

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2020

Bc. Denisa Vraná

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Optimalizace HPLC/MS/MS metody pro analýzu fenolických látek
obsažených v amarantovém zrně

Bc. Denisa Vraná

Diplomová práce

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Denisa Vraná**
Osobní číslo: **C18561**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Téma práce: **Optimalizace HPLC/MS/MS metody pro analýzu fenolických látek
obsažených v amarantovém zrnu**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití HPLC v analýze fenolických látek s antioxidačním účinkem v amarantu a dalších pseudoobilovinách. Zaměřte se na různé způsoby extrakce a analýzu extraktů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Dále se věnujte spektrofotometrickým technikám pro sledování celkové antioxidační aktivity vzorku.
2. Na základě literární rešerše zvolte vhodné spektrofotometrické metody pro určení celkového obsahu látek s antioxidačními vlastnostmi. Metody použijte pro stanovení antioxidačních vlastností extraktů z amarantu a výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.
3. Optimalizovanou HPLC/MS/MS separaci využijte pro analýzu fenolických látek obsažených ve vybraných vzorcích amarantu. Dále porovnejte jejich zastoupení v extraktech po provedení různých typů hydrolýzy.
4. Porovnejte a diskutujte obsah a zastoupení fenolických látek v jednotlivých extraktech. Výsledky získané HPLC/MS/MS analýzou porovnejte s výsledky získanými pomocí spektrofotometrických metod.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Kateřina Pravcová**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2019, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 7. 2020

Denisa Vraná

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce paní doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení a čas strávený při opravách diplomové práce, dále pak za její trpělivost, vstřícnost a připomínky, které mi v průběhu zpracování poskytla. Také bych chtěla poděkovat konzultantce Ing. Kateřině Pravcové za její čas a pomoc při měření. Poděkování patří také všem, kteří mě během studia podporovali, zejména mé rodině, přátelům a spolužákům.

ANOTACE

Cílem této diplomové práce bylo stanovení jednotlivých volných a vázaných fenolických látek v různých extraktech amarantových zrn. Pro uvolnění fenolických látek byla použita alkalická a kyselá hydrolýza. Všechny extrakty amarantových zrn byly analyzovány pomocí optimalizované HPLC/MS/MS separace pracující v systému s obrácenými fázemi. Zastoupení volných fenolických látek v jednotlivých extraktech bylo porovnáno a následně byl diskutován vliv hydrolýzy na uvolnění fenolických látek z vazeb na buněčnou stěnu či cukernou jednotku. Dále byla měřena antioxidační aktivita a celkové množství fenolických látek pomocí spektrofotometrických technik.

KLÍČOVÁ SLOVA

Amarant, fenolické látky, antioxidační aktivita, spektrofotometrické metody, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometr

TITLE

Optimization of HPLC/MS/MS method for analysis of phenolic compounds in amaranth seeds

ANNOTATION

The aim of this thesis is to determine free and bounded phenolic compounds in different extracts of amaranth seeds. Alkaline hydrolysis and acid hydrolysis were used for phenolic compounds releasing. All extracts of amaranth seeds were analysed using optimized reversed phase HPLC/MS/MS separation. The representation of free phenolic compounds in the individual extracts was compared. Furthermore, the influence of hydrolysis on phenolic compounds releasing from bonds on a cell wall and a monosaccharide was discussed. In addition, antioxidant activity and total amount of phenolic compounds are measured by using spectrophotometric methods.

KEYWORDS

Amaranth, phenolic compounds, antioxidant activity, spectrophotometric methods, high performance liquid chromatography, mass spectrometry

OBSAH

ÚVOD	15
1 TEORETICKÁ ČÁST	16
1.1 Pseudoobiloviny.....	16
1.2 Amarant	18
1.2.1 Anatomie a složení zrna	19
1.2.2 Chemické složení	19
1.3 Antioxidanty	21
1.3.1 Antioxidační aktivita.....	22
1.4 Fenolické látky.....	25
1.4.1 Fenolické kyseliny	26
1.4.2 Flavonoidy.....	27
1.4.3 Stanovení celkového množství fenolických látek.....	28
1.5 Příprava vzorku.....	29
1.5.1 Hydrolýza fenolických látek	29
1.6 Separační metody využívané pro analýzu fenolických látek.....	31
1.6.1 Extrakce.....	31
1.6.2 Chromatografické metody.....	32
1.7 Hmotnostní spektrometrie.....	34
1.7.1 Iontový zdroj	35
1.7.2 Hmotnostní analyzátory	36
1.7.3 Tandemové uspořádání hmotnostních analyzátorů.....	38
1.7.4 Detektory	40
1.8 Spojení HPLC/MS	41
1.9 Analýza amarantových zrn	42
1.9.1 Úprava a extrakce vzorku.....	42
1.9.2 Stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC/MS metody	43

