flavonoly (např. quercetin) jsou látky s nejsilnějším účinkem antioxidační aktivity [4].

2.3 Flavonoidy a jejich vliv na organismus

Flavonoly a flavanoly mají podle nejnovějších studií pozitivní vliv na lidský organismus. Fungují jako prevence proti rakovině, zlepšují pružnost cév a činnost kardiovaskulárního systému, zlepšují prokrvení a zásobují krev kyslíkem [1], [2]. Konkrétně izoflavonoidy působí na metabolismus mastných kyselin a steroidů. Zasahují do transmembránového přenosu hormonů k receptorům a ovlivňují genovou transkripci. Inhibují proteinkinázu – enzym ovlivňující proliferaci buněk, a tím působí izoflavonoidy také jako antivirotika. Mají také vliv na ženský organismus a jeho hladiny estrogenu, inhibují totiž konverzi androgenů na estrogenu. Tohoto jevu se využívá při léčbě rakoviny prsu [1].

Flavonoidy také působí pozitivně proti alergiím, jelikož brání tvorbě histaminu ve sliznici. Chrání také organismus proti virovému a bakteriálnímu napadení [2]. Preventivně působí na

kardiovaskulární systém a dysfunkci endotelií, což souvisí s produkcí NO, dále proti srážení trombocytů, proti oxidativnímu poškození DNA, oxidaci lipidů, posilují transkripci mRNA, vyvolávají apoptózu proliferujících rakovinných buněk, modulují funkci imunitního systému, a tím tedy působí také i antimikrobiálně [3].

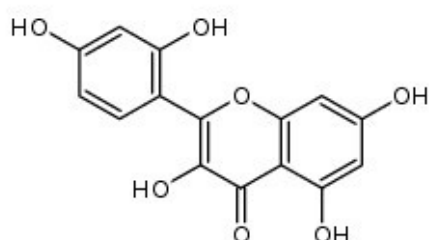
Tab. 2.1: Rozdělení polyfenolických látek podle počtu aromatických kruhů a vazby mezi jednotlivými kruhy [1].

Třída	Podtřída	Typ	Zástupci použitých standardů
Fenolické kyseliny	Deriváty kyseliny benzoové	-	Kyselina gallová
-	Deriváty kyseliny hydroxykyselinové	-	Kyselina <i>p</i> -kumarová a ferulová
Flavonoidy	Anthoxantiny	Flavonoly	3-hydroxyflavon, quercetin, morin, rutin, dihydromyricetin,
-	-	Flavony	Chrysin, baicalin, diosmin, flavon, naftoflavony
-	-	Isoflavony	-
-	-	Flavanony	Hesperidin, hesperetin, naringin, flavanon
-	-	Flavan-3-oly (flavanoly)	-
-	Anthokyany	-	-
Stilbeny	-	-	Resveratrol
Lignany	-	-	-

2.4 Popis použitých polyfenolických látek (standardů)

2.4.1 Morin

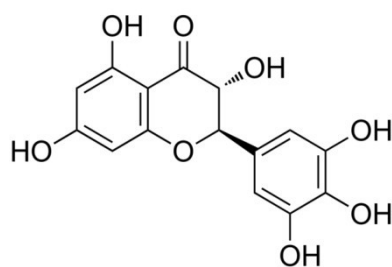
Morin, existující v podobě světle hnědého prášku, je flavonoid s antioxidačními vlastnostmi. Bylo prokázáno, že chrání buňky před poškozením kyslíkových radikálů. Morin degraduje nejen kyslíkové radikály, ale i mírně inhibuje xanthinoxidázu, volnými radikály vytvořený enzym. Již v koncentracích 75 až 100 pm morin inhibuje oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL) [8]. Komplexy hliníku a beryllia s morinem vykazují fluorescenci a využívají se tak v analytické chemii ke stanovení těchto prvků. [9]



Obr. 2.2: Struktura morinu

2.4.2 Dihydromyricetin

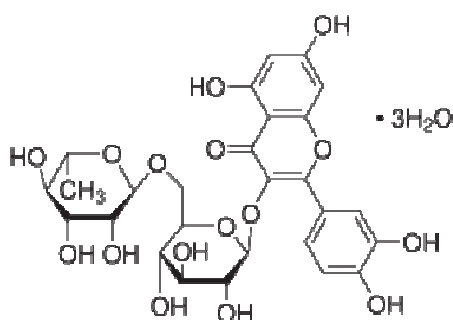
Myricetin může být ve formě světle žlutých nebo zelených krystalů [10]. Dihydromyricetin je členem skupiny flavonoidů polyfenolických látek s antioxidačními vlastnostmi. Vyskytuje se v červeném víně. Myricetin je strukturálně podobný quercetinu a uvádí se, že má mnoho podobných funkcí i s dalšími členy ze skupiny flavanolů. Myricetin se vyrábí z taxifolinu přes meziprodukt dihydromyricetin a může být dále zpracován za vzniku laricitrinu a pak syringetinu, což jsou další zástupci flavanolů. Dihydromyricetin se často prodává jako doplněk stravy a má funkci jako částečný agonista GABA-A receptoru při léčbě AUD. Dihydromyricetin bezpečně redukuje projevy intoxikace a zabraňuje kocovině [11].



Obr. 2.3: Struktura dihydromyricetinu

2.4.3 Rutin

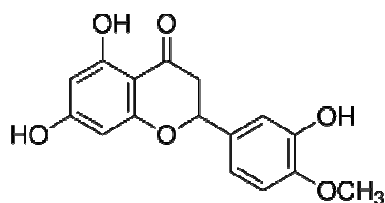
Rutin je antioxidant a patří do skupiny flavonoidů. Je to bledě žlutý prášek a má hlavní účinek v zachytávání oxidu dusnatého (NO) v organismu. Je také inhibitor reduktázy aldolázy. Rutin je hlavní složkou červeného vína [12].



Obr. 2.4: Struktura rutinu

2.4.4 Hesperetin

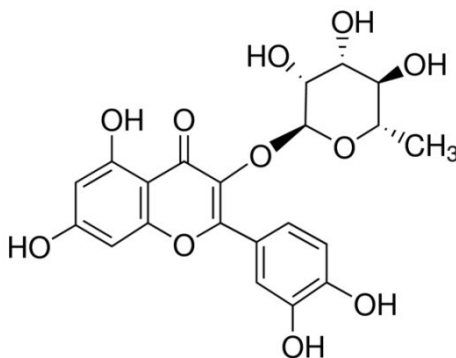
Hesperetin je tmavě žlutý prášek. Patří mezi flavanony s chemopreventivním účinkem. Hlavní účinek hesperetinu je snížení hladiny cholesterolu, příznivě ovlivňuje metabolismus lipidů. Výzkum in vitro také naznačuje možnost, že by hesperetin mohl mít protirakovinné účinky. Hesperetin je flavonoid nalezený v řadě citrusových džusů. Dále má antioxidantní, protizánětlivé, antialergické, hypolipidemické, vazoprotektivní a antikarcinogenní účinky [13], [14].



Obr. 2.5: Struktura hesperetinu

2.4.5 Quercitrin

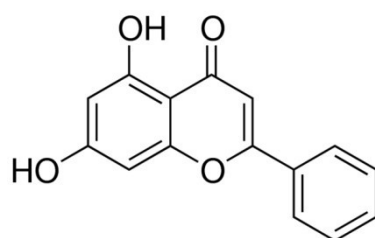
Quercitrin je rostlinný pigment a řadí se mezi flavonoidy. Je nalezen v mnoha rostlinách a potravinách, jako je červené víno, cibule, zelený čaj, jablka, jahody, Ginkgo biloba, třezalka atd. Také pohanka a čaj obsahuje velké množství této látky. Existuje v glykosylované formě. Quercitrin se používá pro léčbu kardiovaskulárních chorob srdce a krevních cév, včetně kornatění tepen (aterosklerózy) a vysokého cholesterolu. Používá se také pro léčbu diabetu, šedého zákalu, senné rýmy, peptický vředu, schizofrenie, zánětu, astma, dny, virových infekcí, chronického únavového syndromu, také jako prevence rakoviny a pro léčení chronických infekcí prostaty [15].



Obr. 2.6: Struktura quercitrinu

2.4.6 Chrysin

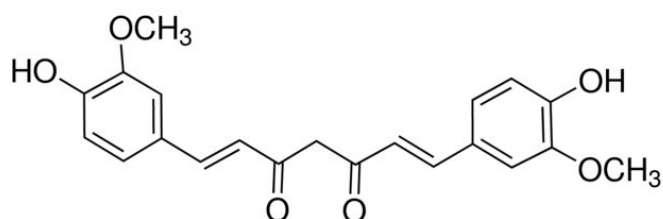
Chrysin patří do skupiny látek zvaných flavonoidy. Přirozeně se vyskytuje v rostlinách, jako je mučenka, lípa, v medu a včelích plátech. Chrysin se používá v kulturistice. Laboratorní výzkumy totiž naznačují, že chrysin může zvyšovat v těle mužský hormon testosteron a zlepšovat tak výsledky sportovců. Zatím se tento výzkum přímo u lidí ještě nepotvrdil. Množství chrysinu, které se vstřebává ze střeva, je totiž velmi malé. Dále se využívá pro léčbu úzkosti, při zánětu, dně, při HIV/AIDS, erektilní dysfunkci a při plešatosti. Také se používá jako prevence proti rakovině [16].



Obr. 2.7: Struktura chrysinu

2.4.7 Kurkumin

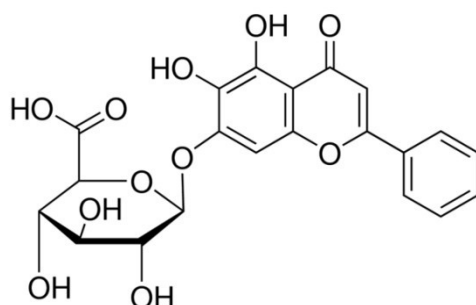
Žluto-oranžové barvivo získané z kurkumy, kořene *Curcuma longa*. Používá se při detekci boru. Kurkumin má spektrum farmakologických vlastností, především z důvodu jeho inhibičních účinků na metabolické enzymy. Bylo popsáno, že má potenciální chemopreventivní a chemoterapeutickou aktivitu, inhibuje totiž enzymy buněčného cyklu, a indukuje tak diferenciaci a apoptózu v řadě nádorových onemocnění. Nicméně, špatná rozpustnost kurkuminu omezuje jeho další aplikaci v léčbě rakoviny. Kurkumin je fluorescenční molekula s vysokou afinitou k Abeta peptidu - Akumulace amyloidního peptidu [17].



Obr. 2.8: Struktura kurkuminu

2.4.8 Baicalin

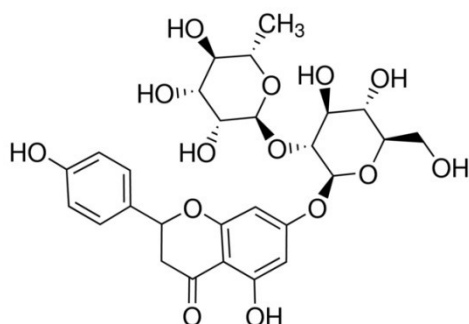
Slouží jako inhibitor enzymů. Kombinuje se s nimi tak, aby nedocházelo ke katalytické reakci, kdy vzniká substrát-enzym. Působí antiastmaticky a využívá se pro léčbu této nemoci. Vhodné je také použití baicalinu jako protizánětlivého činidla, které brání šíření, či zabíjí, mikroorganismy. Výhodou, oproti jiným analgetikům, je jeho nesteroidní struktura. Kromě protizánětlivého, analgetického, antipyretického působení, inhibuje také aktivaci krevních destiček a vyznačuje se inhibicí syntézy prostaglandinů, které přeměňují kyselinu arachidonovou na cyklické endoperoxidy, prekuzory prostaglandinů [18].



Obr. 2.9: Struktura baicalinu

2.4.9 Naringin

Naringin patří mezi flavonoidy, a nachází se v grepu a dalších citrusových plodech. Naringin je glykosid a řadí se mezi flavanony. Silně inhibuje střevní organické anionty a polypeptid 1A2, a tím zvyšuje biologickou dostupnost mnoha farmakologických přípravků. Naringin byl použit ve studii pro hodnocení produkce aldosteronu v lidské adrenokortikální buněčné ose. Dlouhodobý příjem naringinu ovlivňuje vychytávání glukózy z krve a může být použit

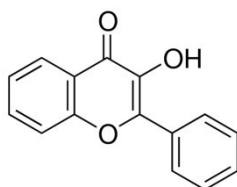


k efektivnímu zlepšení Alzheimerovy choroby [19], [20].

Obr. 2.10: Struktura narigninu

2.4.10 3-hydroxyflavon

Patří krom flavonoidů také mezi fytochemické látky, které ovlivňují enzymy jako je dioxygenáza. Účastní se syntézy biologicky aktivních molekul. Momentálně se studuje jako protinádorové činidlo a inhibitor telomeráz [21]. Bylo popsáno, že účinně chrání také proti toxicitě peroxydusitanu a slouží jako fluorescenční sonda ke studiu buněčných membrán [22].

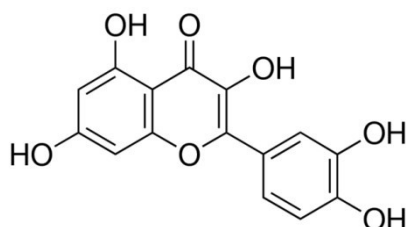


Obr. 2.11.: Struktura 3-hydroxyflavonu

2.4.11 Quercetin

Flavonol, který je široce distribuován v rostlinách. Je to antioxidant jako mnoho jiných fenolických heterocyklických sloučenin. Bylo prokázáno, že chrání lipoprotein o nízké hustotě (LDL) před oxidací a zabraňuje shlukování krevních destiček, inhibuje proliferaci a

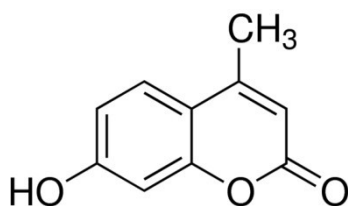
migraci karcinogenních buněk. Při příjmu quercetinu bylo zaznamenáno významné snížení plazmatické hladiny lipidů, lipoproteinů a jaterního cholesterolu. Inhibuje produkci LDL, vznikající při oxidačním stresu a chrání enzym, který může zamezit vzniku hydrolyzovaných specifických peroxidů v aterosklerotických plátech [23].



Obr. 2.12: Struktura quercetinu

2.4.12 4-methylumbelliferon

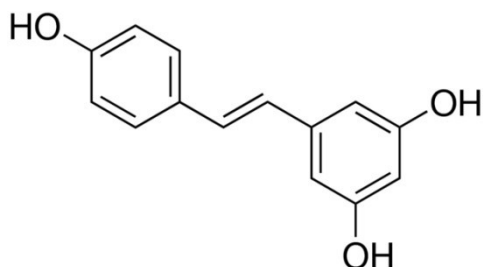
Derivát kumarinu mající spasmolytické, choleretické účinky a také ochranné účinky proti světlu. Je používán v analytické chemii pro stanovení kyseliny dusičné jako indikátor při chemické titraci. Tato látka se používá také pro analýzu chemických, biologických nebo patologických procesů [24]. Je vysoce fluorescenční v alkalických roztocích [25]. Je také inhibitor syntézy kyseliny hyaluronové. Inhibuje proliferaci, přenos a invazi nádorových buněčných řad. Působí cholereticky a protinádorově [26].



Obr. 2.13: Struktura 4-methylumbelliferonu

2.4.13 Resveratrol

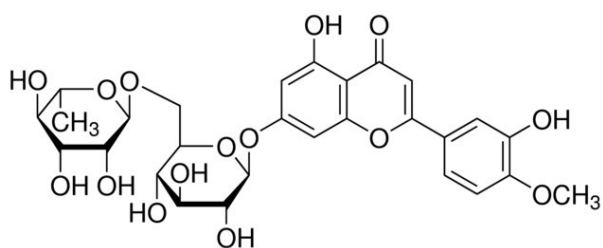
Polyfenolická sloučenina, která se vyskytuje ve slupkách hroznů a v červeném víně. Je známé jeho množství biologických aktivit, a to hlavně antioxidační, antiagregační, protinádorové, protizánětlivé a kardioprotektivní. Kromě těch vykazuje také antiamyloidogenní účinky [27].



Obr. 2.14: Struktura resveratrolu

2.4.14 Diosmin

Diosmin je flavon, člen skupiny flavonoidů [28]. Je to antioxidační a protinádorové činidlo [29]. Diosminovou aglykonovou formou je diosmetin [28]. Byla prokázána jeho protizánětlivá a antiapoptotická aktivita v neuronálních buňkách, prostřednictvím inhibice TNF- α . Tyto studie podporují potenciál diosminu, který je zkoumán jako potenciální látka pro

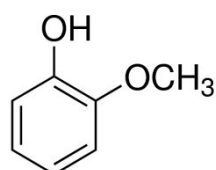


léčení neurodegenerativních onemocnění [30].

Obr. 2.15: Struktura diosminu

2.4.15 Guajakol

Kapalina má světle žlutou olejovitou formu. Je to látka, s dezinfekčními vlastnostmi a používá se jako expektorans, slouží k uvolnění bronchiální sekrece v dýchacích cestách [31]. Sloučenina přispívá k chuti mnoha potravin [32]. Guajakol je produkován při spalování ligninu ve dřevě a je také zodpovědný za kouřové aroma v potravinách např. ve slanině nebo uzených rybách [33]. Dále přispívá k nahořklé chuti pražené kávy [32].

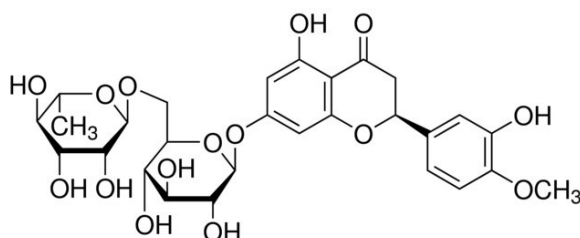


Obr. 2.16: Struktura guajakolu

2.4.16 Hesperidin

Je to glykosid, který se nachází ve slupkách citrusových plodů. Patří mezi flavonoidy [34]. Vykazuje antioxidační, antibakteriální a protizánětlivou aktivitu. Je to také silné chemopreventivní činidlo a má inhibiční účinky na karcinogenezi [35], [36]. Je to rhamnoglukosid (rutinosid) hesperetinu (aglykonu). Výsledky studie, která zkoumala

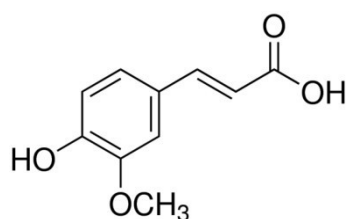
interakce hesperidinu s biologickými membránami, ukazují, že hesperetin interaguje s biologickými membránami lépe než hesperidin. Je tedy možné, že hesperidin, vzhledem k jeho rutinosidové části, má nižší biologickou dostupnost. Hesperetin interaguje lépe s acylovými řetězci membrány [37].



Obr. 2.17: Struktura hesperidinu

2.4.17 Kyselina ferulová

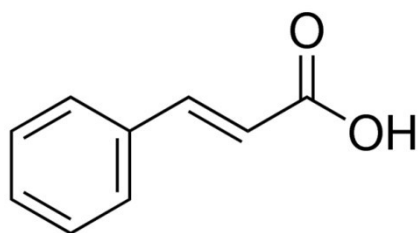
Kyselina ferulová (hydroxyskořicová) je fytochemická látka běžně se vyskytující v ovoci a zelenině, jako jsou rajčata, kukuřice, rýže a otruby. Vykazuje široké spektrum léčebných účinků proti různým chorobám, jako je rakovina, diabetes a další kardiovaskulární a neurodegenerativní nemoci. Patří mezi fenolické sloučeniny, které se díky své hydroxylové skupině vyznačují jako silné antioxidanty. Účinně degraduje superoxidový aniontový radikál a inhibuje peroxidaci lipidů. Tento fakt je využit v potravinářském průmyslu, kde je kyselina ferulová využívána v některých zemích jako potravinářská přídatná látka [38].



Obr. 2.18: Struktura kyseliny ferulové

2.4.18 Kyselina skořicová

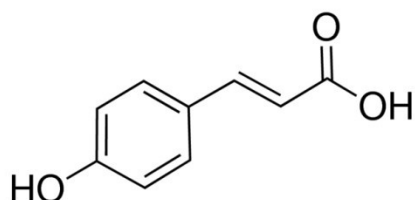
Získává se z oleje skořice. Může také být vyrobena synteticky. Kyselina skořicová se používá jako chutidlo i jako léčivo, ačkoli její primární použití je při výrobě parfémů. Kyselina skořicová je také součástí biosyntetické šikimátové a fenylypropanové cesty. Biosyntéza této kyseliny probíhá působením enzymu fenylyalaninamoniaklyasy na fenylyalanin. Kyselinu skořicovou také produkují houbové spory jako vlastní inhibitory klíčení [39].