1.9.3	Stanovení antioxidační aktivity a celkového množství fenolických látek	44
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	46
2.1	Přístroje a zařízení	46
2.2	Použité chemikálie.....	46
2.2.1	Chemikálie	46
2.2.2	Vzorek	47
2.2.3	Standardy.....	48
2.3	Pracovní postup.....	49
2.3.1	Příprava vzorku	49
2.3.2	Alkalická hydrolýza a extrakce vázaných fenolických látek	49
2.3.3	Kyselá hydrolýza a extrakce vázaných fenolických látek.....	49
2.3.4	Extrakce volných fenolických látek	49
2.3.5	Postupná extrakce volných a vázaných fenolických látek	51
2.3.6	HPLC/MS/MS analýza amarantového zrna	51
2.3.7	Měření antioxidační aktivity	53
2.3.8	Statistické zpracování experimentálních dat.....	54
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	55
3.1	Optimalizace extrakce.....	55
3.2	Identifikace fenolických látek v extraktech amarantových zrn	56
3.3	Optimalizace HPLC/MS	56
3.4	Optimalizace MRM přechodů	58
3.5	Porovnání fenolických látek v různých extraktech.....	61
3.6	Kvantifikace fenolických látek	66
3.7	Spektrofotometrické metody.....	66
3.7.1	Stanovení antioxidační aktivity	66
3.7.2	Stanovení celkového množství fenolických látek	70
3.7.3	Porovnání spektrofotometrických metod	73

4	ZÁVĚR	75
	POUŽITÁ LITERATURA.....	76
	PŘÍLOHY	83

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 – Hlavní zástupci pseudoobilovin.....	16
Obrázek 2 – Rostlina a zrna amarantu.....	18
Obrázek 3 – Příčný a podélný řez amarantového zrna.....	19
Obrázek 4 – Mechanismus antioxidačního účinku fenolických látek.....	21
Obrázek 5 – Sloučenina ABTS.....	23
Obrázek 6 – Sloučenina DPPH.....	24
Obrázek 7 – Sloučenina TPTZ.....	24
Obrázek 8 – Základní struktura flavonoidů.....	27
Obrázek 9 – Schéma HPLC systému.....	33
Obrázek 10 – Schéma hmotnostního spektrometru.....	34
Obrázek 11 – Schéma ESI zdroje.....	36
Obrázek 12 – Schéma kvadrupólového analyzátoru.....	37
Obrázek 13 – Vzorek amarantového zrna.....	47
Obrázek 14 – Optimalizovaný gradient separace fenolických látek získaných z extraktu E3.....	57
Obrázek 15 – Optimalizace deklasteračního potenciálu pro m/z 431.....	58
Obrázek 16 – Optimalizace kolizní energie pro m/z 431.....	59
Obrázek 17 – Optimalizovaná separace látek obsažených v extraktu E3.....	62
Obrázek 18 – Optimalizovaná separace vázaných fenolických látek po alkalické (A) a kyselé (B) hydrolýze.....	63
Obrázek 19 – Optimalizovaná separace fenolických látek získaných po alkalické hydrolýze pevného podílu po předchozí extrakci volných fenolických látek.....	64
Obrázek 20 – Optimalizovaná separace fenolických látek získaných po alkalické (A) a kyselé (B) hydrolýze vodného podílu po extrakci volných fenolických látek.....	65
Obrázek 21 – Závislost úbytku absorbance v procentech na množství přidávaného extraktu vzorku (E3).....	67
Obrázek 22 – Závislost úbytku absorbance v procentech na době reakce.....	67
Obrázek 23 – Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu.....	68
Obrázek 24 – Antioxidační aktivita fenolických látek různých extraktů získaných ze vzorků amarantových zrn.....	69
Obrázek 25 – Kalibrační křivka závislosti nárůstu A na množství kyseliny gallové v dávkovaném objemu.....	71

Obrázek 26 – Celkové množství fenolických látek různých extraktů získaných ze vzorků amarantových zrn	72
Obrázek 27 – Závislost mezi celkovým množstvím fenolických látek (FCM metoda) a celkovou antioxidační aktivitou (ABTS metoda)	73

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Chemické složení pseudoobilovin vztažené na sušinu	17
Tabulka 2 – Chemické složení zrn tří druhů amarantu	20
Tabulka 3 – Obsah vitaminů a minerálních látek amarantu	20
Tabulka 4 – Přehled derivátů kyseliny benzoové	26
Tabulka 5 – Přehled derivátů kyseliny skořicové	27
Tabulka 6 – Běžné druhy flavonoidů	28
Tabulka 7 – Standardní látky fenolických kyselin a flavonoidů (vše Sigma Aldrich, USA) ...	48
Tabulka 8 – Souhrn jednotlivých provedených extrakcí	50
Tabulka 9 – Optimalizovaný gradient	52
Tabulka 10 – Optimalizované parametry pro MS/MS analýzu	60

SEZNAM ZKRATEK

A	absorbance
AA	antioxidační aktivita
AAPH	2,2'-azobis(2-methylpropionamid) dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
C18	oktadecylsilikagel
CE	kolizní energie
CID	kolizně indukovaná disociace
CXP	výstupní potenciál kolizní cely
DP	deklasterační potenciál
DPPH	1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	ionizace elektrosprejem
FCM	spektrofotometrická metoda s Folin-Ciocalteuovým činidlem
FRAP	stanovení antioxidační aktivity založené na redukci železitých iontů
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GAE	ekvivalentní množství kyseliny gallové
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
LC	kapalinová chromatografie
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
MRM	skenování více iontových reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
NL	skenování neutrálních ztrát
NP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie v systému s normálními fázemi
ORAC	metoda založená na schopnosti látky zhášet kyslíkové radikály
PI	skenování prekurzorových iontů
PR	skenování produktových iontů
PTFE	polytetrafluoroethylen

Q	kvadrupólový analyzátor
QqQ	trojitý kvadrupól
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
SIM	selektivní záznam iontů
SPE	extrakce tuhou fází
SRM	skan jedné iontové reakce
TAA	celková antioxidační aktivita
TEAC	celková antioxidační aktivita vztažená ke standardní látce Troloxu
TOF	analyzátor doby letu
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-S-triazinový komplex
Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

ÚVOD

Pro lidské tělo jsou důležité některé látky, které se mnohdy v lidském těle syntetizují ve velmi malém množství nebo se nesyntetizují vůbec. Proto se běžně přijímají formou rostlinné potravy. Výhodou rostlin je schopnost syntetizovat větší množství látek, z nichž jsou některé pro člověka esenciální, zejména aminokyseliny tvořící bílkoviny, mastné kyseliny lipidů, vláknina, vitaminy nebo fenolické látky s antioxidační aktivitou. Proto může strava bohatá na rostlinnou potravu podporovat zdraví člověka.

Z tohoto důvodu se v posledních letech zvýšil zájem o rostlinné produkty, mezi které patří také pseudoobiloviny. Jedním z jejich hlavních zástupců je námi studovaný amarant, který se vyznačuje vysokou výživovou hodnotou a nenáročností při pěstování. Ve srovnání s běžnými obilovinami obsahuje vyšší množství bílkovin, lipidů, vlákniny, minerálů a vitaminů. Důležité jsou i jeho biologicky aktivní látky, jako jsou fenolické kyseliny a flavonoidy. Tyto fenolické látky mohou snižovat vznik některých chronických onemocnění nebo přispívat k jejich prevenci. Zdraví prospěšné účinky fenolických látek jsou způsobeny především jejich antioxidačními vlastnostmi. Při antioxidační aktivitě dochází ke zhášení reaktivních forem kyslíku, čímž se zpomalí nebo zcela zastaví oxidační procesy, které negativně působí na lidský organismus. Proto jsou dnes fenolické látky v popředí zájmu a jsou studovány v mnoha přírodních matricích.

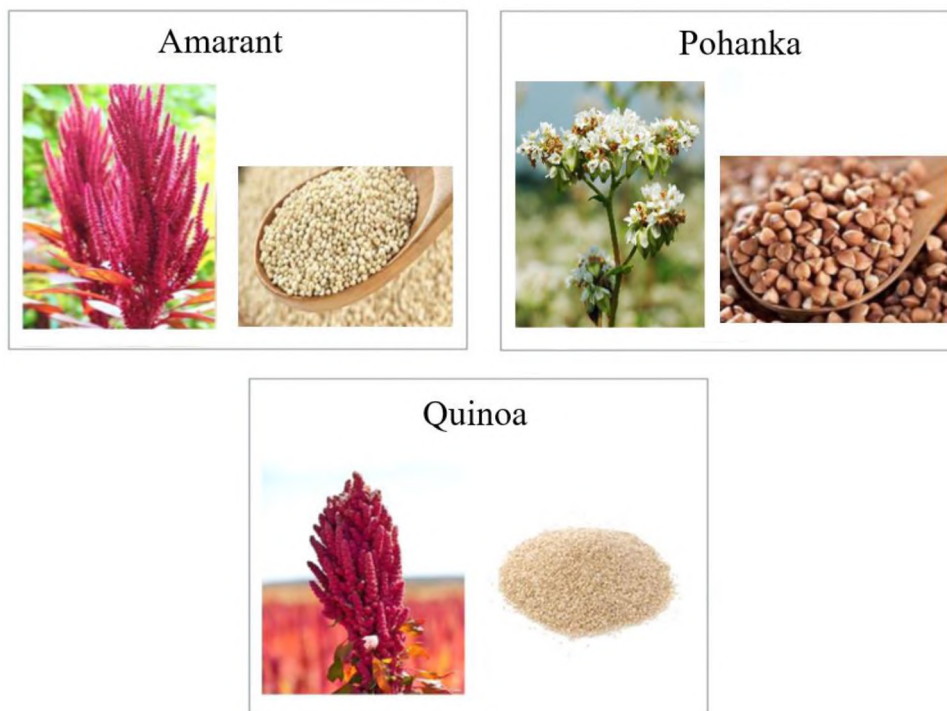
Fenolické látky se běžně získávají extrakcí do vodně-organických rozpouštědel. Pro jejich identifikaci a kvantifikaci se často využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení se spektrofotometrickým detektorem nebo hmotnostním spektrometrem.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Pseudoobiloviny