Obr. 2.19: Struktura kyseliny skořicové

2.4.19 Kyselina *p*-kumarová

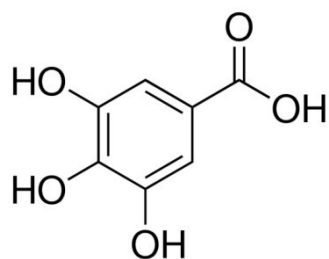
Kyselina kumarová je hydroxyderivát kyseliny skořicové. Byla nalezená v mnoha druzích ovoce a zeleniny [40]. Existují tři izomery této kyseliny: *o*-kumarová, *m*-kumarová a *p*-kumarová, které se liší podle polohy hydroxylové skupiny. Nejhojnějším izomerem vyskytující se v přírodě je kyselina *p*-kumarová [41]. Patří mezi látky, které brání infekčním organismům jejich množení a šíření nákazy. Je to přirozeně se vyskytující nebo syntetická látka, která inhibuje nebo zpomaluje oxidaci látek a zabraňuje tak škodlivým účinkům oxidace v živočišných tkáních. Mezi další vlivy této kyseliny patří ochrana pankreatických ostrůvků před poškozením cytokiny a zabraňuje také myokardiálním a plicním perfúzím [42]. Ukazuje se, že hydroxyskořicové kyseliny, kyselina ferulová a kyselina kumarová, mají schopnost chránit buňky proti oxidačnímu stresu a dále působí proti genotoxicitě [43].



Obr. 2.20: Struktura kyseliny *p*-kumarové

2.4.20 Kyselina gallová

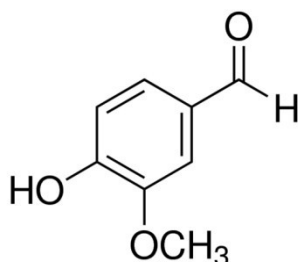
Kyselina gallová je ve vodě rozpustná fenolická kyselina, přítomna v hroznech a v listech mnoha rostlin. Kromě samotné kyseliny gallové, jakožto antioxidantu, mají antioxidantní účinek i její estery, jako jsou taniny, katechiny a galláty [44]. Tyto estery mají různorodé průmyslové využití buď jako antioxidanty v potravinách, v kosmetice, nebo i ve farmaceutickém průmyslu [45]. Mají antikarcinogenní a antiangiogenní aktivitu [44]. Kyselina gallová a její katechinové deriváty jsou také přítomny jako jedny z hlavních fenolických složek v černém i v zeleném čaji. Navíc se kyselina gallová používá jako výchozí materiál pro inkousty a barvy [45].



Obr. 2.21: Struktura kyseliny gallové

2.4.21 Vanillin

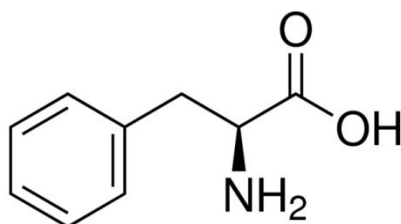
Využívá se jako antikonvulzivum v léčích, používané k prevenci záchvatů nebo k jejich snižování, dále jako antioxidační činidlo přirozeně se vyskytující nebo syntetické, které inhibuje nebo zpomaluje oxidaci látky. Dále se používá jako látka, která snižuje frekvenci nebo rychlost spontánní nebo indukované mutace [46]. Vanilin je jedním z nejvíce používaných ochucovadel na světě a je tedy řazen jako potravinářské aditivum. [47], [48].



Obr. 2.22: Struktura vanilinu

2.4.22 L-fenylalanin

L-fenylalanin je esenciální aminokyselina a je jedinou formou fenylalaninu, která nalezena v proteinech. Studie tuto látku zařazují také mezi antioxidanty. Větší mírou, společně s UVA zářením, přispívá hlavně k léčbě nemoci vitiligo (k tzv. repigmentaci) [49], [50]. K hlavním potravinovým zdrojům L-fenylalaninu patří maso, ryby, vejce, sýr a mléko. Fenylalanin se dále používá k léčbě deprese, nedostatku pozornosti, hyperaktivity a Parkinsonovy nemoci

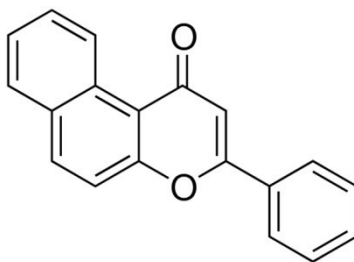


[49].

Obr. 2.23: Struktura L-fenylalaninu

2.4.23 β -naftoflavon

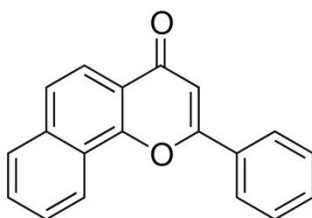
β -naftoflavon je derivát flavonu a je znám také jako 5,6-benzoflavon [51]. Je induktorem pro enzym cytochrom P450 a je agonistou pro arylhydrokarbonový receptor (mediátor toxického účinku xenobiotik, hlavně aromatických uhlovodíků, v organismu) [52], [53]. Chrání organismus proti chemicky indukovaným karcinogenezím tím, že pomáhá při detoxikaci karcinogenních látek [51].



Obr. 2.24: Struktura β -naftoflavonu

2.4.24 α -naftoflavon

α -naftoflavon je derivát flavonu a je znám také jako 7,8-benzoflavon. Je to přirozeně se vyskytující látka, která byla nalezena v mučence. α -naftoflavon je inhibitor enzymu CYP19 [54]. α -naftoflavon je flavon, který moduluje metabolismus xenobiotik na několika místech. Působí jako antagonist arylhydrokarbonového receptoru, a tím pomáhá také léčit rakovinu prsu [55], [56]. Experimenty ukazují na inhibiční vlastnosti této látky také vůči cytochromům P450 a CYP1A1 [54].

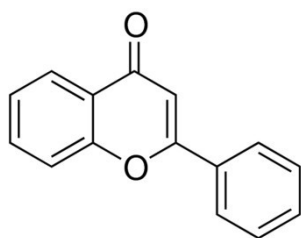


Obr. 2.25: Struktura α -naftoflavonu

2.4.25 Flavon

Jako základní struktura flavonoidů je struktura flavonu. U této látky bylo prokázáno, že má protirakovinné účinky. Inhibiční funkce flavonu jsou spojené s oxidem dusnatým. Flavon inhibuje syntézu NO a inhibuje tak jeho tvorbu. Syntéza NO je obecně zvýšená u různých

nádorových buněk. Výsledky ukazují, že flavon potlačuje proliferaci buněk u rakoviny prsu a

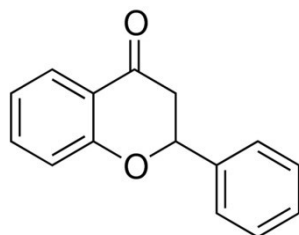


indukuje jejich apoptózu [57].

Obr. 2.25: Struktura flavonu

2.4.26 Flavanon

Patří mezi přírodní flavonoidy s protizánětlivými účinky a řadí se mezi majoritní skupinu látek obsažených v citrusových plodech [58], [59]. Je to silný induktor apoptózy s antiproliferativními vlastnostmi v různých nádorových buněčných liniích [58], [60]. Nedávné studie ukázaly, že flavanony obsaženy v citrusech mohou mít důležitou úlohu v péči o zdraví člověka. Metabolity flavanonu byly spojeny s metabolismem kostí, prevencí kardiovaskulárních onemocnění a snižují riziko rakoviny. [61]



Obr. 2.27: Struktura flavanonu

2.5 Přehled metod pro analýzu a identifikaci polyfenolických látek

Polyfenoly dostávají značnou pozornost v literatuře, zejména z důvodu pro jejich biologický a fyziologický význam. Metody, které se využívají, jsou: kapalinová chromatografie (LC), plynová chromatografie (GC), která je pro stanovení polyfenolů obtížnější kvůli vysokým teplotám a potřebným derivatizacím, kapilární elektroforéza (CE), kde se využívá rozdílných mobilit látek v kapiláře, naplněné elektroforetickým médiem (borátový pufr), a chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Tato metoda se používá jako hrubé vodítko a je nyní využívána hlavně pro screening polyfenolů nebo pro rychlou separaci látek ještě před podrobnější analýzou [62]. Co se týče kapilární zónové elektroforézy (CZE), ta mnohdy bývá využívána pro separaci látek jako další možnost rychlé a levné analýzy, která může být oproti HPLC i selektivnější. Selektivnost této metody závisí na polaritě použitého pufru [66]. Vzhledem k rostoucímu zájmu o objasnění struktury látek, je také zvláštní pozornost věnována využívání tandemového hmotnostního spektrometrického detektoru (MS/MS), a chromatografii kombinovanou s UV detektorem s diodovým polem (UV-DAD) a dále nukleární magnetické rezonanci (NMR), která je důležitá hlavně ve schopnosti odlišit izomery. V důsledku nepřehledného množství polyfenolů je separace, identifikace a stanovení těchto látek náročné [62],[63].

Mezi nejčastější strukturální typy patří flavonové a flavonolové sloučeniny. Výhodou těchto látek je, že se i drobné rozdíly ve strukturách projeví výrazně na rozdílech v UV-VIS spektrech, která tak umožňují jejich rychlou diagnostiku. Kombinací tradičních analytických technik s moderními instrumentálními je získáno mnoho informací o látkách, např. díky hmotnostním a UV-VIS spektrům jednotlivých složek v komplexních směsích, a tak je možno alespoň částečně identifikovat většinu komponentů bez rozsáhlé purifikace jednotlivých sloučenin. Je zde tedy popsán obecný přehled typických postupů používaných pro stanovení složek polyfenolických látek [63].

2.5.1 HPLC

Díky specifickým UV-VIS spektrům většiny flavonoidů a široké dostupnosti systémů, které mají schopnost měřit s více vlnovými délkami nebo s možností nahrávat on-line spektra, je dnes HPLC nepreferovanější metodou pro analýzu polyfenolických látek. Nejčastější separace je prováděna na reversní fázi (C18) s gradientovým elučním systémem, počínaje převážně vodnou fází, ke které se postupně zavádí zvyšující se podíl organického rozpouštědla, nejčastěji methanol nebo acetonitril.

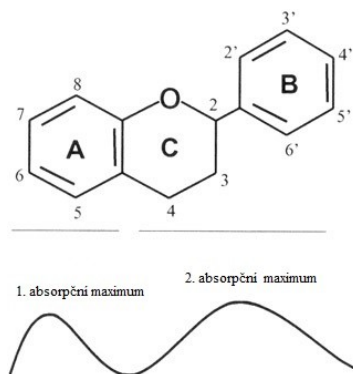
Protože většina těchto látek jsou ionizovatelné, přidává se pro řízení pH do mobilní fáze některá z anorganických nebo organických kyselin. Pořadí eluce je pak od nejvíce polárních k nejméně polárním [63]. Pořadí eluovaných látek je dáno substitucí B-kruhu flavanové struktury, kde záleží na počtu, poloze a typu připojených sacharidových jednotek. Nejprve je eluována většina glykosidů, následují diglykosidy, poté acylované nebo alkylované monoglykosidy a aglykony. Afinita látek k mobilní fázi klesá v pořadí flavanony, poté flavonoly a v poslední řadě flavony [63], [66].

UV detektor s diodovým polem

Většina polyfenolických látek jsou extrahovány do alkoholového (zejména nepolární látky) či alkohol-vodného roztoku [63]. Tento detektor snímá spektra látek v širokém rozsahu vlnových délek. Při zvyšujícím se počtu hydroxylových skupin v molekule se absorpční maximum látky posouvá k viditelné oblasti spektra [66].

UV-VIS spektrometrický detektor

Velmi často se pro identifikaci polyfenolických látek používají UV-VIS spektra, která jsou nejčastěji doplňková k jiné instrumentální metodě. Látky jsou rozpuštěny v alkoholickém roztoku a měří se základní spektrum [63]. Aglykony obsahují alespoň jeden aromatický kruh, a v důsledku toho, účinně absorbují UV záření. Jednoduché substituenty jako methyl, methoxy a hydroxylové skupiny ovlivňují absorpční maximum jen málo [62]. Většina fenolických látek ukazuje maximum v oblasti 210 -290 nm (vliv A kruhu) a druhé maximum v oblasti od 320 do 380 nm (substituce a konjugace kruhu C) [62], [63].



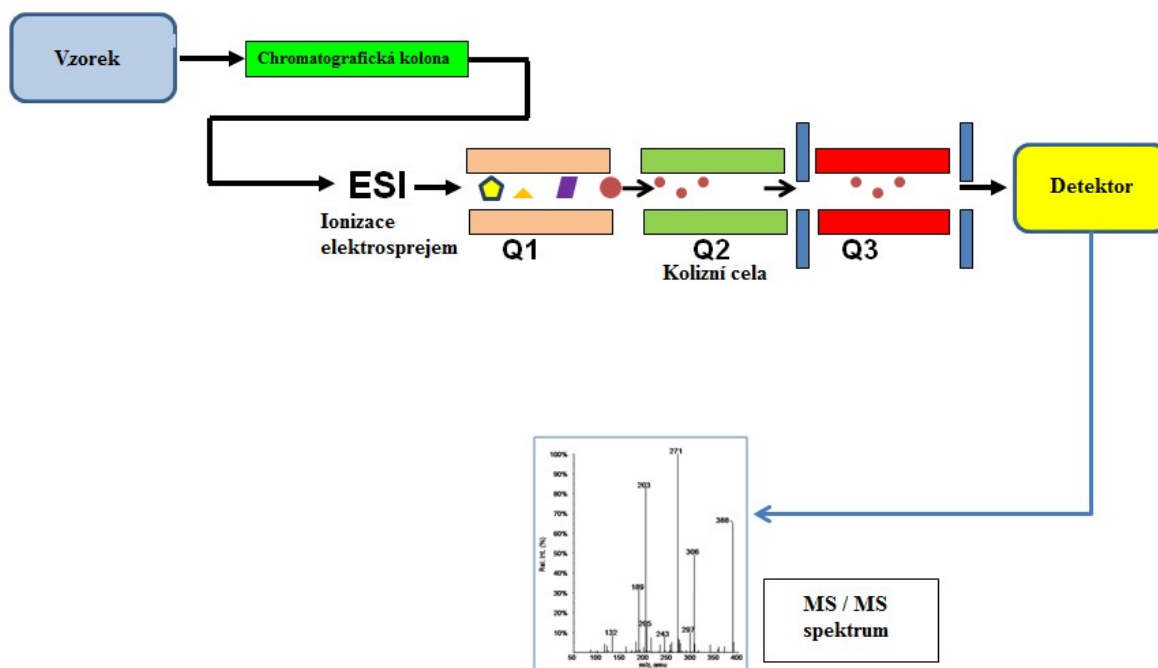
Obr. 2.28: Základní struktura flavonoidů a zobrazení umístění jejich absorpčních maxim ve spektru [75].

Fluorimetrický detektor

S tímto detektorem se měří dva parametry nezávisle na sobě - excitační a emisní vlnové délky. Výhoda tohoto detektoru spočívá ve vysoké citlivosti. Mez detekce je až 1000x menší než u fotometrické detekce. Je také vysoce selektivní, jelikož se jím mohou měřit látky pouze s přirozenou fluorescencí nebo látky, které se mohou vhodně derivatizovat k převodu na fluoreskující sloučeniny [66].

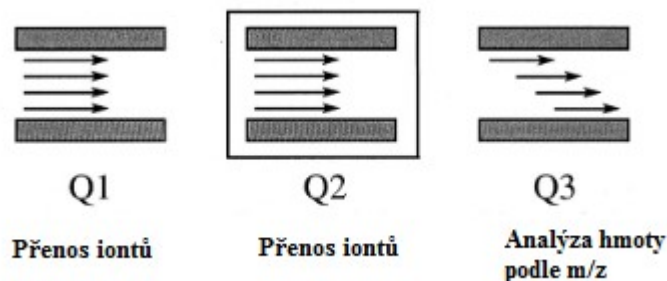
Hmotnostní detektor (MS/MS)

Metoda, kde se polyfenolické látky ionizují bombardováním buď rychlými atomy, desorpcí plazmy, chemickou ionizací nebo nárazem elektronů. Analýzu látek v jejich nativní podobě bez potřebné derivatizace umožňují měkké ionizační techniky za atmosférického tlaku - termosprej a elektrosprej, který může být přímo navázán na kapalinovou chromatografii. Jeho výhodou je vysoká citlivost a šetrnost pro termolabilní látky [66]. Ionizací vznikají molekulární ionty $[M+H]^+$ [63]. V kolizní cele jsou dále tyto ionty fragmentovány, a podle produktů štěpení jsou látky detekovány [62]. Např. diglykosidy mohou ztratit cukernou jednotku, a tím se získají výsledné fragmenty. Toto může pomoci při hodnocení cukrů, zda-li se vyskytují jako disacharidy nebo jako jednotlivé monosacharidy vázané do různých poloh [63].



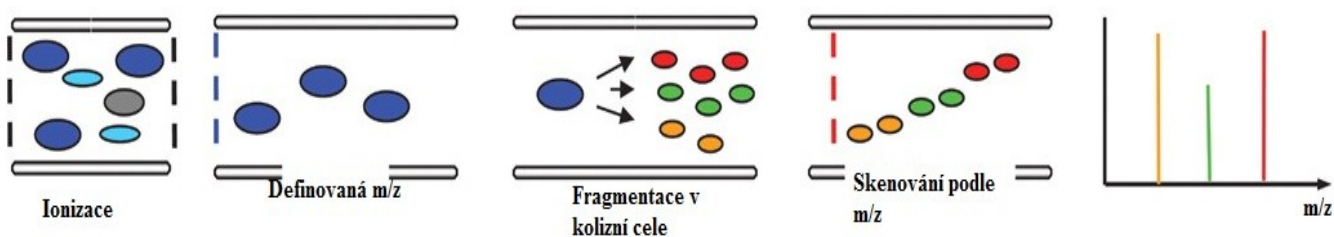
Obr. 2.29: Schéma HPLC-MS/MS s trojitým kvadrupólem [76]

V této metodě se pracuje s trojitým kvadrupólem a různými skeny. K měření ionizačního hmotnostního spektra látek slouží sken SIM (Selected Ion Monitoring), kde systém pracuje jen v režimu jednoduchého kvadrupólu a propouští tak na detektor pouze ionty, jejich m/z byla zvolena, což popisuje obrázek č. 2.30.



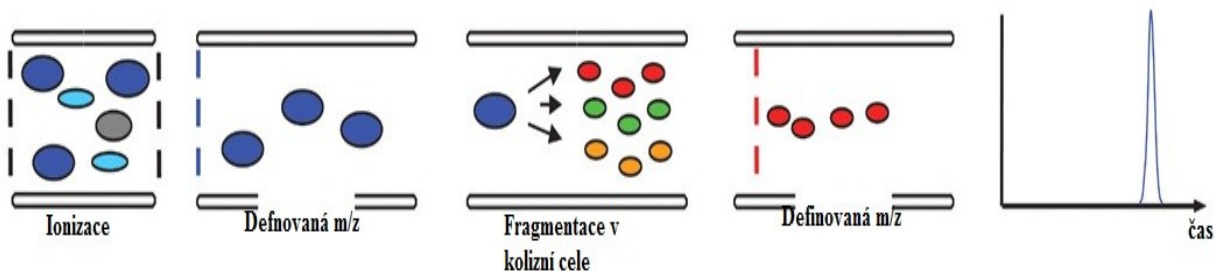
Obr. 2.30: Systém trojitého kvadrupólu. Měření pomocí skenu SIM (Selected Ion Monitoring) [77]

K měření produktových iontů vytvořené fragmentací molekulárního iontu se využívá sken Product Ion, kde systém pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. První kvadrupól (Q1) slouží k přenosu určené m/z , ta je dále rozštěpena v kolizní cele (q2) a vznikají tak produktové ionty, a ve třetím kvadrupólu (Q3) jsou tyto vzniklé ionty detekovány, což dále popisuje obr. 2.31.