Pseudoobiloviny jsou rostliny, které připomínají klasické obiloviny, jako je pšenice, ječmen, žito nebo rýže. Mají podobné nutriční složení a využití jako běžné obiloviny, ale odlišnou morfologií semen. Jedná se o dvouděložné rostliny v porovnání s většinou obilovin, které jsou jednoděložné [1–3].

Mezi hlavní pseudoobiloviny patří pohanka, amarant a quinoa (Obrázek 1). Tyto plodiny se vyznačují velmi dobrým nutričním profilem, díky němuž se staly moderním trendem zdravé výživy [1–6]. Neobsahují nerozpustné proteiny tvořící lepek, proto jsou vhodné pro lidi trpící celiakií. Z tohoto důvodu jsou využívány jako náhrada za běžné obiloviny, které daný lepek obsahují [2–7]. Dále jsou dobrým zdrojem energie, protože se vyznačují vyšším obsahem mikroživin a škrobu [1,3,5].



Obrázek 1 – Hlavní zástupci pseudoobilovin [1].

Semena pohanky, amarantu a quinoj obsahují velké množství kvalitních proteinů, vlákniny a lipidů bohatých na nenasycené tuky (Tabulka 1). Kromě toho se vyznačují i důležitými a zdraví prospěšnými mikronutrienty, které mají různé biologické vlastnosti, mimo jiné i antioxidační aktivitu. Mezi ně patří některé vitaminy (kyselina askorbová,

tokoferoly či riboflavin) a minerální látky (K, Fe, P, Mg, Ca nebo Zn). Významný je i obsah dalších biologicky aktivních složek, jako jsou fenolické látky, saponiny, fytoosteroly, skvalen, terpenoidy, betaniny a anthokyany [1–6].

Tabulka 1 – Chemické složení pseudoobilovin vztažené na sušinu [1–3,6].

Druhy semen	Proteiny [% (m/m)]	Lipidy [% (m/m)]	Škrob [% (m/m)]	Vláknina [% (m/m)]	Minerální látky [% (m/m)]
Amarant	14,0–16,5	5,6–10,3	55,1–67,3	11,1–20,6	2,4–3,3
Quinoa	11,0–16,5	4,1–7,5	64,3–70,4	12,88–19,7	2,3–3,8
Pohanka	10,4–14,2	1,3–3,4	58,5–69,4	6,7–9,9	1,4–2,1

Díky obsahu zdraví prospěšných látek se pseudoobiloviny využívají k prevenci nebo k potlačení různých chronických onemocnění, jako je například kardiovaskulární onemocnění, ateroskleróza nebo rakovina. Na potravinářském trhu jsou jedny z nejvyhledávanějších plodin, čímž se zintenzivnil i jejich výzkum v různých oblastech, jako je agrochemie, biologie nebo chemie. Ale i přes značné zvýšení poptávky, jsou pseudoobiloviny ve srovnání s klasickými obilovinami stále málo využívané [1–6].

1.2 Amarant

Amarant (Obrázek 2), známý jako laskavec, je řazen do čeledi laskavcovitých (*Amaranthaceae*). Skládá se přibližně z 60 druhů, ale pouze tři druhy jsou využívány v potravinářském průmyslu (*Amaranthus Hypochondriacus*, *Amaranthus Cruentus* a *Amaranthus Caudatus*) [1–3,6,7]. Amarant je víceletá rostlina produkující malá semena o průměru cca 1–1,5 mm. Barva vnější obalové vrstvy semen bývá obvykle bílá, krémová, růžová, hnědá někdy i černá. Zbarvení však závisí na odrůdě amarantu [2,3,6,8].



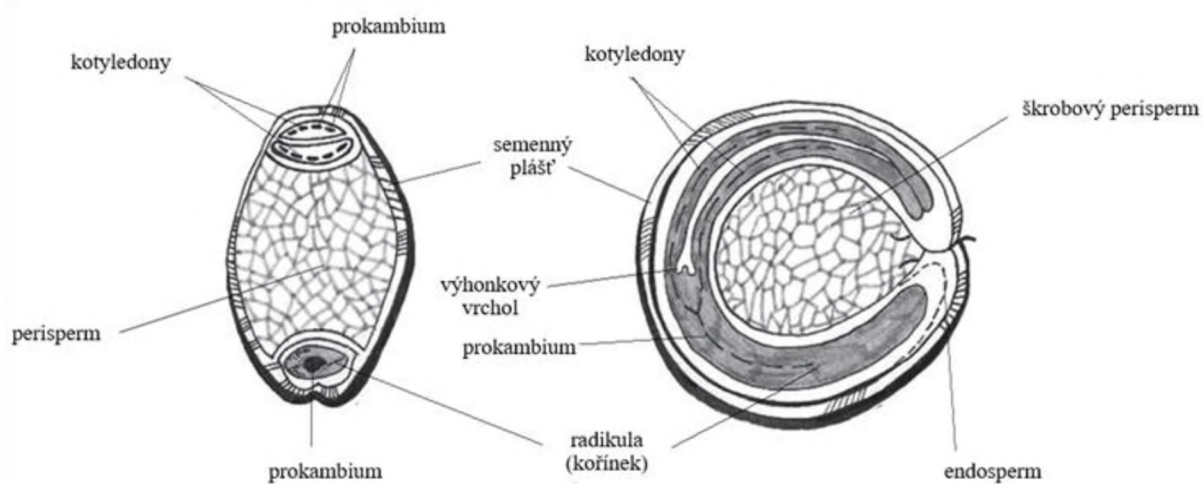
Obrázek 2 – Rostlina a zrna amarantu [9].

Semena amarantu mají vynikající nutriční složení, což ocenily už starověké aztécké, incké a mayské civilizace, které pěstovaly amarant jako jednu z hlavních plodin. V současnosti se amarant vyskytuje v mnoha zemích střední a jižní Ameriky, jihovýchodní Asie a Afriky [1,2,6–8]. Od 90. let se začal pěstovat také v mnoha evropských zemích, nejvíce v Polsku [3,6]. Amarant je velice adaptivní rostlina, která odolává různým teplotám, dešti, půdnímu pH (alkalickému či kyselému), škůdcům a některým parazitům [8,10]. Rostliny amarantu mají vysoký potenciál pro výnos zrna. Jedna rostlina produkuje cca 50 000 semen. Navíc patří mezi tzv. C4-rostliny s více účinnou fotosyntézou, což způsobuje rychlý růst rostliny [8].

Amarant je též víceúčelová rostlina, jejíž semena se využívají jako potrava či krmivo pro zvířata. Konzumovat se mohou i jeho klíčky, listy nebo natě [4,7,8]. Listy amarantu obsahují červenofialové pigmenty betacyaniny (zejména amaranthin a isoamaranthin), které se běžně používají jako přírodní potravinářská nebo kosmetická barviva [7,8,10]. Jelikož je květenství amarantu velice atraktivní, může se pěstovat také jako okrasná rostlina [7]. V současnosti tato alternativní plodina přitahuje celosvětovou pozornost a je považována za novou vysoce potenciální plodinu s různým způsobem využití [1,4,7,8].

1.2.1 Anatomie a složení zrna

Amarantové zrno je tvořeno embryem, endospermem a perispermem (Obrázek 3). Embryo je zárodek kruhového tvaru obklopující perisperm. Společně s vnější vrstvou obsahuje proteiny, lipidy, sacharidy, vlákninu a některé minerální látky [1,2]. Embryo představuje asi 25 % celkové hmotnosti zrna, proto je amarantové zrno hlavním zdrojem látek, které jsou koncentrovány v embryu [1–3,8]. Perisperm se na rozdíl od jednoděložných obilovin skládá z velmi malých škrobových granulí o průměru 1–3 μm [3,6,8]. Pro srovnání, průměr granulí rýžového škrobu se pohybuje okolo 3–8 μm a bramborového škrobu 15–100 μm . Endosperm je u zralých zrn málo vyvinutý, proto představuje jen malou část amarantového zrna [6,8].



Obrázek 3 – Příčný a podélný řez amarantového zrna [6,8].

1.2.2 Chemické složení

Amarantová zrna mají významné chemické složení (Tabulka 2). Proteiny amarantu bývají oproti běžným obilovinám biologicky dostupnější a jejich kvalita se blíží kvalitě živočišných proteinů, což je způsobeno vyváženým množstvím důležitých esenciálních aminokyselin, například lysinem, leucinem, tryptofanem a aminokyselinami obsahující síru. Amarant je rovněž dobrým zdrojem lipidů, které jsou tvořené nenasycenými mastnými kyselinami (linolová, olejová, linoleová a palmitová kyselina) a látkami, jako jsou skvalen a tokoferoly vyznačující se antioxidačními účinky [1–3,6,7,10]. Dále obsahuje značnou část polysacharidů, zejména škrobu, který představuje 65–75 % semene [6].

Tabulka 2 – Chemické složení zrn tří druhů amarantu [2,8].