Obr. 2.31: Systém trojitého kvadrupólu. Měření pomocí skenu Product Ion [78]

K identifikaci látek v hmotnostním spektru se používá typ skenu MRM (Multiple Reaction Monitoring), kde systém pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. Nejprve se definuje m/z vybrané látky, která se zkoumá, a ta projde prvním kvadrupólem (Q1) jako prekurzorový ion. Je poté rozštěpena v kolizní cele (q2) a třetím kvadrupólem (Q3) prochází vzniklý produktový ion o definované m/z a je detekován. Tento děj je popsán na následujícím obrázku č. 2.32.



Obr. 2.32: Systém trojitého kvadrupólu. Měření pomocí skenu MRM (Multiple Reaction Monitoring) [78]

Elektrochemické detektory

Většina polyfenolických látek se skládá z pyranového kruhu (C kruh), který je připojen na další dva fenolové kruhy (A a B kruhy). Na každém z těchto kruhů se mohou vyskytovat hydroxylové nebo metylové skupiny, které ovlivňují svou oxidací oxidačně-redukční potenciál [63]. Míra rozlišitelnosti látek závisí na schopnosti se oxidovat (nebo redukovat). Pro analýzu se používá např. voltametrie, která se využívá pro analýzu velmi malých koncentrací látek, pokud jsou oxidovatelné nebo redukovatelné, nebo coulometrie, díky níž je možno dosáhnout větší citlivosti a selektivity vůči analytu [66]. Elektrochemické detektory se také mohou používat v kombinaci s UV-VIS spektrometrickou detekcí [63].

2.6 Identifikace polyfenolických látek

Cílem mnoha studií je identifikovat a stanovit polyfenolické látky v různých vzorcích a extraktech, jejichž původ je velice rozmanitý. Prvním krokem tohoto cíle bývá často separace těchto látek. Je většinou prováděna pomocí metody RP-HPLC. Nejčastěji se používají analytické kolony s nepolární stacionární fází C18 s velikostí částic od 2-5 μm . Rozměry kolony jsou různé. Kolony jsou vyhřívány od 25 až 40 $^{\circ}\text{C}$ pro zkrácení doby analýzy a její dobrou opakovatelnost.

Pracuje se s polární mobilní fází, která většinou obsahuje binární systém složek, z nichž jedna je organická a druhá složka je vodná. Přidávají se kyseliny, které slouží jako pufr mobilní fáze. Acidita fáze po tomto přídavku se tedy pohybuje od 2-4 pH. Separace se uskutečňuje nejčastěji s gradientovou elucí, ale je možné tyto látky identifikovat i s elucí izokratickou. Řada autorů používala nejčastěji pro gradientovou eluci acetonitril nebo methanol jako organický podíl mobilní fáze, dále kyseliny mravenčí nebo octovou a vodu [67, 68, 69, 70, 71, 72, 73]. Bývá používána i kyselina fosforečná, ale bylo zjištěno, že se pro detekci MS není příliš vhodná z důvodu kontaminace iontového zdroje [71]. V případě chemiluminiscenční detekce je tato kyselina vhodnější [72]. Při identifikaci fenolických komponent v extraktech kakaa se používal přídavek kyseliny 0,1 % trifluoroctové [70].

Prokázalo se, že je možné identifikovat látky též pomocí aplikované izokratické eluce s 0,1 % kyselinou octovou a methanolem (20:80, v/v) [68].

Průtoky mobilní fáze se liší. Při identifikaci a stanovení polyfenolických látek v extraktu z pcháče bahenního byla rychlost průtoku mobilní fáze 1 ml/min (stejně jako při separaci látek v medu). Při separaci látek v extraktu ze vzorku červeného vína byl průtok 0,4 ml / min, při analýze látek z částí ořecháku královského 0,6 ml/min, pro extrakt malajsijského kakaa se použil průtok 0,8 ml/min, a při separaci látek v extraktu z natě karbince evropského byla použita průtoková rychlost mobilní fáze 0,30 ml / min [67, 68, 69, 70, 72, 73].

Délka trvání analýzy je v řádu desítek minut až hodin a je závislá na přechozích parametrech. Analýza pomocí HPLC je mnohdy využívána také pro možnost použití malých objemů, řádově jednotek a desítek μl .

Pro detekci polyfenolických látek se nejčastěji používá hmotnostní spektrometr (MS/MS) a DAD. Je možná také chemiluminiscenční detekce a mnoho dalších [67, 68, 69, 70, 71, 72, 73].

3 Experimentální část

3.1 Použité přístroje

Identifikace polyfenolických látek se prováděla nejdříve pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV-DAD detektorem, poté pomocí HPLC spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Typ kolony a použitý gradient byly zvoleny podle literární rešerše.

3.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Separace probíhala na biokompatibilním kapalinovém chromatografu Ultimate 3000 RSLC (Dionex, USA), který je sestaven z kvarterní vysokotlaké pumpy Ultimate 3000 RS Pump (Dionex, USA), termostatovaného automatického dávkovače (autosampleru) Ultimate 3000 RS Autosampler (Dionex, USA), termostatu pro předkolonu a kolonu, a nakonec DAD detektoru Ultimate 3000 Diode Array Detector (Dionex, USA). Pro řízení kapalinového chromatografu a sběr dat a jejich vyhodnocení byl použit software Chromeleon 7 (Dionex, USA).

Pro separaci byla použita chromatografická kolona s navázanou fází C 18: RP-Gemini 3 μ m C18 110A (250 mm x 3,0 mm) (Phenomenex, USA). Během měření byly použity celkem dvě identické kolony.

3.1.2 UV-VIS spektrometr

Pro sledování časové stability připravených zásobních roztoků jednotlivých derivátů polyfenolů byl použit UV spektrometr Agilent 8453 (Agilent, USA), který je určen k měření roztoků ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra v rozsahu 190-1100 nm s rozlišovací schopností 0,5 nm. Pro řízení přístroje a sběr dat byl použit program UV-Visible ChemStation, ver. 9.01. (Agilent, USA). Měření byla prováděna v křemenné kyvetě s tloušťkou absorpční vrstvy 10 mm.

3.1.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

Pro identifikaci jednotlivých derivátů polyfenolů v rostlinných extraktech byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) a s ním spojená tandemová hmotnostní spektrometrie s detektorem s trojitým kvadrupólem

Agilent 6460 Triple Quad LC/MS (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo). MS detektor využívá měkké ionizační techniky - iontového zdroje elektrospreje (slouží pro zplynění mobilní fáze a ke konverzi analytu na ionty za atmosférického tlaku). Při ionizaci v pozitivním módu nastává přijetí protonu v molekule analytu za vzniku molekulárního iontu $[M+H]^+$, v negativním módu je naopak proton odebrán a vzniká molekulární ion $[M-H]^-$. Tyto ionty prochází dále trojitým kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem. Tři kvadrupóly jsou zapojeny sériově za sebou, přičemž první (Q1) a třetí kvadrupól (Q3) rozděluje hmoty podle poměru m/z , v druhém kvadrupólu (q2), konkrétně hexapólu, dochází k její fragmentaci na produktové ionty. Díky tomuto zapojení se může sledovat specifický přechod mezi prekurzorovým a produktovým molekulárním iontem určitého analytu. Důležitou součástí je iontová optika, včetně iontové kapiláry, na které je vkládáno vysoké napětí. Síla tohoto napětí ovlivňuje vznik a velikost prekurzorových iontů. Pro řízení HPLC s MS detektorem a pro sběr dat a jejich vyhodnocení byl použit software Mass Hunter Workstation (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo).

Pro úpravu pH mobilní fáze byl použit pH metr PHM64 (Radiometer, Dánsko) s kombinovanou skleněnou elektrodou GK 2401B téhož výrobce.

3.2 Použité chemikálie

Pro přípravu mobilní fáze byly použity chemikálie o čistotě „pro HPLC“. Acetonitril ($\geq 99,9\%$) a kyselina mravenčí ($\geq 98\%$) vyrobila firma Sigma-Aldrich, USA.

Methanol ($\geq 99\%$), používaný při rozpouštění derivátů, byl také zakoupený od firmy Sigma-Aldrich, USA.

Použitá deionizovaná voda o čistotě $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ byla připravena systémem MilliQ_{plus} (Millipore, USA).

3.3 Standardy polyfenolických látek

Všechny standardy byly zakoupeny od komerčních výrobců. Téměř všechny (kromě guajakolu) byly dodány v pevné sypké formě v malém množství. Příprava standardů k měření spočívala v přesném navážení každého z nich na analytických vahách a rozpuštění v 10 ml odměrné baňce methanolem. Některé z těchto derivátů musely být rozpuštěny v methanolu s přídavkem kyseliny mravenčí (poměr methanolu a kyseliny mravenčí byl 7:3) a za pomoci ultrazvukové lázně E 30H (Elmasonic, Německo). Připravené zásobní roztoky standardů byly

uchovávány v lednici při 4°C. V Tab. 3.1 je uveden přehled použitých dostupných standardů polyfenolických látek, jejich navážek, koncentrací a čistoty.

Tab. 3.1: Přehled vybraných standardů polyfenolických látek rozpuštěných v methanolu

Standard	Mr	Čistota (%)	Výrobce	Navážka ($m \cdot 10^{-5}$ g)	Koncentrace ($c \cdot 10^{-5}$ mol/l)
Naringin	580,53	≥ 90	Sigma	5,00	0,86
Flavon	222,24	-	Sigma	3,00	1,34
Kyselina ferulová	194,18	≥ 99	Sigma	1,00	0,52
Dihydromyricetin	320,25	-	Apichem	7,00	2,18
Hesperidin	610,57	≥ 80	Sigma	6,00	0,98
Kyselina gallová	170,12	≥ 97	Sigma	2,00	1,18
Flavanon	224,26	≥ 98	Sigma	3,00	1,34
Resveratrol	228,24	≥ 99	Prof. Křen	9,00	1,00
4-methylumbelliferon	184,18	≥ 98	Fluka	23,00	1,18
3-hydroxyflavon	238,25	-	Sigma	3,00	1,25
Quercetin (dihydrát)	338,27	≥ 99	Riedel	7,00	2,07
Quercitrin	448,38	-	Sigma	7,00	1,56
Chrysin	254,24	-	Aldrich	25,00	9,80
α-naftoflavon	272,31	≥ 93	Merc	19,00	6,90
Kyselina skořicová	148,16	≥ 99	Sigma	3,00	2,02
Diosmin	608,58	≥ 95	Sigma	16,00	2,62
Kyselina <i>p</i> -kumarová	164,16	≥ 98	Sigma	4,00	2,43
Kurkumin	368,38	≥ 95	-	21,00	5,70
Morin	302,24	-	Sigma	6,00	1,98
Vanilin	152,15	≥ 99	Roth	16,00	30,00
Rutin	610,52	≥ 95	-	6,10	9,80
Baicalin	446,36	≥ 95	-	6,00	1,30
Guajakol	124,10	-	Sigma	111,00	89,40
Hesperetin	302,30	≥ 95	Sigma	4,00	1,30
L-fenylalanin	165,10	≥ 98	Sigma	9,00	5,40
β-naftoflavon	272,30	≥ 90	Sigma	14,00	5,10

3.4 Příprava mobilní fáze

Bylo připraveno 500 ml roztoku, který obsahoval 10 % acetonitrilu, 0,1 % kyseliny mravenčí a zbytek deionizované vody. pH mobilní fáze bylo upraveno na hodnotu 2,76.

3.5 Vzorky – extrakty léčivých rostlin

Všechny rostlinné extrakty poskytla katedra biochemie z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Jednalo se o rostlinné extrakty z máty peprné, řebříčku obecného, dobromysli obecné, šalvěže lékařské, stévie sladké a vlašovičnicku většího.

Příprava extraktů je popsána níže. Extrakčním médiem pro tyto extrakty byl methanol nebo voda. Extrakty byly dodány již ve finální podobě, tedy ve formě roztoku v malém množství (1-2 ml).

Připravené extrakty byly zakalené se suspenzí, proto byla před analýzou nutná filtrace. Jinak by hrozilo poškození předkolony a kolony. Filtrace probíhala tak, že se určité množství vzorku (cca 1,5 ml) odsálo pomocí injekční stříkačky, na jejímž konci byl nasazen filtr o velikosti pórů 0,2 μm FP 30/0,2 CA-S (Whatman). Poté se přefiltrovaný vzorek převedl do nové čisté vialky. Tato filtrace byla prováděna dvakrát. Takto přefiltrované vzorky byly uchovávány v lednici při 4°C nebo při delším skladování v mrazničce při -18°C.

3.5.1 Příprava vzorků rostlin a podmínky jejich extrakce

Části rostlin, většinou natě, byly vyvařovány buď 30 minut v destilované vodě při teplotě 80°C, nebo 30 minut v 80% hm. methanolu při teplotě 70°C. V obou případech se používal zpětný chladič. Dále se tyto výluhy centrifugovaly při 9400g a filtrovaly přes 0,2 μm / 0,45 μm filtr. Na dně byl po delší době pozorován značný sediment, nejspíše se jednalo o pigmenty a další látky nerozpustné za nízkých teplot (chlorofyly apod.) Dále se tyto extrakty uchovávaly při teplotě pod -28°C.

4 Výsledky měření a diskuse

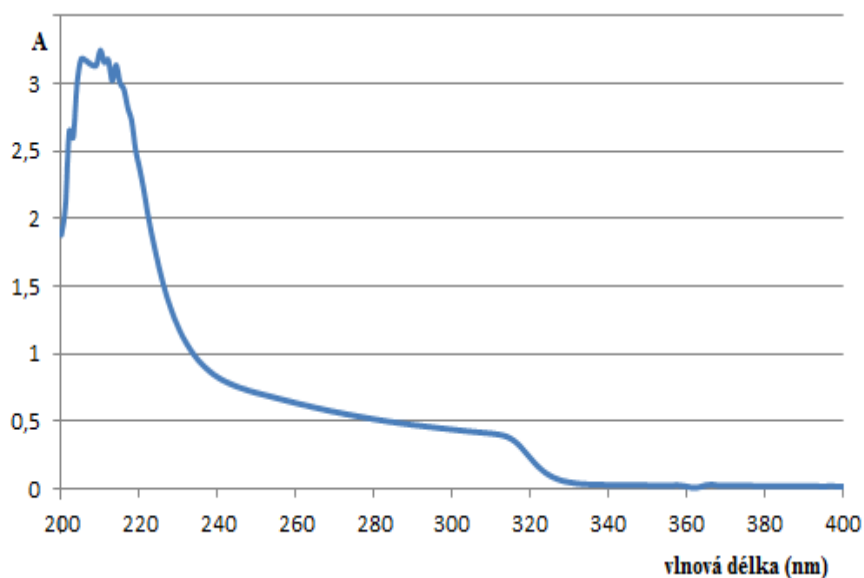
Cílem této diplomové práce bylo ověřit podmínky pro (HPLC/UV), HPLC/MS identifikaci vybraných polyfenolických látek, v rostlinných extraktech. K dispozici bylo celkem 26 standardů z různých skupin polyfenolických látek. Nejdříve byla ověřena stabilita jednotlivých derivátů (chemických individuů) v připravených zásobních roztocích. Poté byly ověřovány/modifikovány podmínky pro separaci co největšího počtu těchto standardů za použití vhodně zvoleného gradientu na koloně s navázanou stacionární fází C18. Toto bylo prováděno na HPLC s UV detekcí. Nakonec byl počet standardů z celkového počtu 26 omezen na výsledných 15 standardů. Do této výsledné skupiny 15 standardů byly zařazeny ty standardy, které se ionizovaly v MS detektoru a bylo je tedy možno identifikovat podle jejich MS spekter. Výsledná identifikace vybraných standardů polyfenolických látek v dodaných rostlinných extraktech pak byla prováděna s HPLC/MS instrumentací.

4.1 Měření stability roztoků standardů

Pro zjištění stability roztoků standardů byl použit UV-VIS spektrometr Agilent 8453. Měřila se UV spektra standardů ihned po smíchání a pak po určité době. Konkrétně po jedné hodině, po jednom dnu, po jednom týdnu a po jednom měsíci. Pro toto měření byla vždy použita stejná křemenná kyveta s tloušťkou absorpční vrstvy 10 mm. Jako blank byl vždy použit čistý methanol nebo methanol s přídavkem kyseliny mravenčí, v poměru 7:3. Vždy bylo snímáno UV spektrum v intervalu vlnových délek 190 až 400 nm.

Pro ilustraci je na obrázku č. 4.1 uvedeno spektrum standardu kyseliny gallové měřené po jednom měsíci od přípravy roztoku.

Obecně bylo zjištěno, že při uchovávání za stálé nízké teploty (4 °C) v tmavém prostředí jsou roztoky všech standardů stabilní a mohou se používat pro analýzu i po relativně dlouhém skladování (skladování v této práci činilo zhruba rok).



Obr. 4.1: Ukázka UV spektra kyseliny gallové změřeného jeden měsíc od přípravy roztoku.

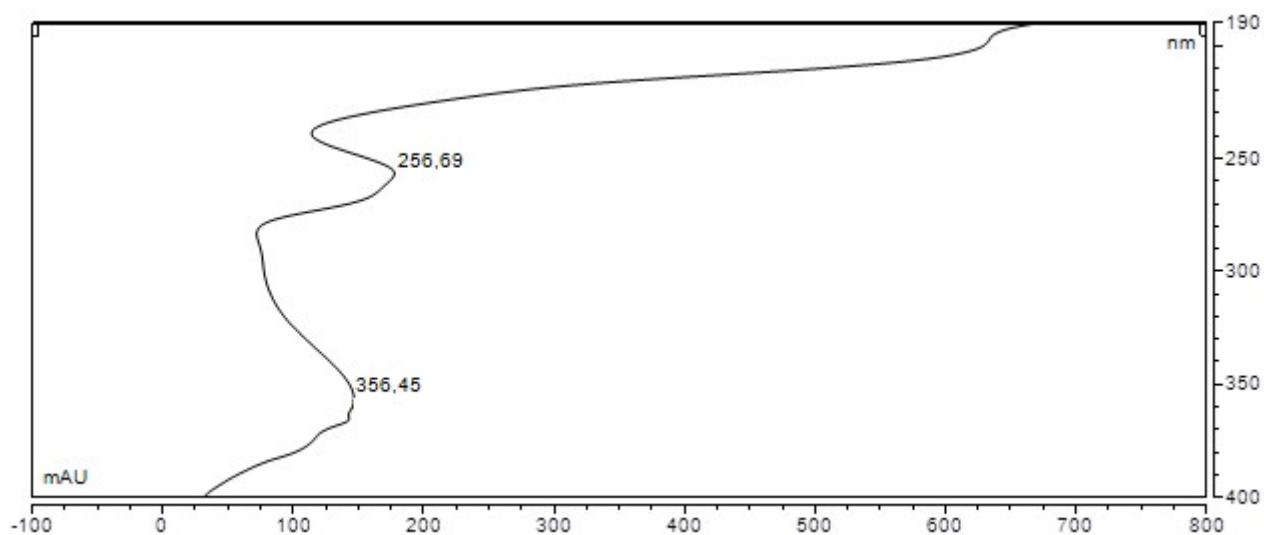
4.2 Hledání vhodné vlnové délky pro detekci souboru standardů polyfenolických látek

Získaná UV spektra jednotlivých derivátů standardů polyfenolických látek změřená pomocí spektrofotometru posloužila jako základ pro jejich porovnání se spektry odečtenými při nástřicích jednotlivých derivátů do HPLC s UV detekcí. Výsledné hodnoty odečtených maxim oběma způsoby jsou uvedeny v Tab. 4.1 a ukázky vybraných spekter standardů jsou na obrázcích 4.2 – 4.5. U některých látek byla získána dvě absorpční maxima, která jsou typická pro fenolické sloučeniny. První maximum se vyskytovalo mezi hodnotami vlnových délek 240 - 285 nm a druhé v rozmezí 305 - 370 nm.