Složení	<i>A. Caudatus</i>	<i>A. Hypochondriacus</i>	<i>A. Cruentus</i>
	[%]	[%]	[%]
Proteiny	15,5	17,9	15,5
Lipidy	7,6	7,9	7,7
Vláknina	4,7	2,2	4,4
Sacharidy	68,8	63,6	58,3

Nejvýznamnějšími sloučeninami amarantového zrna jsou především flavonoidy a fenolické kyseliny, které se vyskytují ve vnějších vrstvách semene a fungují jako obrana proti hmyzu a mikroorganismům [10]. Flavonoidy a jejich deriváty jsou nejvíce zastoupenými fenolickými sloučeninami amarantu, a to zejména v jeho listech a stoncích. Nejběžněji vyskytujícími se flavonoidy jsou rutin, vitexin, isovitexin, kvercetin, isokvercitrin nebo nikotiflorin [6–8]. Amarantové zrno je dále tvořeno volnými fenolickými kyselinami, kam patří především kyseliny, gallová, vanilová, *p*-hydroxybenzoová, *p*-kumarová, kávová či ferulová. Volné fenolické kyseliny tvoří asi 27 % z celkových fenolických kyselin amarantového zrna. Zbytek tvoří kyseliny, které se často nacházejí ve vázaných formách, jako je např. 4-*O*-glykosid kyseliny ferulové. Amarant se dále vyznačuje poměrně velkým obsahem taninů a saponinů [2–7,10]. Značné zastoupení mají také některé minerální látky a vitaminy (Tabulka 3) [2,6,7,10].

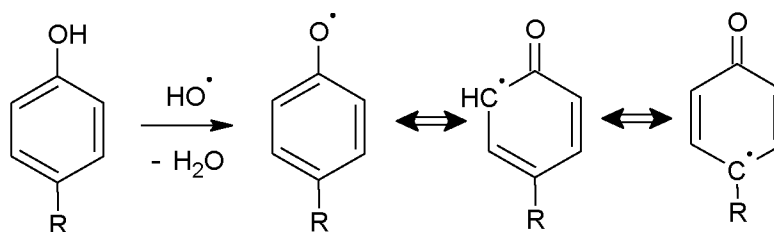
Tabulka 3 – Obsah vitaminů a minerálních látek amarantu [2].

Vitaminy	[mg/100 g d.w.]	Minerální látky	[mg/100 g d.w.]
Kyselina askorbová	4,2	Vápník	159,1
Tokoferoly	3,03	Hořčík	248,2
Riboflavin	0,2	Draslík	508
Vitamin B ₆	0,56	Fosfor	557
Vitamin A	2	Železo	7,61

1.3 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky působící proti oxidačnímu stresu. Oxidační stres je proces v lidském organismu, který je způsobený volnými radikály nebo reaktivními molekulami, jako jsou reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS). Volné ROS a RNS vznikají během metabolismu v lidském těle, kde často negativně ovlivňují struktury a funkce molekul lipidů, proteinů, ale dokonce i molekul DNA [10–19].

Principem jejich antioxidačního působení je uvolnění volného elektronu nebo odštěpení kyselého vodíku za vzniku negativně nabitého iontu. Příkladem jsou fenolické látky, které mají ve své struktuře hydroxylové skupiny, z nichž se kyselý vodík snadno odštěpuje za vzniku fenoxidového iontu (Obrázek 4). Působením negativně nabitého iontu na volné radikály vzniká více stabilní radikál, který zabraňuje oxidaci různých potravinových složek a životně důležitých molekul [12,13,20].



Obrázek 4 – Mechanismus antioxidačního účinku fenolických látek [13].

Lidské tělo je za určitých podmínek schopno regulovat výskyt volných radikálů pomocí endogenních antioxidantů enzymové (katalasa, superoxidodismutasa) nebo neenzymové povahy (kyselina askorbová, tokoferoly, kyselina močová, glutathion). Často se však stává, že výskyt volných radikálů je vyšší než výskyt endogenních antioxidantů. Projevem je zrychlené stárnutí a zvýšené riziko vzniku různých zdravotních problémů, jako je narušení imunitního systému, kardiovaskulární onemocnění, rakovina, diabetes či obezita. Pro správnou fyziologickou funkci je tedy nutná rovnováha mezi volnými radikály a antioxidanty [10–21]. Při nedostatku endogenních antioxidantů se mohou použít i exogenní antioxidanty, které jsou obvykle přijímány formou tzv. funkčních potravin. Tyto přírodní rostlinné antioxidanty se vyznačují různými biochemickými účinky. Nejvýznamnější je však jejich antioxidační, antikarcinogenní a protizánětlivé působení. Z tohoto důvodu se staly velmi významné v oblasti biochemického a farmakologického výzkumu a neustále se nalézají další rostlinné látky zpomalující oxidační účinky volných radikálů [11,12,16,17]. Antioxidační vlastnosti vykazují celá řada rostlinných materiálů, zejména zelenina, ovoce,

obiloviny, koření a byliny. Mezi přírodní antioxidanty vyskytující se v těchto materiálech patří fenolické látky (fenolické kyseliny, flavonoidy, chinony, lignany, taniny a další), vitaminy (kyselina askorbová, tokoferoly nebo betakaroten), terpenoidy včetně karotenoidů, sloučeniny dusíku (alkaloidy, aminy a betalainy) a některé přechodné kovy (Fe, Mn, Cu, Zn, Se a Ni) [10–17]. Kromě antioxidantů obsažených v potravinách lze využít i syntetické antioxidanty. Syntetické antioxidanty bývají účinnější a často se používají jako aditiva do potravin, kde zabraňují oxidaci některých přítomných složek. Jejich hlavní nevýhodou je negativní účinek na lidské zdraví. Z tohoto důvodu se běžně nahrazují rostlinnými antioxidanty [12,13].