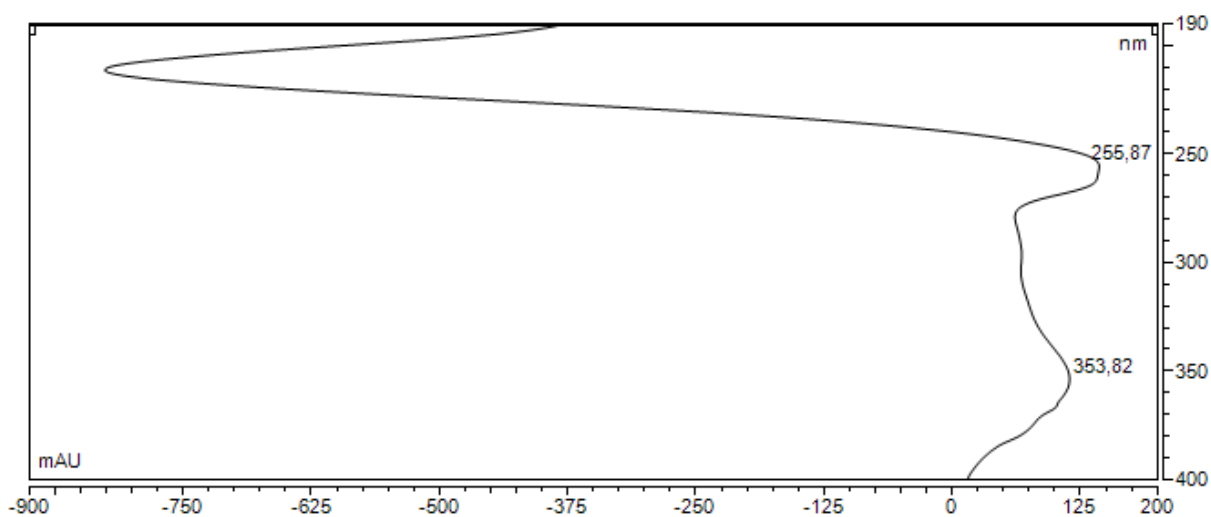
Pro detekci směsi standardů polyfenolických látek pomocí UV detektoru byla nakonec zvolena vlnová délka 290 nm.

Tab. 4.1: Naměřené vlnové délky absorpčních maxim standardů polyfenolických látek pomocí UV-VIS spektrofotometru a UV-detektoru s diodovým polem.

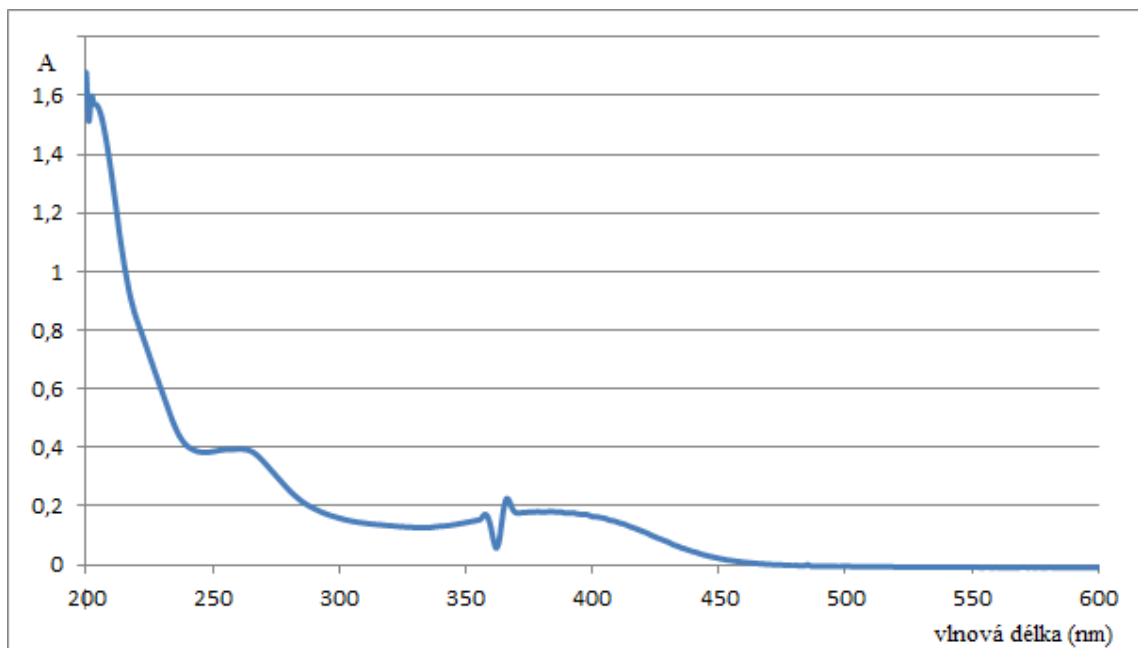
Standard	UV-VIS spektrofotometr Agilent 8453		UV-DAD detektor (HPLC)	
	vln.délka při absorpčním maximu (nm)		vln.délka při absorpčním maximu (nm)	
	1. maximum	2. maximum	1. maximum	2. maximum
Ferulová kyselina	353	-	239	308
Skořicová kyselina	310	-	312	-
Kumarová kyselina	315	-	316	-
Gallová kyselina	298	-	287	-
Rutin	247	354	256	356
Morin	254	365	255	353
Vanilin	257	310	279	310
β -naftoflavon	307	-	-	-
L-fenylalanin	281	-	-	-
Hesperetin	279	-	287	-
Quercitrin	250	352	256	354
Chrysin	250	310	268	312
α - naftoflavon	267	335	-	-
Kurkumin	280	-	264	-
Baicalin	307	-	276	314
Naringin	277	314	278	365
3-hydroxyflavon	339	-	241	343
Quercetin	248	365	256	374
Flavon	288	-	252	297
4-methylumbelliferon	247	316	221	321
Resveratrol	282	323	282	317
Flavanon	283	-	-	-
Dihydromyricetin	282	-	291	-
Diosmin	279	-	-	-
Hesperidin	274	-	284	-



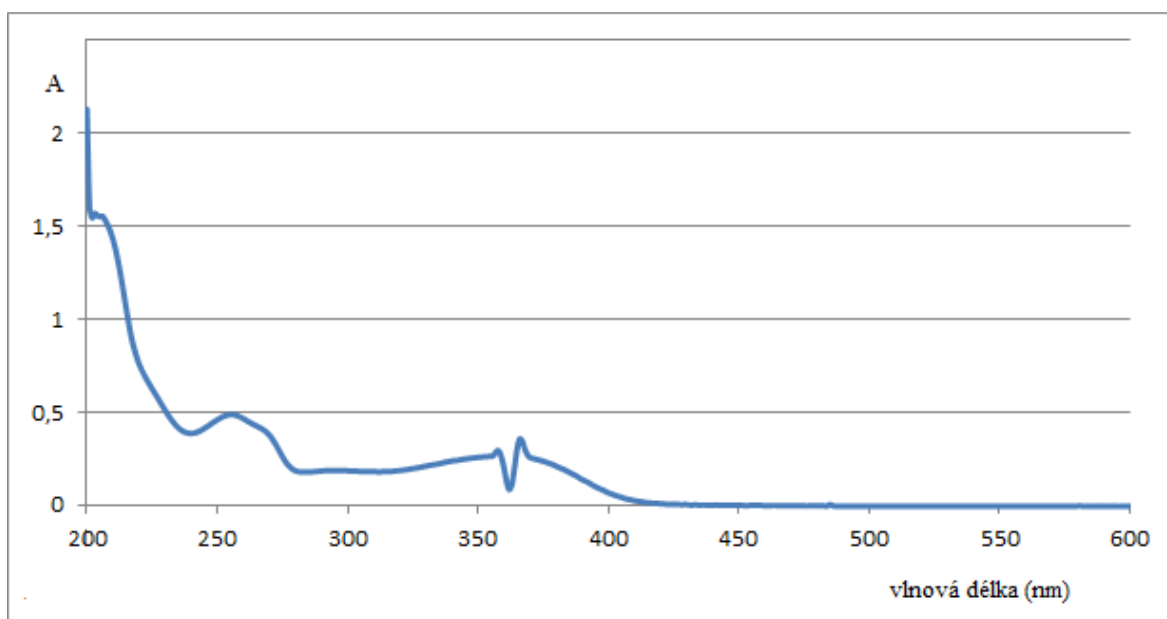
Obr. 4.2: UV spektrum rutinu změřené UV-DAD, kde dvě absorpční maxima byly zjištěny při vlnových délkách 256 a 356 nm.



Obr. 4.3: UV spektrum morinu změřené UV-DAD, kde byla absorpční maxima zjištěna při vlnových délkách 255 a 353 nm.



Obr. 4.4: UV spektrum morinu změřené pomocí UV-VIS spektrometru, kde byla absorpční maxima zjištěna při vlnových délkách 254 a 365 nm.



Obr. 4.5: UV spektrum rutinu změřené pomocí UV-VIS spektrometru, kde byla nalezena absorpční spektra při vlnových délkách 247 a 354 nm.

4.3 Ověření/modifikace optimálních podmínek pro separaci standardů polyfenolických látek

Pro separaci polyfenolických látek v této práci byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie. K identifikaci nejprve posloužila detekce DAD, která poskytla také jejich celá UV spektra; poté se látky identifikovaly hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem.

Konkrétní kolona (RP-Gemini 3 μ m C18 110A (250 mm x 3,0 mm)), mobilní fáze a gradient mobilní fáze pro separaci byly zvoleny na základě literární rešerše, díky které byly zjištěné podmínky aplikovány/modifikovány na naši konkrétní směs standardů polyfenolických látek. Ve zmíněné studii byly identifikovány polyfenolické látky pomocí HPLC-DAD a HPLC-ESI-MS, kde separace probíhala na RP80 A koloně (150 mm \times 2 mm, 4 μ m). Pracovalo se s gradientovou elucí, která se na počátku gradientu skládala ze 100 % vodné složky (voda s 0,1 % kyselinou mravenčí) a v průběhu se snižovala na 60 %. Organickou složku v mobilní fázi tvořil acetonitril s 0,1 % kyseliny mravenčí. Analýza trvala 60 minut. Průtoková rychlost mobilní fáze byla 0,2 ml/ min [74].

V této diplomové práci tedy nebylo nutné podrobněji sledovat vlivy různých parametrů na separaci; doporučené podmínky byly pouze ověřeny/modifikovány na náš konkrétní systém.

4.3.1 Optimalizace podmínek pro analýzu čistých standardů a směsi standardů polyfenolických látek pomocí metody HPLC

Pro optimalizaci/ověření/modifikaci separačních podmínek byl použit systém HPLC s UV detekcí. Analýza probíhala již na zmíněném chromatografu Dionex, kde se látky separovaly na již popsané koloně s reverzní fází, vyhřívané na 40 °C. Pracovalo se s gradientovou elucí, kde se měnily poměry složek mobilní fáze v čase. Podíl organické složky acetonitrilu, ve směsi s deonizovanou vodou, se zvyšoval, tak jak je to znázorněno v tabulce č. 4.2. Pro snížení pH se k této mobilní fázi přidala 0,1 % kyselina mravenčí. Kyselé pH mělo potlačit disociaci polyfenolických látek- standardů. pH mobilní fáze bylo 2,76.

Průtok mobilní fáze činil 0,32 ml/min, tlak na koloně za takto zvolených podmínek byl 160 barr. Analýza trvala 30 minut. Pro zachování stability jednotlivých standardů byla teplota automatického dávkovače snížena na 4 °C. Objem vstříkovaného vzorku byl 20 μ l.

Tab. 4.2: Použitý gradient pro separaci směsi jednotlivých standardů

Mobilní fáze: 10-60 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,32 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 160 barr. Čas analýzy: 30 min. Detekce: 290 nm.

Čas (min)	% acetonitrilu	% vody	% kyseliny mravenčí
0	10,0	89,9	0,1
20	60,0	39,9	0,1
25	10,0	89,9	0,1
30	10,0	89,9	0,1

Touto gradientovou elucí, a těmito podmínkami, byly změřeny retenční časy několika standardů. Zřejmě se jednalo o polární až středně polární látky. Méně polární látky se na koloně více zachycovaly a jejich retenční čas přesahoval limit pro 30 minutovou analýzu. Gradient byl proto dále optimalizován.

Standardy se zjištěným retenčním časem pomocí tohoto gradientu jsou zobrazeny v Tab. 4.3 Chromatogramy standardů zaznamenané za těchto experimentálních podmínek jsou uvedeny v Příloze 1.

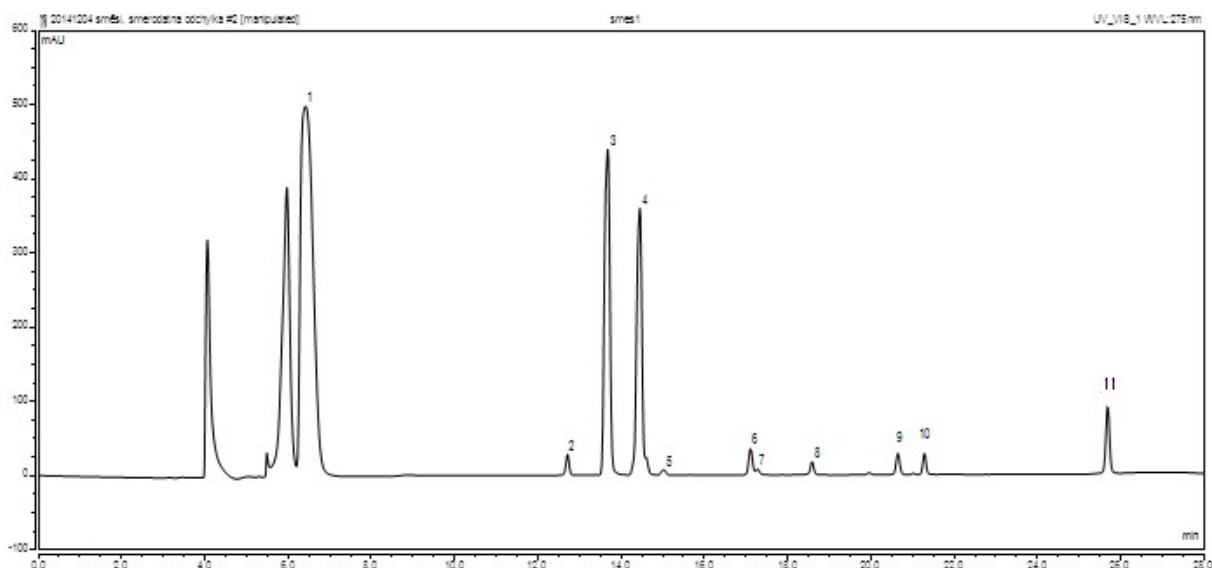
Měření směsi vybraných standardů

Za těchto experimentálních podmínek byla také změřena směs jedenácti vybraných standardů s již zjištěným retenčním časem. Bylo odpipetováno vždy 0,5 ml z odměrné baňky roztoků určených standardů a byly společně promíseny a změřeny. Na chromatogramu (Obr. 4.6) tak vznikly malé píky těchto látek, odpovídající malé koncentraci po naředění. Neočíslované první dva píky patří zřejmě kyselině mravenčí a methanolu. V Tab. 4.4 je přehled retenčních časů čistých standardů a jejich přiřazené retenční časy k těmto standardům ve směsi. Při této analýze nebyla prokázána přítomnost hesperidinu. Je možné, že došlo k jeho rozkladu ve směsi.

Tab. 4.3: Měření retenčních časů vybraných standardů polyfenolických látek

Mobilní fáze: 10-60 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,32 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 160 barr. Čas analýzy: 30 min. Detekce: 290 nm.

Standard	Koncentrace ($c \cdot 10^{-5}$ mol/l)	Retenční čas čistého standardu (min)
Ferulová kys.	1,00	15,02
Skořicová kys.	1,00	20,41
Kumarová kys.	1,00	14,28
Gallová kys.	1,00	6,35
Rutin	9,80	13,18
Morin	1,98	17,70
Vanilin	30,00	14,20
Hesperetin	1,30	21,50
Quercitrin	1,56	13,73
Chrysin	9,80	26,04
Naringin	0,86	14,40
Quercetin	2,07	18,88
4-methylumbelliferon	1,18	16,79
Resveratrol	1,00	17,32
Hesperidin	0,98	14,61



Obr. 4.6: Chromatogram směsi jedenácti standardů polyfenolických látek.

1- kyselina gallová, **2-** rutin, **3-** kyselina kumarová, **4-** naringin, **5-** kyselina ferulová, **6-** resveratrol, **7-** morin, **8-** quercetin, **9-** neidentifikovaný pík, **10-** hesperetin, **11-** chrysin.

Mobilní fáze: 10-60 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,32 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μ l. Teplota kolony: 40 $^{\circ}$ C. Teplota autosampleru: 4 $^{\circ}$ C. Tlak: 160 barr. Čas analýzy: 30 min. Detekce: 290 nm.

Dále byly zjišťovány parametry, popisující separaci směsi standardů. Konkrétně rozlišení a separační faktor sousedních píků; dále pak retenční faktor, popisující míru retence solutu v koloně. Tento parametr by se měl pohybovat mezi hodnotami 1 až 5. Jeho hodnota stoupá v čase analýzy. Ideální rozlišení by mělo mít hodnotu 1,5, kde je překrytí píků 0,1 %. U rozlišení o hodnotě 1,0 se překrytí zvýší na 2 %. Selektivitu ovlivňuje chemická povaha látek s mobilní a stacionární fází. Čím větší hodnota selektivity, tím se dají dvě látky od sebe snadněji odseparovat. Hodnoty těchto parametrů jsou zobrazeny v následujících tabulkách. Bylo zjištěno, že změřené látky měly v tomto případě rozlišení nedostačující, a jejich míra selektivity byla podobná.

Tab. 4.4: Měření retenčních časů standardů ve směsi a porovnání s retenčními časy čistých standardů

Mobilní fáze: 10-60 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,32 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 160 barr. Čas analýzy: 30 min. Detekce: 290 nm.

Standard	t_r čistého standardu (min)	t_r standardu ve směsi (min)
Ferulová kyselina	15,02	15,02
Kumarová kyselina	14,28	13,68
Gallová kyselina	6,35	6,42
Rutin	13,18	12,71
Morin	17,70	17,28
Hesperetin	21,50	21,28
Chrysin	26,04	25,69
Naringin	14,40	14,45
Quercetin	18,88	18,59
Resveratrol	17,32	17,11
Hesperidin	14,61	-

Tab. 4.5: Zjištěné rozlišení a selektivita sousedních píků.

Píky	Rozlišení	Selektivita
2. a 3.	1,26	1,11
3. a 4.	0,79	1,08
4. a 5.	0,64	1,05
6. a 7.	0,30	1,01

Tab. 4.6: Zjištěné retenční faktory u jednotlivých píků v chromatogramu.

Pík	Retenční faktor
1.	0,59
2.	2,16
3.	2,40
4.	2,59
5.	2,73
6.	3,24
7.	3,29
8.	3,61
10.	4,28
11.	5,38

Tab. 4.7: Použitý gradient pro separaci směsi méně polárních standardů

Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: 290 nm.

Čas (min)	obsah acetonitrilu (%)	obsah vody (%)	obsah kyseliny mravenčí (%)
0	35,0	64,9	0,1
20	65,0	34,9	0,1
26	65,0	34,9	0,1
28	90,0	9,9	0,1
33	90,0	9,9	0,1
35	35,0	64,9	0,1
38	35,0	64,9	0,1

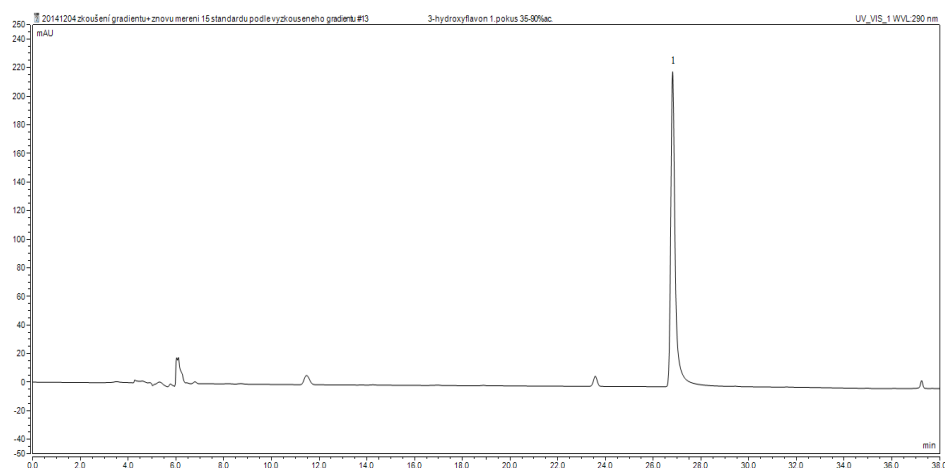
Úprava separačních podmínek pro separaci i méně polárních standardů

V další části práce se dále optimalizovaly separační podmínky i pro analýzu méně polárních látek. Bylo nutné zvýšit podíl acetonitrilu v mobilní fázi, změnit průběh gradientu a obecně prodloužit dobu analýzy. Výsledné složení mobilní fáze znázorňuje tabulka č. 4.7. Ukázka výsledného chromatogramu pro eluci méně polární látky (3-hydroxyflavonu) je na Obr. 4.7. Dále byla upravena průtoková rychlost mobilní fáze, která se snížila na 0,25 ml/min. Volbou

nového složení mobilní fáze a změnou gradientu se tlak na koloně zvýšil na 240 barrů. Kolona byla stále termostatována na 40 °C, autosampler měl teplotu 4 °C. Objem vstříkovaného analytu byl 20 µl. Analýza nyní trvala 38 minut.