1.3.1 Antioxidační aktivita

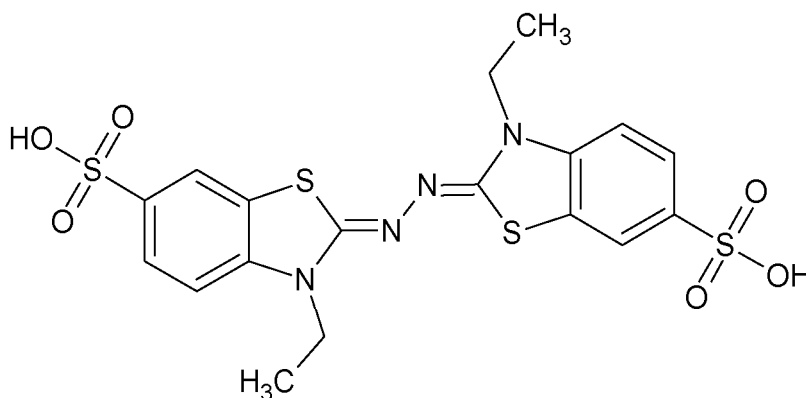
Antioxidační aktivita (AA) je schopnost sloučenin snižovat oxidační vlastnosti volných radikálů či tomuto procesu zabránit. Jelikož je několik druhů antioxidantů, které jsou přijímány ve složitých matricích, neurčuje se AA jednotlivých látek, ale celková antioxidační aktivita vzorku (TAA). Míra TAA závisí na mnoha faktorech, proto je u různých biologicky aktivních sloučenin odlišná [10,12,17]. Závisí zejména na reaktivitě antioxidantů, což souvisí s počtem a polohou jejich hydroxylových skupin. Čím větší je počet hydroxylových skupin, tím vyšší je schopnost reakce s volnými reaktivními radikály [10,12,18].

Existuje řada metod pro stanovení antioxidační aktivity dané látky či přírodních materiálů, které jsou založené na různých chemických a fyzikálních principech [14]. Hlavním principem chemických metod je reakce organického činidla s volnými radikály za vzniku barevných produktů, které je možné monitorovat pomocí spektrofotometru. Chemické metody mohou být založené na schopnosti eliminovat radikály (ABTS, DPPH či ORAC) nebo na redoxních vlastnostech látek (FRAP) [10,14,16–22]. Smyslem těchto metod je charakteristika jejich antioxidační účinnosti v podmínkách, které jsou blízké fyziologickému prostředí. Při sledování TAA je však velmi důležité rozlišovat účinky zjištěné *in vitro* (experimentální měření při odlišné teplotě a pH než je v lidském organismu) a účinky zjištěné *in vivo*, kde řada rostlinných materiálů podléhá metabolickým přeměnám již v trávicím traktu [10,12,15–22]. Dále je důležité, aby vybraná metoda byla rychlá a poskytovala stabilní výsledky v delším časovém rozmezí, protože stanovení velkého počtu vzorku je časově náročné [14,15,21].

1.3.1.1 Metoda ABTS

Metoda ABTS patří mezi oblíbenou metodu stanovující TAA. Jelikož se výsledné hodnoty antioxidační aktivity běžně srovnávají s hodnotami standardní látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2- karboxylová kyselina), bývá označována také jako metoda TEAC (Trolox Ekvivalent Antioxidant Capacity).

Principem metody je sledování úbytku radikálového kationtu $ABTS^{•+}$ (2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát), který je nejprve zapotřebí vytvořit oxidací ABTS sloučeniny (Obrázek 5) peroxodisíranem draselným, oxidem manganičitým nebo pomocí enzymatického systému (H_2O_2 /peroxidasa). Vzniklý modrozelený roztok radikálového kationtu $ABTS^{•+}$ následně reaguje s antioxidanty, čímž dojde k jeho odbarvení, které se spektrofotometricky monitoruje při vlnové délce 734 nm. Výsledný pokles absorbance je často závislý na reakční době, koncentraci antioxidantů ve vzorku a jejich antioxidačních vlastnostech [14–18,21].