Po této změně separačních podmínek byly zjištěny retenční časy dalších vybraných méně polárních standardů polyfenolických látek: flavonu, 3-hydroxyflavonu a baicalinu. Za stejných podmínek byly separovány i předchozí polárnější standardy. V jejich případě bylo ověřeno, že při změně separačních podmínek eluují dříve, rozlišení jednotlivých píků se příliš nezhoršilo. Ukázka dvou chromatogramů standardů 3-hydroxyflavonu a chrysinu jsou na obrázcích č. 4.7 a 4.8.

Pro další měření bylo vybráno z celkového množství jen 15 standardů. Do tohoto souboru standardů byly vybrány pouze ty standardy, které se ionizovaly v MS detektoru. Viz další kapitola.

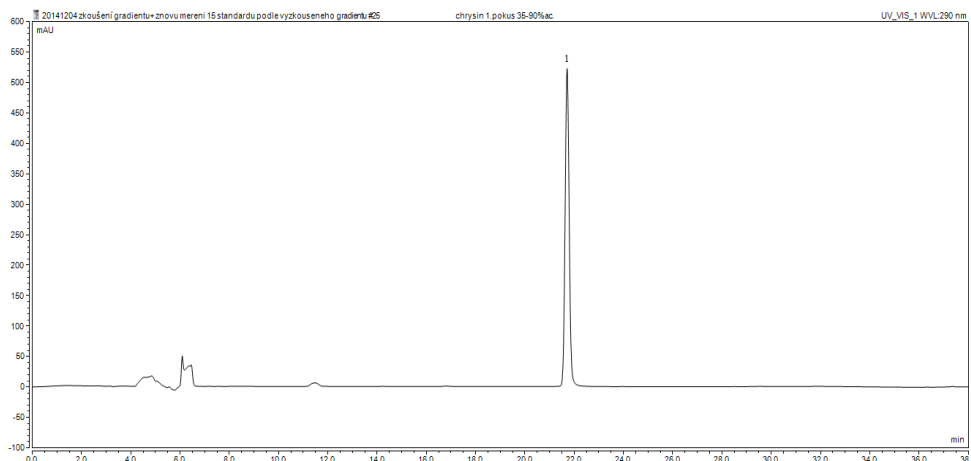


Obr. 4.7: Chromatogram 3-hydroxyflavonu (pík č. 1) s retenčním časem 26,81 minut.

Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: 290 nm.

Tab. 4.8: Retenční časy 15 standardů polyfenolických látek po změně separačních podmínek
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: 290 nm.

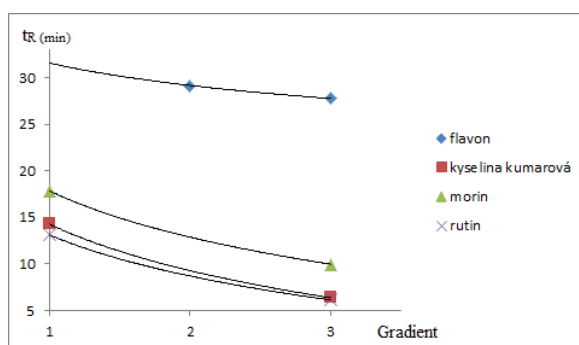
Standard	Koncentrace ($c \cdot 10^{-5}$ mol/l)	Retenční čas čistého standardu (min)
Naringin	0,86	6,29
Flavon	1,34	27,74
Kyselina ferulová	0,52	7,27
Dihydromyricetin	2,18	6,41
Hesperidin	0,98	5,09
Kyselina gallová	1,18	4,65
Resveratrol	1,00	9,61
3- hydroxyflavon	1,25	26,81
Quercetin (dihydrát)	2,07	9,49
Chrysin	9,80	21,70
Kyselina p-kumarová	2,43	7,50
Morin	1,98	9,98
Rutin	9,80	6,14
Baicalin	1,30	8,90
Hesperetin	1,30	15,07



Obr. 4.8: Chromatogram chrysinu (pík č. 1) s retenčním časem 21,70 minut.

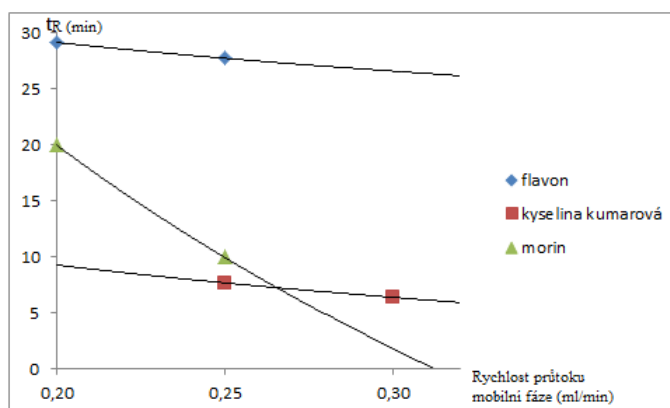
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μ l. Teplota kolony: 40 $^{\circ}$ C. Teplota autosampleru: 4 $^{\circ}$ C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: 290 nm.

Byly zjištěny závislosti změny retenčních časů látek, vůči změně gradientu a rychlosti průtoku mobilní fáze. Tyto závislosti jsou ukázány na obrázcích č. 4.9 a 4.10. Jak je vidět z těchto závislostí, retenční čas látek se snižoval se zvyšujícím se podílem acetonitrilu v mobilní fázi. Stejně jako se snižoval se zvyšující se rychlostí průtoku mobilní fáze.



Obr. 4.9: Závislost retenčních časů polyfenolických látek na rozdílném gradientu.

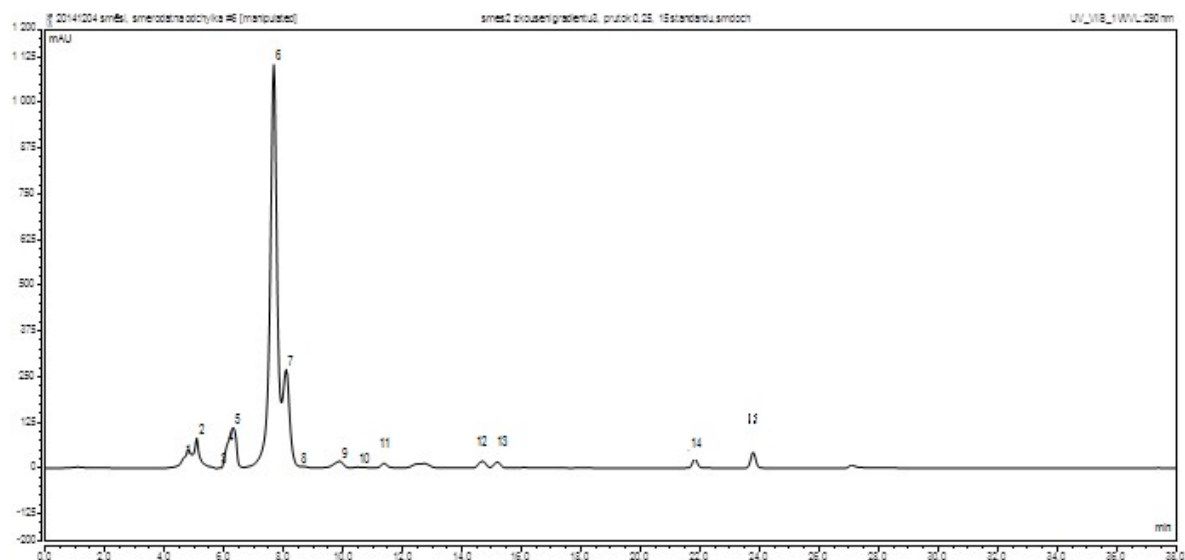
1. gradient: 10-60 % acetonitrilu, 0,1 % kyseliny mravenčí, voda
2. gradient: 30-65 % acetonitrilu, 0,1 % kyseliny mravenčí, voda
3. gradient: 35-90 % acetonitrilu, 0,1 % kyseliny mravenčí, voda



Obr. 4.10: Závislost retenčních časů polyfenolických látek na rychlosti průtoku mobilní fáze.

Separace směsi standardů polyfenolických látek po změně separačních podmínek

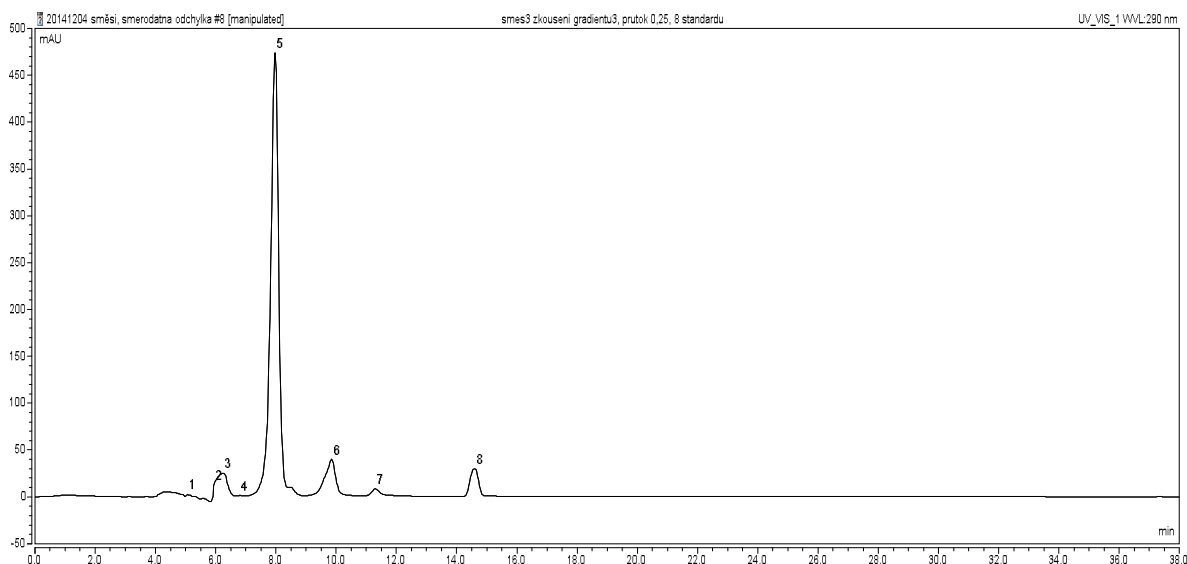
Výsledný chromatogram je uveden na obrázku č. 4.11. Chromatogram s těmito patnácti standardy byl poněkud nepřehledný a nedaly se tak snadno určit retenční časy některých látek. Proto byla ještě připravena další směs o osmi standardech, jejichž píky nebyly v předchozím chromatogramu jasně patrné. Jedná se o chromatogram na Obr. 4.12.



Obr. 4.11: Chromatogram směsi patnácti standardů polyfenolických látek

1 - kyselina gallová, **2** - rutin, **3** - hesperidin, **4** - dihydromyricetin, **5** - naringin, **6** - kyselina *p*-kumarová, **7** - kyselina ferulová, **8** - baicalin, **9** - morin, **10** - quercetin, **11** - neidentifikovaný pík, **12** - hesperetin, **13** - chrysin, **14** - 3-hydroxyflavon, **15** - flavon.

Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: 290 nm.



Obr. 4.12: Chromatogram směsi osmi standardů polyfenolických látek

1 - hesperidin, **2** - rutin, **3** - naringin, **4** - dihydromyricetin, **5** - kyselina ferulová, **6** - morin, **7** – quercetin, **8** – neidentifikovaný pík

Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: 290 nm.

Podobně jako v předchozím případě byly zjišťovány vybrané separační parametry. Získané hodnoty jsou zobrazeny v tabulkách č. 4.9, 4.10, 4.11 a 4.12. Podle těchto hodnot bylo zjištěno, že rozlišení neodpovídá ideálnímu rozlišení 1,5 a píky se často překrývají. Změna složení mobilní fáze může být příčina snižující se selektivity sousedních píků.

Tab. 4.9: Zjištěné hodnoty rozlišení a selektivity sousedních píků (směs 15 standardů).

Píky	Rozlišení	Selektivita
1. a 2.	0,79	1,98
2. a 3.	0,93	1,85
5. a 6.	1,75	1,63
6. a 7.	0,54	1,12
9. a 10.	0,29	1,10
12. a 13.	1,62	1,11

Tab. 4.10: Zjištěné hodnoty retenčního faktoru jednotlivých látek (směs 15 standardů).

Pík	Retenční faktor
1.	0,11
2.	0,22
3.	0,41
4.	0,46
5.	0,51
6.	0,83
7.	0,93
8.	1,04
9.	1,37
10.	1,51
12.	2,63
13.	4,22
14.	4,69
15.	5,48

Pomocí měření těchto dvou směsí byly zjištěny retenční časy standardů ve směsi a srovnány s retenčními časy čistých standardů. Přehled těchto naměřených hodnot je v Tab. 4.13. Pomocí této metody nebyl zjištěn retenční čas resveratrolu, což se neshoduje s identifikací standardů v této směsi naměřené HPLC–MS/MS, která přítomnost resveratrolu ve směsi potvrdila. (viz tabulka 4.16.). V tabulkách jsou uvedeny hodnoty separačních parametrů.

Tab. 4.11: Zjištěné hodnoty rozlišení a selektivity sousedních píků (směs 8 standardů).

Píky	Rozlišení	Selektivita
2. a 3.	0,41	1,16
3. a 4.	0,78	1,27
4. a 5.	1,25	1,42
5. a 6.	2,01	1,48
6. a 7.	0,79	1,25

Tab. 4.12: Zjištěné hodnoty retenčního faktoru jednotlivých látek (směs 8 standardů).

Pík	Retenční faktor
1.	0,24
2.	0,46
3.	0,53
4.	0,67
5.	0,95
6.	1,41
7.	1,76
8.	2,58

Tab. 4.13: Měření retenčních časů standardů ve směsi a porovnání s retenčními časy čistých standardů.

Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: 290 nm.

Standard	t _r čistého standardu (min)	t _r standardu ve směsi (min)
Naringin	6,29	6,32
Flavon	27,74	27,09
Kyselina ferulová	7,27	8,09
Dihydromyricetin	6,41	6,30
Hesperidin	5,09	5,09
Kyselina gallová	4,65	4,63
Resveratrol	9,61	-
3-hydroxyflavon	26,81	23,76
Quercetin (dihydrát)	9,49	10,49
Chrysin	21,70	21,82
Kyselina <i>p</i> -kumarová	7,50	7,68
Morin	9,98	9,89
Rutin	6,14	5,87
Baicalin	8,90	8,56
Hesperetin	15,07	15,19

4.4 Měření MS spekter jednotlivých standardů polyfenolických látek; identifikace jednotlivých standardů ve směsi

Pro úplnou identifikaci vybraných polyfenolických látek se využilo spojení metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrickou s detekcí s trojitým kvadrupólem. Nejdříve byla získávána hmotnostní ionizační a fragmentační spektra vybraných standardů. Byly využity různé druhy skenů, které postupně propouští ionty o definované m/z . V první fázi ale bylo nutné zjistit, které ze standardů polyfenolických látek se ionizují a tedy, které z těchto standardů budou vůbec detekovatelné.

4.4.1 Optimalizace MS spektrometru a zjištění ionizovatelnosti jednotlivých standardů

Nejdříve byly optimalizovány podmínky pro detekci standardů polyfenolických látek pomocí MS. Analyzovaná látka byla nejdříve unášena mobilní fází (50 % acetonitrilu a 50 % vody) přímo k hmotnostnímu detektoru, kde byla pomocí elektrospreje zplynována mobilní fáze a došlo k vytvoření molekulárních iontů analytu. K měření ionizačního hmotnostního spektra posloužil SIM (Selected Ion Monitoring) sken, kde systém pracuje jen v režimu jednoduchého kvadrupólu a propouští tak na detektor pouze ionty, jejich m/z byla zvolena (viz. Teoretická část). Poměr m/z , který byl definován, odpovídal relativní molekulové hmotnosti vybraných standardů. Rozsah těchto hmot se tedy určil od 100 do 700 m/z . Napětí na iontové kapiláře bylo 135 V, objem vstříkované látky byl 1 μl a čas měření byl 50 sec. Složení mobilní fáze v tomto případě nebylo rozhodující, proto nebyla přidávána ani kyselina mravenčí. Ta by naopak mohla zapříčiňovat snížení intenzity píků v hmotnostním spektru.

V Tab. 4.14 jsou popsány analyty, které byly ionizovány a molekulární ionty, vzniklé buď v pozitivním $[M+H]^+$, nebo v negativním $[M-H]^-$ módu; některé v obou módech. Jiné se neionizovaly vůbec, jako např. kyselina skořicová nebo vanilin.

Tab. 4.14: Přehled standardů, které se pomocí hmotnostního detektoru ionizovaly v pozitivním nebo negativním módu, nebo se neionizovaly vůbec

Mobilní fáze: 50% acetonitril, 50% voda, napětí na iontové kapiláře: 135 V, objem vstříkované látky: 1 µl, čas: 50 sec. Typ skenu: SIM.

Standard	Rel. mol. hmotnost	Koncentrace ($c \cdot 10^{-5}$ mol/l)	Ionizace analytu	
			Pozitivní mód [M+H] ⁺	Negativní mód [M-H] ⁻
Ferulová kyselina	194,18	1,00	195	193
Skořicová kyselina	148,16	1,00	-	-
Kumarová kyselina	164,16	1,00	165	163
Gallová kyselina	170,12	1,00	171	169
Rutin	610,50	9,80	-	609
Morin	302,24	1,98	303	301
Vanilin	152,15	30,00	-	-
β-naftoflavon	272,30	5,10	273	-
L-fenylalanin	165,10	5,40	166	164
Hesperetin	302,30	1,30	303	301
Quercitrin	448,38	1,56	-	-
Chrysin	254,24	9,80	255	253
α-naftoflavon	272,31	6,90	273	-
Kurkumin	368,38	5,70	369	-
Baicalin	446,36	1,30	447	445
Naringin	580,53	0,86	581	579
3-hydroxyflavon	238,25	1,25	239	-
Quercetin	338,27	2,07	-	337
Flavon	222,24	1,34	223	-
4-methylumbelliferon	194,18	1,18	-	-
Resveratrol	228,24	1,00	229	227
Flavanon	224,26	1,34	225	-
Dihydromyricetin	320,25	2,18	321	319
Diosmin	608,58	2,62	-	-
Hesperidin	610,57	0,98	-	609

4.4.2 Optimalizace MS spektrometru a zjištění fragmentace vybraných ionizovatelných standardů

Dalším krokem této fáze práce bylo zjistit, jak se budou standardy, které se ionizovaly a poskytly tak ionizační spektrum, fragmentovat. Za tím účelem byla optimalizována metoda MS, s její pomocí byla naměřena hmotnostní spektra produktových iontů. Byla použita mobilní fáze, která se skládala z 50 % acetonitrilu, 0,1 % kyseliny mravenčí a vody. Kyselina mravenčí zde měla potlačit ionizaci analytů, ale zároveň mohla snižovat intenzitu píků. Měřilo se pomocí skenu Product Ion, kde systém pracoval v režimu trojitého kvadrupólu. První kvadrupól (Q1) slouží k přenosu určené m/z , ta je dále rozštěpena v kolizní cele (q2) a vznikají tak produktové ionty, a ve třetím kvadrupólu (Q3) jsou tyto vzniklé ionty detekovány (viz. Teoretická část). Velikost kolizní energie v kolizní cele je závislá na intenzitě píku fragmentovaného iontu. Pro každý analyt je kolizní energie jiná, jak je dále uvedeno v Tab. 4.15, kde jsou také shrnuty přechody fragmentovaných iontů. Některé látky měly více přechodů s intenzivními píky, proto jsou u některých uvedeny alespoň dva přechody. Napětí na iontové kapiláře bylo 135 V, objem vstříkované látky byl 1 μl a čas měření byl 50 sec.

4.4.3 Analýza směsi vybraných standardů polyfenolických látek

Byla změřena směs patnácti standardů polyfenolických látek metodou HPLC/MS. Mohly se tak porovnat analýzy pomocí HPLC/UV-DAD a HPLC/MS. Na obrázku 4.13 je zobrazen chromatogram těchto látek. Pomocí tohoto měření byly zjištěny retenční časy standardů ve směsi a porovnány s retenčními časy analýzy směsi těchto standardů pomocí HPLC s UV-DAD detektorem. Přehled těchto naměřených hodnot je v Tab. 4.16. Byl zde zjištěn retenční čas resveratrolu, což nekoriguje s analýzou HPLC-UV/DAD, kde se v chromatogramu této směsi neobjevil jeho pík. Naopak nebyla pomocí HPLC/MS naměřena hodnota retenčního času quercetinu. Zřejmě dochází při smíchávání standardů ve směsi k rozkladu standardu nebo odtržení funkčních skupin.

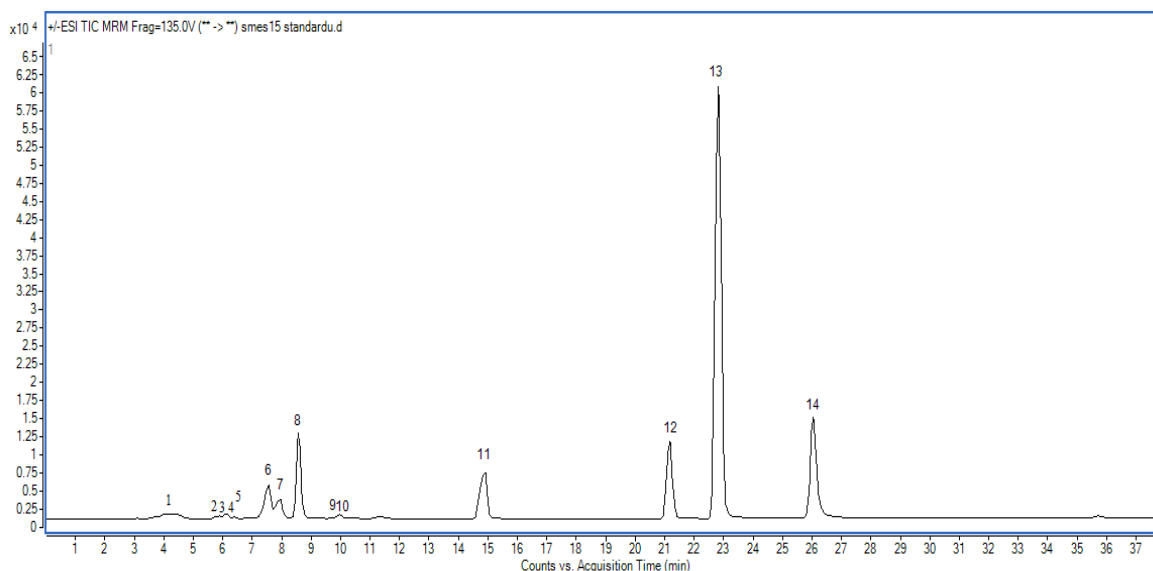
Tab. 4.15: Přehled přechodů při fragmentaci prekurzorových iontů a vzniklých produktových iontů v pozitivním a v negativním módu a jejich kolizních energií v kolizní cele
Mobilní fáze: 50% acetonitril, 0,1% kyseliny mravenčí, voda. Napětí na iontové kapiláře: 135 V, objem vstříkované látky: 1 µl, čas: 50 sec. Typ skenu: Product Ion.

Standard	Mr	Fragmentace prekurzorových iontů		Kolizní energie (V)
		Přechod v pozitivním módu [M+H] ⁺	Přechod v negativním módu [M-H] ⁻	
Ferulová kyselina	194,18	195 →177; 195→145	-	10
Kumarová kyselina	164,16	165→146,9	-	10
Gallová kyselina	170,12	171→153;171→127	169→125	10
Rutin	610,50	-	609→300	30
Morin	302,24	-	301→151; 301→125	20
β-naftoflavon	272,30	273→115; 273→127	-	40
L-fenylalanin	165,10	166→82; 166→120	-	10
Hesperetin	302,30	303→153; 303→177	301→164; 301→151	20
Chrysin	254,24	255→153	-	30
Baicalin	446,36	447→271,1	445→269	10
Naringin	580,53	581→273; 581→314	-	10
3-hydroxyflavon	238,25	239→165; 239→121	-	30
Quercetin	338,27	-	337→151	20
Flavon	222,24	223→77,1; 22→121	-	30
Resveratrol	228,24	-	227→185; 227→143	20
Flavanon	224,26	225→121; 22→131	-	20
Dihydromyricetin	320,25	321→152; 321→275	319→193	10
Hesperidin	610,57	-	609→301	20

Tab. 4.16: Porovnání retenčních časů standardů polyfenolických látek ve směsi metodami HPLC/UV-DAD a HPLC/MS

Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: 290 nm a MS.

Standard	t _r standardu ve směsi (min)	
	HPLC/UV-DAD	HPLC/MS
Naringin	6,32	6,12
Flavon	27,09	26,08
Kyselina ferulová	8,09	7,98
Dihydromyricetin	6,30	6,38
Hesperidin	5,09	6,18
Kyselina gallová	4,63	4,18
Resveratrol	-	10,08
3-hydroxyflavon	23,76	22,86
Quercetin	10,49	-
Chrysin	21,82	21,19
Kyselina p-kumarová	7,68	7,58
Morin	9,89	9,99
Rutin	5,87	5,68
Baicalin	8,56	8,53
Hesperetin	15,19	14,90



Obr. 4.13: Chromatogram směsi vybraných patnácti standardů polyfenolických látek získaný technikou HPLC/MS

1 - kyselina gallová, **2** - rutin, **3** - naringin, **4** - hesperidin, **5** - dihydromyricetin, **6** - kyselina *p*-kumarová, **7** - kyselina ferulová, **8** - baicalin, **9** - morin, **10** - resveratrol, **11** - hesperetin, **12** - chrysin, **13** - 3–hydroxyflavon, **14** - flavon.

Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS

4.5 Identifikace polyfenolických látek v rostlinných extraktech

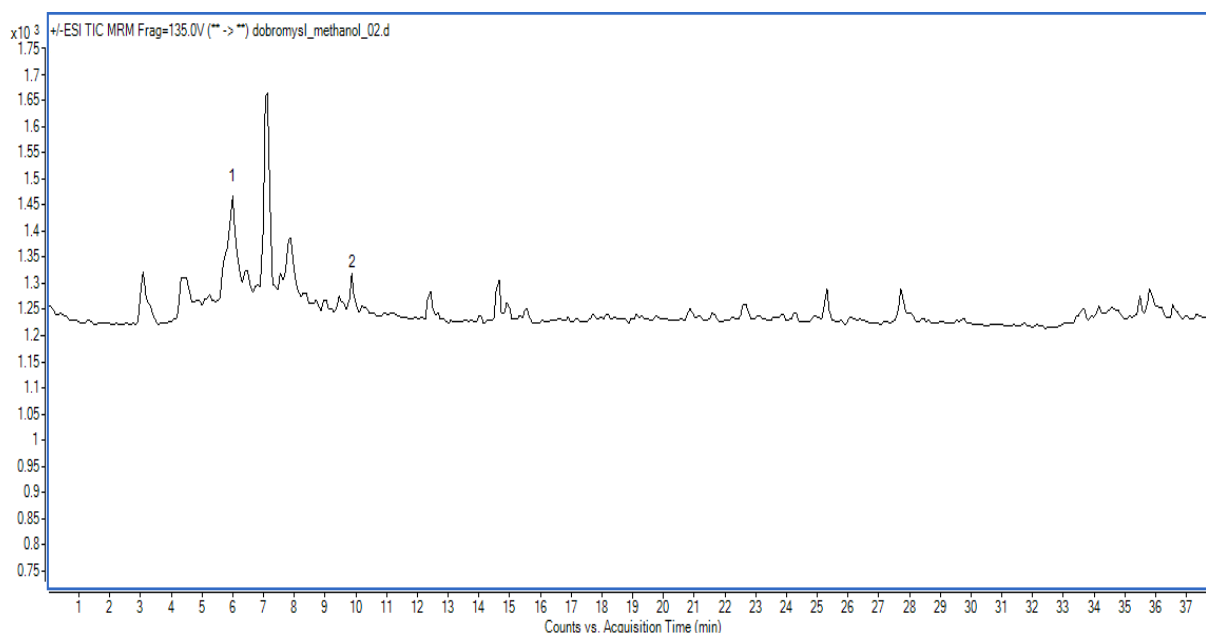
V předchozích kapitolách byly popsány optimální podmínky pro separaci a detekci vybraných polyfenolických látek a zjištěny retenční časy, absorpční a hmotnostní spektra čistých standardů. S těmito podmínkami a zjištěnými vlastnostmi se dále mohli identifikovat polyfenolické látky ve vybraných vzorcích - extraktech léčivých rostlin. Látky se analyzovaly pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií s trojitým kvadrupólem. Separace na chromatografu probíhala za stejných podmínek jako analýza čistých standardů a jejich směsí.

K hmotnostnímu spektrometru Agilent 6460 byla připojena kolona RP-Gemini 3µm C18 110A (250 x 3 mm), z chromatografu Ultimate 3000 RSLC. Byla vyhřívána na 40°C. Při separaci látek se pracovalo s gradientovou elucí. Podíl acetonitrilu se postupně zvyšoval ve směsi s deionizovanou vodou. Použitý gradient je popsán v tabulce 4.7. Průtok mobilní fáze byl 0,25 ml/min, tlak na koloně činil 240 barrů, teplota automatického dávkovače vzorků se

snížila na 4 °C a objem vstříkovaného vzorku byl 20 µl. Analýza probíhala 38 minut. Separované polyfenolické látky ve vzorcích byly detekovány pomocí hmotnostního spektrometru, který byl nastavený podle podmínek optimalizace při měření čistých standardů. K identifikaci látek v hmotnostním spektru byl použit typ skenu MRM (Multiple Reaction Monitoring), kde systém pracuje v režimu trojitého kvadrupólu. Nejprve se definuje m/z vybrané látky, kterou zkoumáme, a ta projde prvním kvadrupólem (Q1) jako prekurzorový ion. Je poté rozštěpena v kolizní cele (q2) a třetím kvadrupólem (Q3) prochází vzniklý produktový ion o definované m/z a je detekován (viz. Teoretická část). Napětí na fragmentoru (iontové kapiláře) bylo 135 V, kolizní energie v kolizní cele se nastavila pro každou definovanou hodnotu m/z látky dle tabulky. Látky ve vzorcích byly poté identifikovány podle jejich specifických přechodů při fragmentaci, a podle jejich retenčních časů.

4.5.1 Chromatogramy jednotlivých rostlinných extraktů

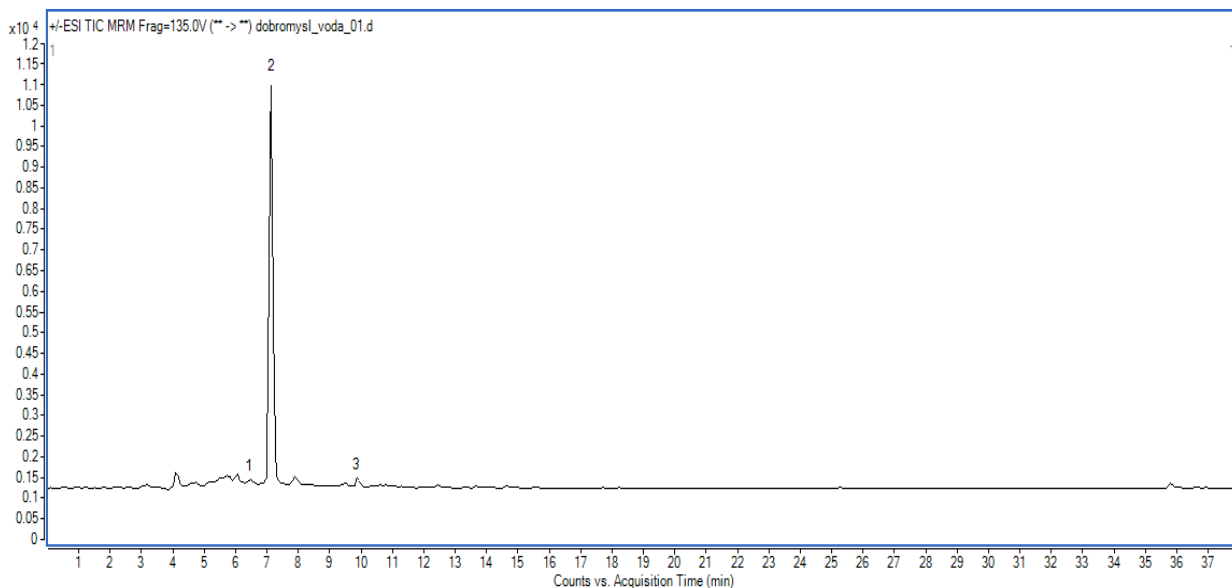
Získané chromatogramy polyfenolických látek v jednotlivých vzorcích jsou uvedeny na následujících obrázcích 4.14 až 4.25. Čísly jsou označeny identifikované píky.



Obr. 4.14: Chromatogram extraktu z dobromysli v extrakčním mediu methanolu

1 - dihydromyricetin, **2** - morin.

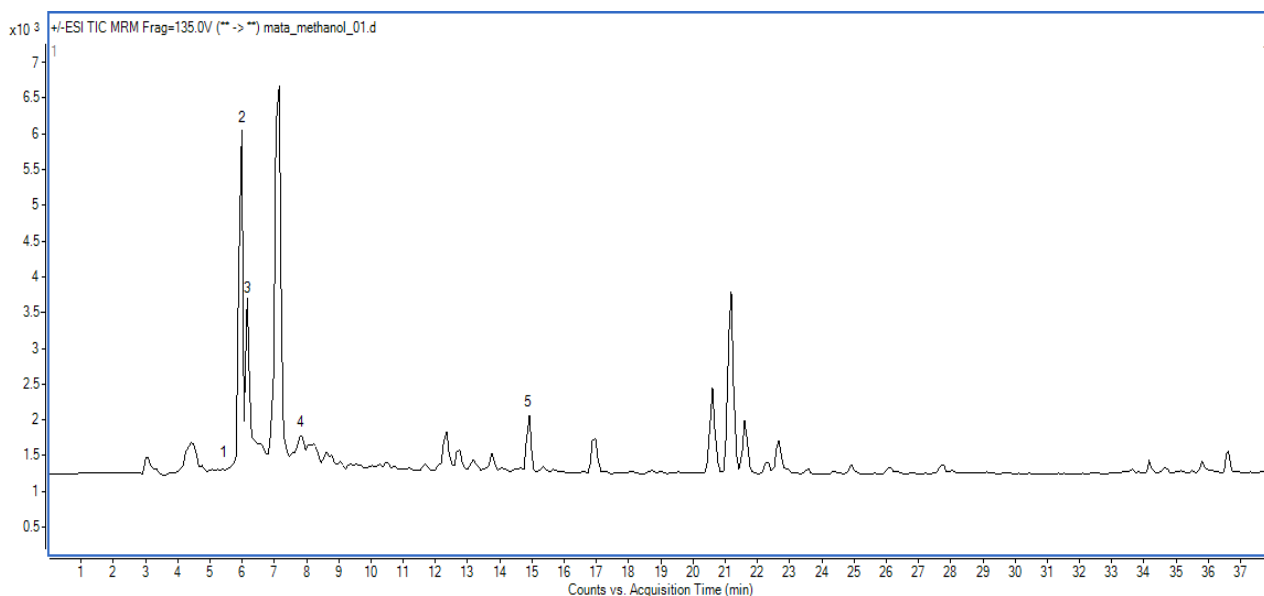
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.



Obr. 4.15: Chromatogram extraktu z dobromysli v extrakčním mediu vodě

1 - dihydromyricetin, **2** – kyselina ferulová, **3** – morin

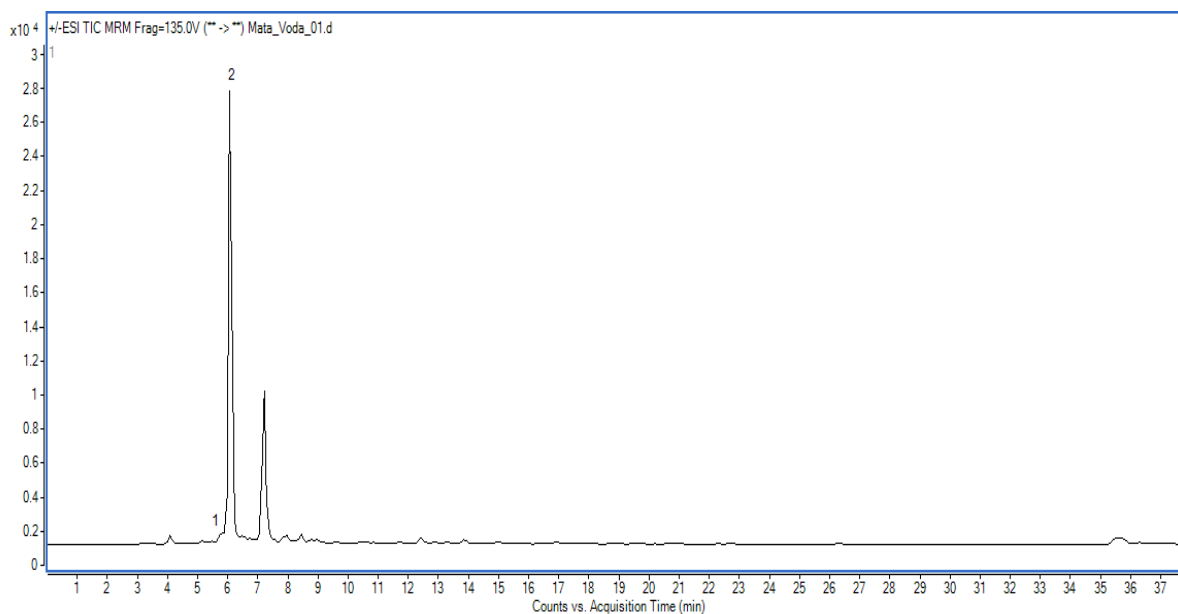
Mobilní fáze: 35-90% acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40°C. Teplota autosampleru: 4°C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS



Obr. 4.16: Chromatogram extraktu z máty peprné v extrakčním mediu methanolu

1 - naringin, **2** - rutin, **3** - hesperidin, **4** - kyselina ferulová, **5** - hesperetin

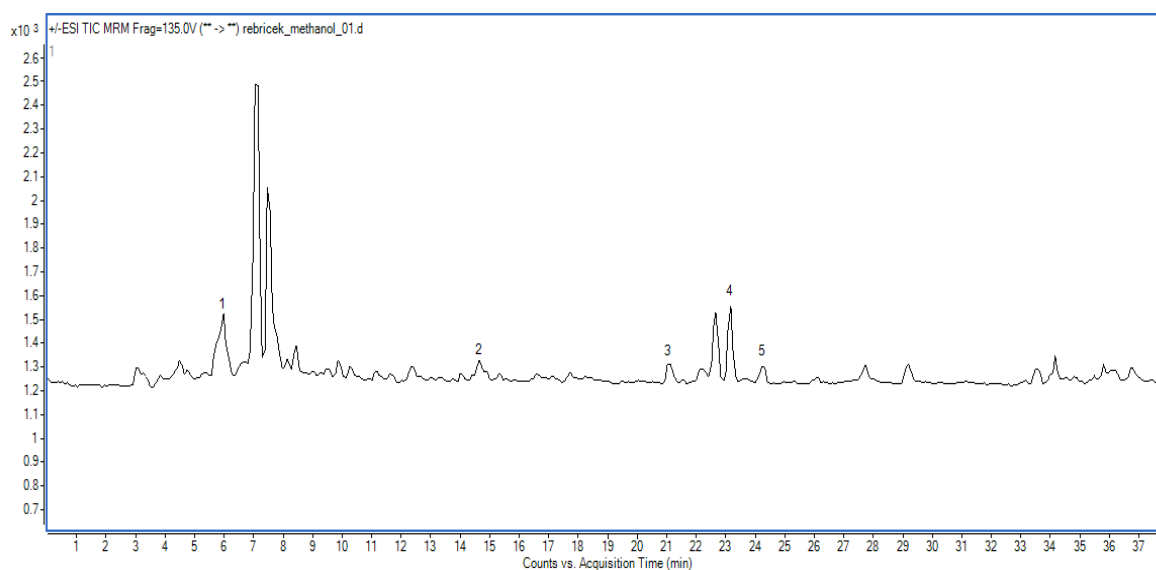
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.



Obr. 4.17: Chromatogram extraktu z máty peprné v extrakčním mediu vodě

1 - naringin, **2** – hesperidin

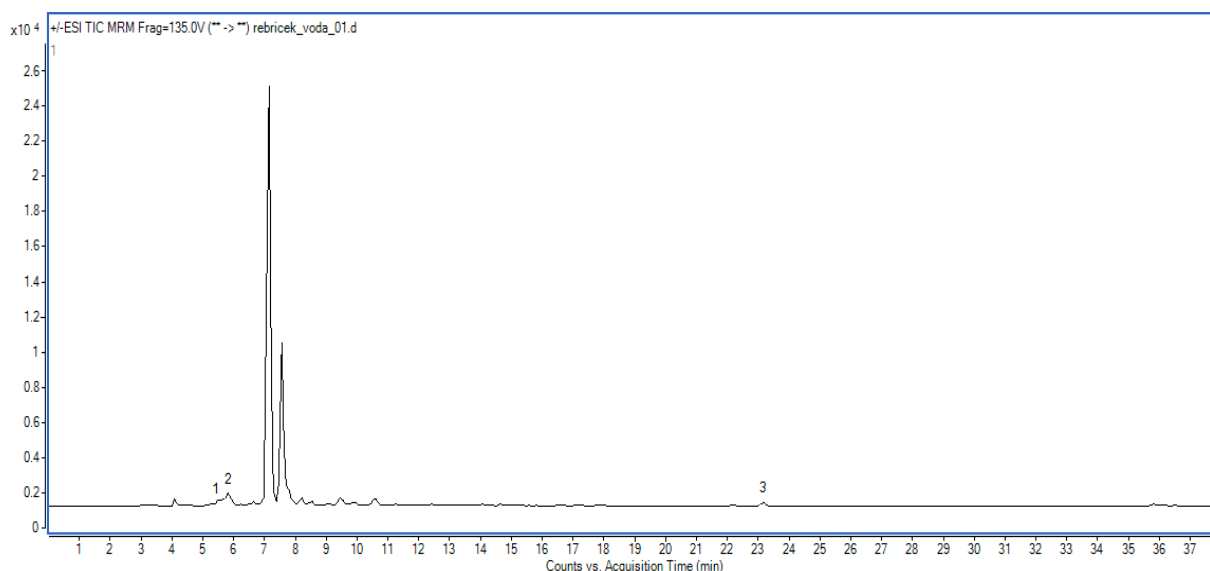
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.



Obr. 4.18: Chromatogram extraktu z řebříčku v extrakčním mediu methanolu

1 - rutin, **2** - hesperetin, **3** - chrysin, **4** - 3-hydroxyflavon, **5** - flavon.

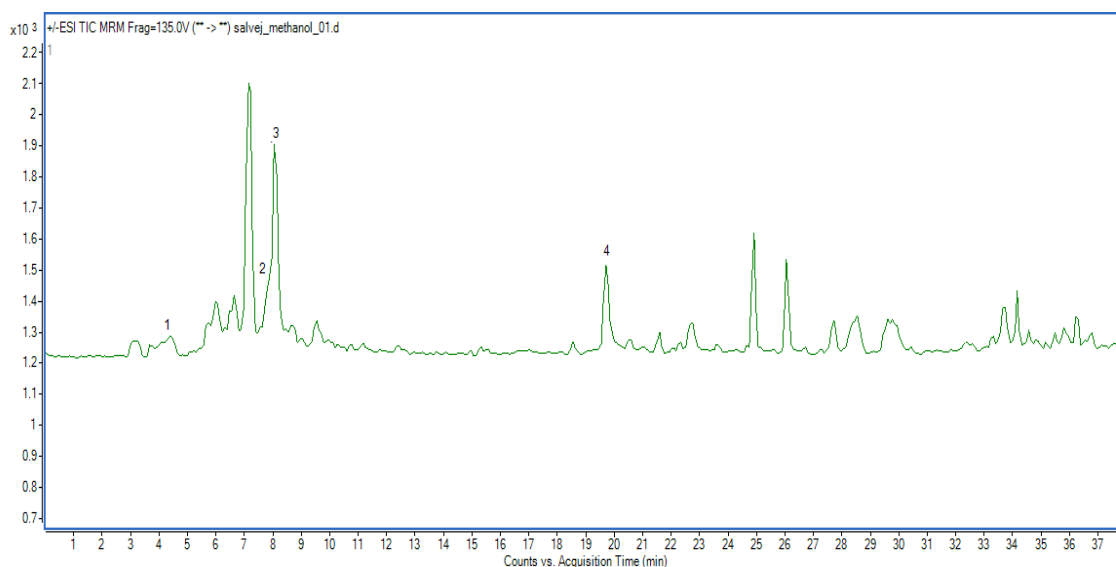
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 µl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.



Obr. 4.19: Chromatogram extraktu z řebříčku v extrakčním mediu vodě

1 - hesperidin, **2** - kyselina ferulová, **3** - 3-hydroxyflavon

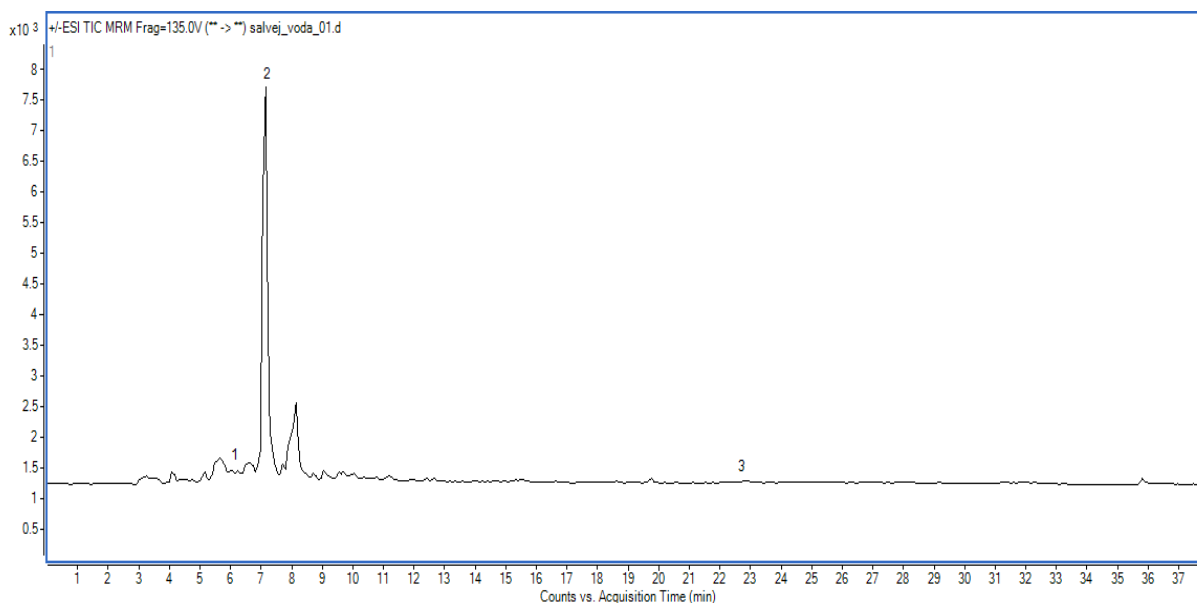
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μ l. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.



Obr. 4.20: Chromatogram extraktu z šalvěže v extrakčním mediu methanolu

1 - kyselina gallová, **2** - kyselina kumarová, **3** - kyselina ferulová, **4** - flavon.

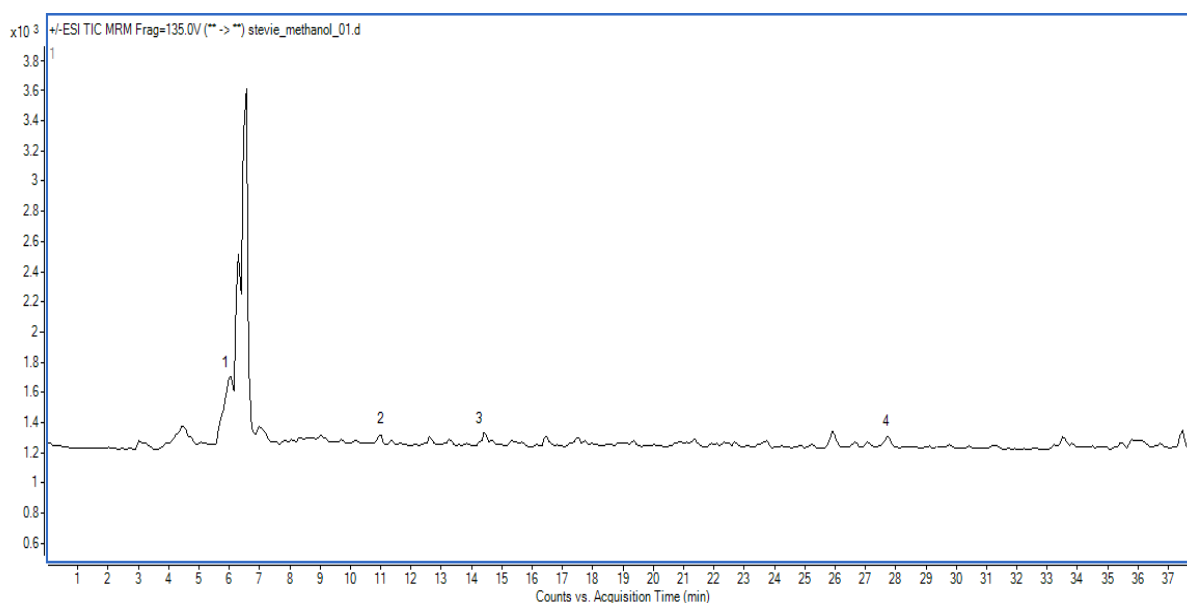
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μ l. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.



Obr. 4.21: Chromatogram extraktu z šalvěže v extrakčním mediu vodě

1 - naringin, **2** - kyselina ferulová, **3** - flavon

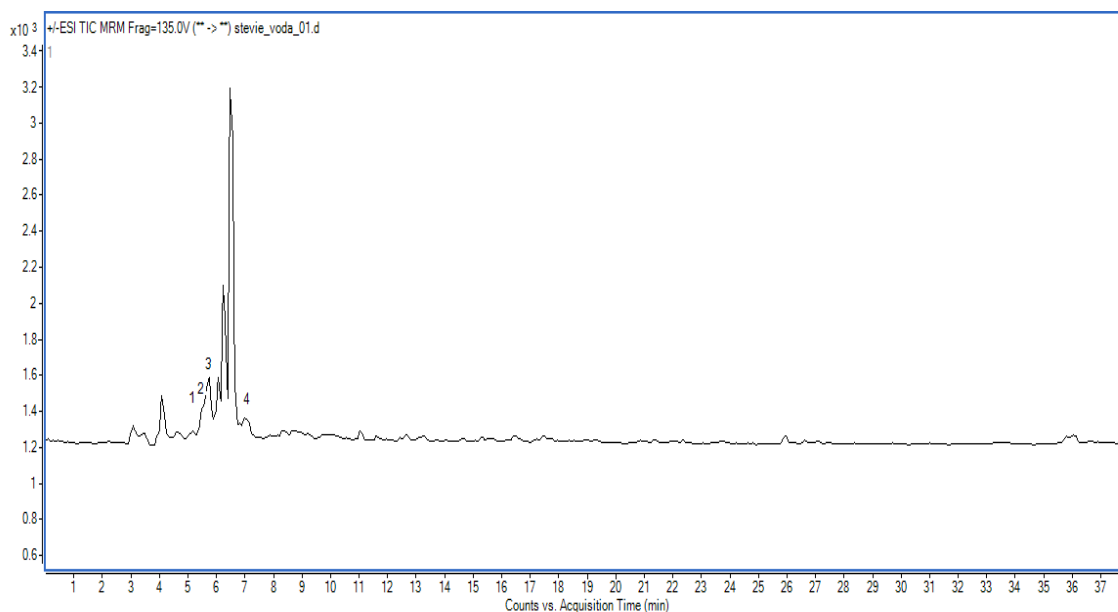
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.



Obr. 4.22: Chromatogram extraktu z stévie v extrakčním mediu methanolu

1 - hesperidin, **2** - morin, **3** - hesperetin, **4** - flavon

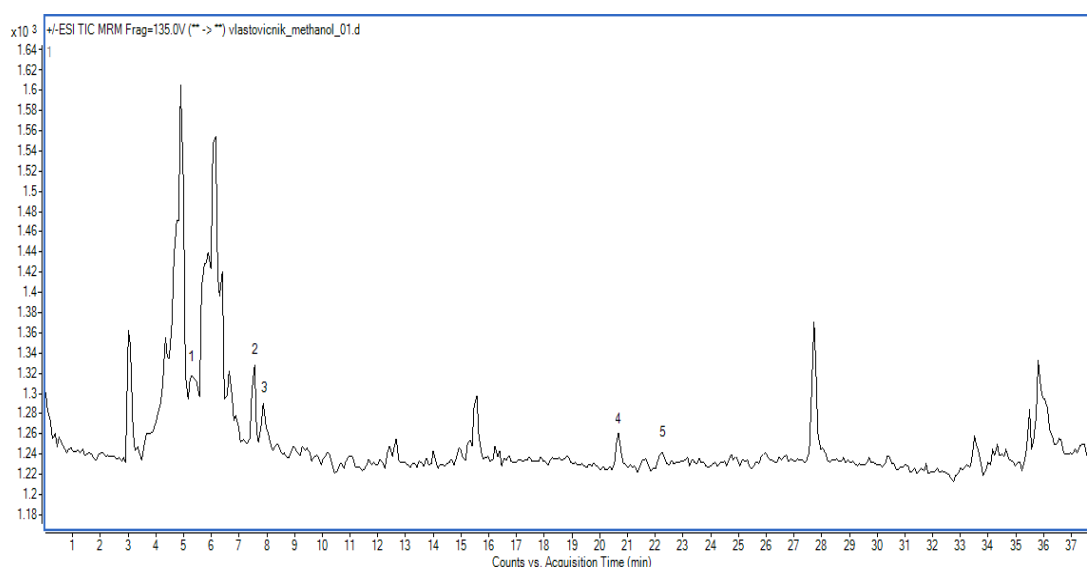
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.



Obr. 4.23: Chromatogram extraktu z stévie v extrakčním mediu vodě

1 – hesperidin, 2 – rutin, 3 – kyselina ferulová, 4 – kyselina kumarová

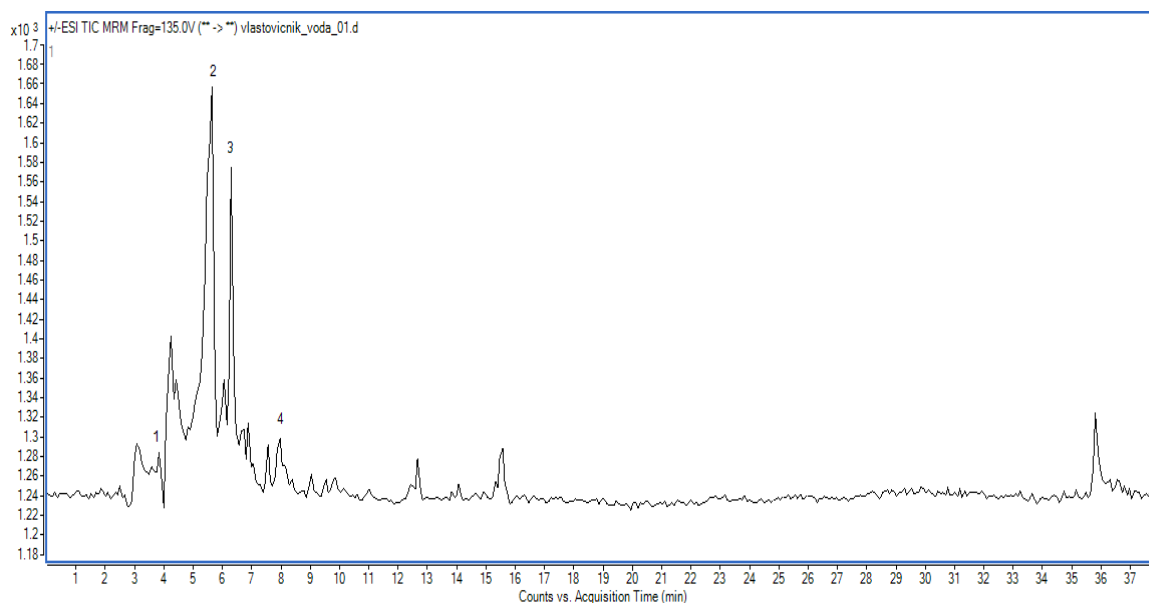
Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.



Obr. 4.24: Chromatogram extraktu z vlaštovičnicku v extrakčním mediu methanol

1 - kyselina gallová, 2 - kyselina kumarová, 3 - kyselina ferulová, 4 - flavon, 5 - 3-hydroxyflavon

Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.



Obr. 4.25: Chromatogram extraktu z vlaštovičnicku v extrakčním mediu vodě

1 - kyselina gallová, **2** - rutin, **3** - kyselina kumarová, **4** - kyselina ferulová

Mobilní fáze: 35-90 % acetonitrilu; 0,1 % kyseliny mravenčí; voda. Průtok mob. fáze: 0,25 ml/min. Objem nástřiku vzorku: 20 μl. Teplota kolony: 40 °C. Teplota autosampleru: 4 °C. Tlak: 240 barr. Čas analýzy: 38 min. Detekce: MS/MS.

4.5.2 Polyfenolické látky nalezené v jednotlivých rostlinných extraktech

Přehled nalezených látek ve vzorcích rostlinných extraktů je uveden v následujících tabulkách 4.17 až 4.28.

Tab. 4.17: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu z dobromysli v extrakčním mediu methanolu

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci v pozitivním módu	t_r látky ve vzorku (min)	t_r čisté látky (min)
Dihydromyricetin	320,25	321→152	6,42	6,40
Morin	302,24	301→151	9,85	9,98

Tab. 4.18: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu z dobromysli v extrakčním mediu vodě

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci		t_r látky ve vzorku (min)	t_r čisté látky (min)
		v pozitivním módu	v negativním módu		
Dihydromyricetin	320,25	321→152	-	6,42	6,40
Morin	302,24	301→151	-	9,85	9,98
Ferulová kyselina	194,18	195→177	-	7,07	7,27

Tab. 4.19: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu z máty v extrakčním mediu methanolu

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci		t_r látky ve vzorku (min)	t_r čisté látky (min)
		v pozitivním módu	v negativním módu		
-	-	-	-	-	-
Naringin	580,53	581→273	-	5,87	6,32
Hesperetin	302,3	303→153	-	14,87	15,07
Ferulová kys.	194,18	195 →177	-	7,07	7,27
Hesperidin	610,57	-	609→301	6,18	5,09
Rutin	610,5	-	609→300	6,01	6,3

Tab. 4.20: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu z máty v extrakčním mediu vodě

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci		t _r látky ve vzorku (min)	t _r čisté látky (min)
		v pozitivním módu	v negativním módu		
-	-				
Naringin	580,53	581→273	-	5,79	6,32
Hesperidin	610,57	-	609→301	6,10	5,09

Tab. 4.21: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu z řebříčku v extrakčním mediu methanolu

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci		t _r látky ve vzorku (min)	t _r čisté látky (min)
		v pozitivním módu	v negativním módu		
-	-			-	-
Hesperetin	302,30	303→153	-	14,50	15,07
Chrysin	254,24	255→153	-	21,19	21,70
3-hydroxyflavon	238,25	239→121	-	23,18	26,81
Flavon	222,24	223→77	-	24,35	27,74
Rutin	610,50	-	609→300	6,01	6,30

Tab. 4.22: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu z řebříčku v extrakčním mediu vodě

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci		t _r látky ve vzorku (min)	t _r čisté látky (min)
		v pozitivním módu	v negativním módu		
-	-			-	-
3-hydroxyflavon	238,25	239→121	-	23,18	26,81
Ferulová kys.	194,18	195→145	-	5,83	7,27
Hesperidin	610,57	-	609→301	5,52	5,09

Tab. 4.23: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu z šalvěže v extrakčním mediu methanolu

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci		t _r látky ve vzorku (min)	t _r čisté látky (min)
		v pozitivním módu	v negativním módu		
-	-			-	-
Flavon	222,24	223→77	-	19,72	22,86
Ferulová kys.	194,18	195→145	-	8,06	7,27
Gallová kys.	170,12	-	171→127	4,23	4,65
Kumarová kys.	164,16	165→146	-	7,83	7,50

Tab. 4.24: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu z šalvěže v extrakčním mediu vodě

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci		t _r látky ve vzorku (min)	t _r čisté látky (min)
		v pozitivním módu			
Flavon	222,24	223→77		19,79	22,86
Ferulová kyselina	194,18	195→145		8,15	7,27
Naringin	580,53	581→273		6,12	6,29

Tab. 4.25: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu ze stévie v extrakčním mediu methanol

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci		t _r látky ve vzorku (min)	t _r čisté látky (min)
		v pozitivním módu	v negativním módu		
-	-				
Flavon	222,24	223→77	-	27,75	27,74
Hesperetin	302,30	303→177	-	14,07	15,07
Hesperidin	610,57	-	609→301	5,93	5,09
Morin	302,24	-	301→151	11,40	9,98

Tab. 4.26: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu ze stévie v extrakčním mediu vodě

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci		t _r látky ve vzorku (min)	t _r čisté látky (min)
		v pozitivním módu	v negativním módu		
-	-			-	-
Ferulová kys.	194,18	195 →177	-	5,83	7,27
Kumarová kys.	164,16	165→146	-	7,00	7,50
Hesperidin	610,57	-	609→301	5,51	5,09
Rutin	610,50	-	609→300	5,68	6,30

Tab. 4.27: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu z vlašovičnicku v extrakčním mediu methanol

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci v pozitivním módu	t _r látky ve vzorku (min)	t _r čisté látky (min)
3-hydroxyflavon	238,25	239→165	22,27	26,81
Ferulová kyselina	194,18	195 →177	7,89	7,27
Kumarová kyselina	164,16	165→146	7,58	7,50
Gallová kyselina	170,12	171→153	5,26	4,65
Flavon	222,24	223→77	20,71	27,74

Tab. 4.28: Přehled nalezených polyfenolických látek, a jejich retenčních časů v uvedených přechodech při fragmentaci, v extraktu z vlašovičnicku v extrakčním mediu vodě

Experimentální podmínky jsou uvedeny u příslušného chromatogramu

Nalezená látka	Mr	Přechod při fragmentaci		t _r látky ve vzorku (min)	t _r čisté látky (min)
		v pozitivním módu	v negativním módu		
-	-			-	-
Ferulová kyselina	194,18	195 →177	-	7,98	7,27
Kumarová kyselina	164,16	165→146	-	6,34	7,50
Gallová kyselina	170,12	171→153	-	3,94	4,65
Rutin	610,50	-	609→300	5,68	6,30

5 Závěr

Polyfenolické látky jsou znamenitou součástí potravin. Podílejí se na celkové antioxidační aktivitě a zabraňují tak tvorbě nebo rozšíření volných kyslíkových radikálů, které mohou poškodit organismus. Přispívají též k léčbě nemocí, od kardiovaskulárních přes neurodegenerativní choroby, nebo působí preventivně proti rakovině. Proto se také tyto látky staly předmětem předkládané diplomové práce. Cílem diplomové práce bylo vypracovat metodu pro identifikaci těchto látek v extraktech léčivých rostlin. V této práci byly polyfenolické látky identifikovány pomocí metody HPLC-MS/MS s trojitým kvadrupólem.

Prvním krokem byla optimalizace metody HPLC, pomocí níž se vybrané látky separovaly. Pro velkou rozmanitost poskytnutých standardů bylo nutné metodu optimalizovat tak, aby bylo možné najednou separovat látky více i méně polární. Pracovalo se s gradientovou elucí, v nichž se v průběhu 38 minutové analýzy zvyšoval podíl organické fáze acetonitrilu z 10 % na 90 %. Další součástí mobilní fáze byla 0,1 % kyselina mravenčí pro potlačení disociace fenolických látek a zbytek tvořila deionizovaná voda. Z celkového počtu 26 dostupných standardů bylo nakonec vybráno 15 těchto standardů. Tyto standardy byly zvoleny na základě kritéria ionizovatelnosti těchto derivátů. Při použití dělicí kolony s navázanou C18 fází bylo pořadí eluujících standardů od více polárních k méně polárním. Byly to hlavně látky, které obsahovaly přímo na svém benzenovém jádře hydroxylové skupiny jako např. fenolické kyseliny, dále aglykony s navázaným cukrem, který zajišťuje vyšší polaritu látky (flavanonové glykosidy), dále následovaly flavonoly bez připojené cukerné jednotky, a nejpozději se eluovaly flavony. Pro detekci byla v první fázi použita UV spektrometrie, později pak tandemová hmotnostní spektrometrie. Při předběžných experimentech byly jednak proměřeny časové stability připravených zásobních roztoků jednotlivých derivátů a dále byly proměřeny UV spektra jednotlivých derivátů, která pak pomohla při identifikaci ve směsích standardů. Bylo zjištěno, že pro polyfenolické sloučeniny jsou typické dvě absorpční maxima, které se projevují díky substituovaným A a C kruhům. Látky s jedním benzenovým jádrem mají v UV spektru jen jedno absorpční maximum, např. fenolické kyseliny. Dále byly zaznamenány hmotnostní spektra čistých standardů. Hmotnostní spektra se měřila v různých skenech v negativních i pozitivních módech, tak aby se dosáhlo nejlepší identifikace této skupiny látek. Nejdříve byla zjišťována ionizace vybraných standardů. Poté jejich fragmentace v obou módech, kde byly jejich fragmentační přechody zaznamenávány, a poté díky nim a zjištěným retenčním časům, mohly být identifikovány látky v hmotnostních spektrech extraktů. Každá látka měla svůj specifický přechod při určité kolizní energii.

V každém dodaném vzorku - rostlinném extraktu se podařilo identifikovat minimálně dvě polyfenolické látky. Extrakty byly extrahovány ze šesti rostlin, kde každý z nich byl extrahován ve dvou extrakčních médiích - vodě a methanolu. Bylo zjištěno, že ve vodných extraktech byly identifikovány především látky polárnější nebo lépe rozpustitelné ve vodě (např. fenolické kyseliny, aglykony s připojenými cukry, diglykosidy apod.). Na záznamech chromatogramů extraktů v methanolu je o poznání více píků, proto se tedy mohlo identifikovat vždy více látek, jako jsou např. flavony, které jsou méně polární. Bylo také zjištěno, že ve vodném médiu se identifikované látky nemusely vždy shodovat s látkami identifikovanými v methanolvém médiu, díky jejich polaritě a rozpustnosti, a naopak.

Dobromysl obecná v methanolu obsahovala dihydromyricetin a morin, ve vodě navíc kyselinu ferulovou. Máta peprná v methanolu obsahovala naringin, hesperetin, hesperidin, kyselinu ferulovou a rutin, ve vodě jen naringin a hesperidin. V řebříčku obecném v methanolu byly identifikovány hesperetin, chrysin, rutin, 3-hydroxyflavon a flavon. Ve vodném médiu řebříčku se identifikovaly jen kyselina ferulová, hesperidin a 3-hydroxyflavon. U šalvěže lékařské v methanolu byly nalezeny kyseliny gallová, kumarová, ferulová s flavonem. U šalvěže ve vodě byly nalezeny jen ferulová kyselina s flavonem a naringinem. Dále byly identifikovány látky ve stévii sladké v methanolu – morin, hesperidin, hesperetin a flavon, ve stévii ve vodě se identifikovaly kyseliny ferulová a kumarová, dále hesperidin a rutin. Poslední extrakt v methanolu z vlašovičnicku většího obsahoval kyseliny kumarovou, ferulovou a gallovou, dále pak 3-hydroxyflavon a flavon. Ve stejném extraktu, ve vodě, byly nalezeny stejné kyseliny (gallová, kumarová, ferulová) s rutinem.

6 Použitá literatura

1. Havlík, J.; Marounek M.: *Živiny a živinové potřeby člověka*. Praha, Vysokoškolská skripta České zemědělské univerzity v Praze 2012
2. Kopec, K.: *Zelenina ve výživě člověka*. Praha, Grada Publishing a.s. 2010
3. Vassallo, N.: *Polyphenols and Health: New and Recent Advances*. New York, Nova Publishers 2008
4. Volf, K.; Andres, F.: *Flavonoidy a jejich biologické působení*. Dostupné z URL: <www.juwital.cz/Upload/Documents/FLAVONOIDY.pdf> [cit. 14.1.2015]
5. Amaki, K.; Saito, E.: Role of Chlorogenic Acid Quinone and Interaction of Chlorogenic Acid Quinone and Catechins in the Enzymatic Browning of Apple Bioscience. *Biotechnology and Biochemistry* **75**:5, 829-832 (2011).
6. Haslam, E.: *Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited*. Cambridge, Cambridge University Press 1989
7. Santos-Buelga, C.; Escribano-Bailon, M.; *Recent Advances in Polyphenol Research*. 2. vyd. New York, John Wiley & Sons 2011.
8. MP Biomedicals: *Morin*. Dostupné z URL: <<http://www.mpbio.com/product.php?pid=02155733>> [cit. 20.1.2015].
9. Khopkar, SM.: *Basic Concepts Of Analytical Chemistry*. New Delhi, New Age International 1998.
10. MP Biomedicals: *Myricetin*. Dostupné z URL: <<http://www.mpbio.com/product.php?pid=02155748>> [cit. 20.1.2015]
11. ChemSpider: *Myricetin*. Dostupné z URL: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444991.html>> [cit. 20.1.2015]
12. MP Biomedicals: *Rutin Trihydrate*. Dostupné z URL: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02102824>> [cit. 20.1.2015]
13. MP Biomedicals: *Hesperetin*. Dostupné z URL: <<http://www.mpbio.com/product.php?pid=02157337>> [cit. 20.1.2015]
14. PubChem: *Hesperetin*. Dostupné z URL: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hesperetin#section=Drug-and-Medication-Information>> [cit. 20.1.2015]
15. WebMD: *Quercetin*. Dostupné z URL: <<http://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-294-QUERCETIN.aspx?activeIngredientId=294&activeIngredientName=QUERCETIN>> [cit. 20.1.2015]

16. WebMD: *Chrysin*. Dostupné z URL: <<http://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-1047-chrysin.aspx?activeingredientid=1047&activeingredientname=chrysin>> [cit. 20.1.2015]
17. PubChem: *Curcumin*. Dostupné z URL: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/969516#section=Top>> [cit. 20.1.2015]
18. PubChem: *Baicalin*. Dostupné z URL: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64982#section=Pharmacology-and-Biochemistry>> [cit. 20.1.2015]
19. Sigma-Aldrich: *Naringin*. Dostupné z URL: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n1376?lang=en®ion=CZ>> [cit. 20.1.2015]
20. Wang, D.; Gao, K.; Li, X.: Long-term naringin consumption reverses a glucose uptake defect and improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **102**, 13-20 (2012)
21. Sigma-Aldrich: *3-hydroxyflavone*. Dostupné z URL: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/h4280?lang=en®ion=CZ>> [cit. 21.1.2015]
22. Guharay, J.; Chaudhuri, R.: Excited state proton transfer fluorescence of 3-hydroxyflavone in model membranes. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **53**:3, 457-462 (1997).
23. PubChem: *Quercetin*. Dostupné z URL: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280343#section=2D-Structure>> [cit. 21.1.2015]
24. PubChem: *4-methylumbelliferon*. Dostupné z URL: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280567#section=Pharmacology-and-Biochemistry>> [cit. 21.1.2015]
25. Sigma-Aldrich: *4-methylumbelliferon*. Dostupné z URL: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/m1381?lang=en®ion=CZ>> [cit. 21.1.2015]
26. Abcam Biochemicals: *4-methylumbelliferon*. Dostupné z URL: <<http://www.abcam.com/4-Methylumbelliferone-Hymecromone-ab143119.html>> [cit. 21.1.2015]
27. Abcam Biochemicals: *Resveratrol*. Dostupné z URL: <<http://www.abcam.com/resveratrol-ab120726.html>> [cit. 21.1.2015]
28. Barberán, F. T.; Gil, M. I.; Tomás, F.: Flavonoid Aglycones and Glycosides from *Teucrium gnaphalodes*. *Journal of Natural Products*, **48**:5, 859–860 (1985)
29. Abcam Biochemicals: *Diosmin*. Dostupné z URL: <<http://www.abcam.com/diosmin-ab142864.html>> [cit. 21.1.2015]
30. Dholakiya, S. L.; Benzeroual, K. E.: Protective effect of diosmin on LPS-induced apoptosis in PC12 cells and inhibition of TNF- α expression. *Toxicology In Vitro*, **25**:5, 1039-44 (2011).

31. PubChem: *Guaiacol*. Dostupné z URL: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/460#section=NLM-Curated-PubMed-Citations>> [cit. 22.1.2015]
32. Dorfner, R; Ferge, T; Kettrup, A.: Real-time monitoring of 4-vinylguaiacol, guaiacol, and phenol during coffee roasting by resonant laser ionization time-of-flight mass spektrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**:19, 5768–5773 (2003).
33. Chemistry World: *Guaiacol*. Dostupné z URL: <<http://www.rsc.org/chemistryworld/2013/12/guaiacol-whisky-smoke-bacon-coffee>> [cit. 22.1.2015]
34. PubChem: *Hesperidin*. Dostupné z URL: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10621#section=2D-Structure>> [cit. 22.1.2015]
35. Al-Ashaal, H.A.; El-Sheltawy, S.T.: Antioxidant capacity of hesperidin from citrus peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. *Pharmaceutical Biology* **49**:3, 276-82 (2011).
36. Tanaka, T.; Tanaka, M.: Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of β -cryptoxanthin and hesperidin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**, (2012)
37. Londoño-Londoño, J.; Rodrigues De Lima, V.; Hesperidin and hesperetin membrane interaction: understanding the role of 7-O-glycoside moiety in flavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **499**:1-2, 6-16 (2010).
38. Srinivasan, M.; Sudheer, A.R.: Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **40**:2, 92-100 (2007).
39. Learn Chemistry: *Cinnamic acid*. Dostupné z URL: <<http://www.rsc.org/learn-chemistry/resource/rws00392447/cinnamic-acid>> [cit. 25.1.2015]
40. Sigma-Aldrich: *p-Coumaric acid*. Dostupné z URL: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9008?lang=en®ion=CZ>> [cit. 25.1.2015]
41. PubChem: *p-Coumaric acid*. Dostupné z URL: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637542#section=Top>> [cit. 25.1.2015]
42. PubChem: *p-Coumaric acid*. Dostupné z URL: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637542#section=Pharmacology-and-Biochemistry>> [cit. 25.1.2015]
43. Ferguson, L.R.; Zhu S.: Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells, *Molecular Nutrition & Food Research* **49**:6, 585–593 (2005).
44. Sigma-Aldrich: *Gallic acid*. Dostupné z URL: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g7384?lang=en®ion=CZ>> [cit. 25.1.2015]

45. Ow, Y.Y.; Stupans, I.: Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes, *Current Drug Metabolism* **4**:3, 241-8 (2003)
46. PubChem: *Vanillin*. Dostupné z URL: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1183#section=Pharmacology-and-Biochemistry>> [cit. 26.1.2015]
47. Kaur, B.; Chakraborty, D.: Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **169**:4, 1353-1372 (2013)
48. Abcam Biochemicals: *Vanillin*. Dostupné z URL: <<http://www.abcam.com/vanillin-ab145706.html>> [cit. 26.1.2015]
49. Web MD: *Phenylalanine*. Dostupné z URL: <<http://www.webmd.com/vitamins-supplements/ingredientmono-653-phenylalanine.aspx?activeingredientid=653&activeingredientname=phenylalanine>> [cit. 28.1.2015]
50. Siddiqui, A. H.; Stolk, L. M.: L-phenylalanine and UVA irradiation in the treatment of vitiligo. *Dermatology* **188**:3, 215-8 (1994).
51. Francol, S. G.; Domínguez, G.: Alternatives in the induction and preparation of phenobarbital/naphthoflavone-induced S9 and their activation profiles. *Mutagenesis* **14**:3, 323-326 (1999).
52. Takahashi N.; Harttig U.: The model Ah-receptor agonist beta-naphthoflavone inhibits aflatoxin B1-DNA binding in vivo in rainbow trout at dietary levels that do not induce CYP1A enzymes. *Carcinogenesis* **17**:1, 79-87 (1996).
53. Gasiewicz T. A.; Henry E. C.: Expression and activity of aryl hydrocarbon receptors in development and cancer. *Critical Reviews Eukaryotic Gene Expression* **18**:4, 279-321 (2008).
54. Prouct Block: *α-naphthoflavone*. Dostupné z URL: <<http://www.scbt.com/datasheet-257037--naphthoflavone.html>> [cit. 30.1.2015]
55. Cayman Chemical: *α-naphthoflavone*. Dostupné z URL: <<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/16924>> [cit. 30.1.2015]
56. Merchant, M.; Krishnan, V.: Mechanism of action of alpha-naphthoflavone as an Ah receptor antagonist in MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **120**:2, 179-85 (1993)
57. Zhu, W.; Yang, B.: Flavone inhibits nitric oxide synthase (NOS) activity, nitric oxide production and protein S-nitrosylation in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **458**:3, 590–595 (2015).
58. Abcam Biochemicals: *Flavanone*. Dostupné z URL: <<http://www.abcam.com/flavanone-ab142430.html>> [cit. 30.1.2015]

59. Khan, M. K.; Huma, Z. E.: A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* **33**:1, 85–104 (2014).
60. Kuntz, S.; Wenzel, U.: Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *European Journal of Nutrition* **38**:3 133-42 (1999).
61. Navarro, M. T.; Vallejo, F.: Bioavailability and Metabolism of Citrus Fruit Beverage Flavanones in Humans. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 537–551 (2014).
62. Rijke, E.; Out, P.: Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* **1112**:1-2, 31–63 (2006).
63. Lester, P.: Flavonoids and Other Polyphenols. *Academic Press* **335**, 3-45 (2002).
64. Harmatha, J.: Strukturní bohatství a biologicky význam lignanů a jim příbuzných rostlinných fenylpropanoidů, *Chemické listy* **99**, 622 – 623 (2005).
65. Adlercreutz, H.: Lignans and human health, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **44**:5-6, 483-525 (2007).
66. Dvořáková, M.; Dostálek, P.: Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladínách, mladínách a pivech. *Kvasný průmysl* **52**:4, 111 (2006).
67. Vallverdú-Queralt, A.; Boix, N.: Identification of phenolic compounds in red wine extract samples and zebrafish embryos by HPLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS. *Food Chemistry* **181**, 146-151 (2015).
68. Xie, J.; Zhang, Y.: Rapid identification and determination of 11 polyphenols in *Herba lycopi* by HPLC–MS/MS with multiple reactions monitoring mode (MRM). *Journal of Food Composition and Analysis* **24**:7, 1069–1072 (2011).
69. Zhang X. H.; Wu H. L.: Fast HPLC-DAD quantification of nine polyphenols in honey by using second-order calibration method based on trilinear decomposition algorithm. *Food Chemistry* **138**, 62–69 (2013).
70. Ali, F.; Ranneh, Y.: Identification of phenolic compounds in polyphenols-rich extract of Malaysian cocoa powder using the HPLC-UV-ESI—MS/MS and probing their antioxidant properties. *Journal of Food Science Technology* **52**:4, 2103–2111 (2015).
71. Garzón G. A.; Manns D. C.: Identification of Phenolic Compounds in Petals of Nasturtium Flowers (*Tropaeolum majus*) by High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry and Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 1803–1811 (2015).
72. Nalewajko-Sieliwoniuk, E.; Malejko, J.: Determination of polyphenolic compounds in *Cirsium palustre* (L.) extracts by high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Talanta* **133**, 38–44 (2015).

73. Slatnar, A.; Mikulic-Petkovsek, M.: Identification and quantification of phenolic compounds in kernels, oil and bagasse pellets of common walnut (*Juglans regia* L.). *Food Research International* **67**, 255–263 (2015).
74. Vitalini, S.; Giangiacomo, B.: Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. *Acta Biochimica Polonica* **58**, 203–209 (2011).

7 Zdroje obrázků

75. IHS Engineering 360: *Chapter 5: On-Line Identification of Flavonoids by HPLC Coupled to Diode Array Detection*. Dostupné z URL:
<<http://www.globalspec.com/reference/70423/203279/chapter-5-on-line-identification-of-flavonoids-by-hplc-coupled-to-diode-array-detection>>
[cit. 25.4.2015]
76. Agilent Technologies: *Triple Quadrupole LC/MS*. Dostupné z URL:
<<http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments-Systems/Mass-Spectrometry/6400-Series-Triple-Quadrupole-LC-MS/Pages/default.aspx>>
[cit. 12.12.2014]
77. Univerzita Pardubice: *Hmotnostní spektrometrie*. Dostupné z URL:
<http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf>
[cit. 14.1.2015]
78. Science: *Triple Quadrupole Mass Spectrometer*. Dostupné z URL:
<<http://www.sciencemag.org/>> [cit. 11.12.2015]