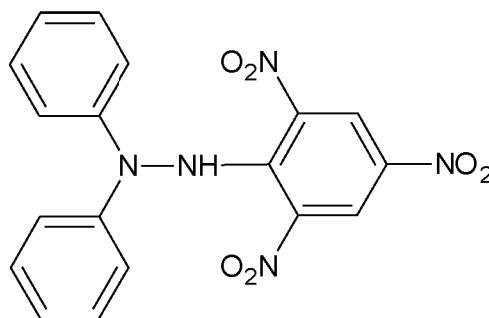


Obrázek 5 – Sloučenina ABTS.

1.3.1.2 Metoda DPPH

Metoda DPPH je jednou ze základních analytických metod pro stanovení TAA biologicky aktivních látek. Princip této metody spočívá v reakci testovaného extraktu se stabilním radikálem DPPH $^{\bullet}$ (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl). Výchozí látkou je sloučenina DPPH (Obrázek 6), která je rozpustná v methanolu nebo ethanolu za vzniku fialově zbarveného roztoku radikálu DPPH $^{\bullet}$ [14,16,18]. Působením antioxidantů dochází k redukci DPPH $^{\bullet}$ za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin), což se projeví odbarvením roztoku. Míra odbarvení se spektrofotometricky monitoruje při vlnové délce 515 nm. Měření se provádí buď po uplynutí určité konstantní doby, nebo se měří závislost poklesu absorbance na čase (tzv. kinetický režim). Výsledky bývají běžně uvedeny jako EC₅₀, tj. množství antioxidantu,

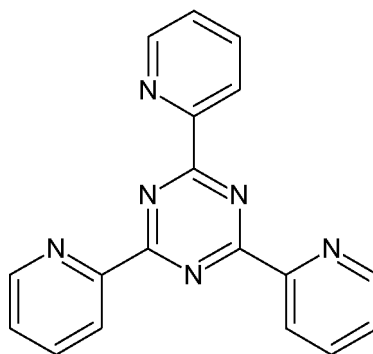
které je nezbytné ke snížení počáteční koncentrace DPPH o 50 %. Konečná antioxidační aktivita je vyjádřena jako ekvivalentní množství standardu Troloxu [5,15–21].



Obrázek 6 – Sloučenina DPPH.

1.3.1.3 Metoda FRAP

Metoda FRAP je založena na redukčních vlastnostech antioxidantů. Antioxidanty obsažené v rostlinných extraktech redukují žlutý komplex železitých iontů s TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazin) za vzniku intenzivně modře zbarveného komplexu TPTZ se železnatými ionty, který se monitoruje pomocí spektrofotometru při vlnové délce 593 nm. Výsledné hodnoty bývají vztaheny ke standardní látce Troloxu nebo ke kyselině L-askorbové. Nevýhodou této metody je neúplná redukce Fe^{3+} iontu s některými fenolickými látkami, proto se často nemusí shodovat s celkovou antioxidační aktivitou vzorku [5,15,16,21]. Struktura sloučeniny TPTZ je znázorněna na Obrázku 7.



Obrázek 7 – Sloučenina TPTZ.

1.3.1.4 Metoda ORAC

Tato fluorescenční metoda je založená na schopnosti antioxidantů vylučovat peroxylové radikály, které jsou iniciovány tepelným rozkladem sloučeniny AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropan hydrochlorid) při 37 °C. Peroxylové radikály se běžně oxidují

pomocí fluoresceinu sloužícího jako fluorescenční sonda. Oxidací těchto radikálů dojde k úbytku fluorescence, který je monitorován pomocí mikrotitrační čtecí destičky s fluorescenčními filtry v rozmezí vlnových délek 450–700 nm. Jako standardní látka se běžně používá Trolox [5,15–18,21].

1.4 Fenolické látky

Fenolické látky bývají nedílnou součástí přírodních antioxidantů, které mají pozitivní vliv na lidské zdraví [3,11–13]. Mezi základní třídy patří zejména flavonoidy, fenolické kyseliny, taniny, lignany, ligniny, chalkony (chalkonoidy), kumariny a saponiny [10–12,18,23]. Jsou to aromatické sloučeniny obsahující jednu nebo více hydroxylových funkčních skupin, včetně jejich funkčních derivátů. Bývají velmi komplexní a mohou se vyskytovat jako volné, konjugované (glykosidy) či vázané na buněčnou stěnu přírodního materiálu, kde často interagují s biomolekulami, jako jsou sacharidy, proteiny nebo peptidy [10,12,13,18,20,24].

Fenolické sloučeniny jsou sekundární metabolity přítomné v potravinách rostlinného původu (obiloviny, luštěniny, čaj, káva a další) [5,11,16,20,25]. Jelikož se vyznačují některými farmakologickými vlastnostmi, mohou se využívat v medicíně jako potenciální složky prosperující lidskému organismu a zároveň hrají důležitou roli při různých typech chronického onemocnění. Mají pozitivní vliv nejen na člověka, ale i na samotné rostliny, ve kterých se dané fenolické sloučeniny nacházejí. Bývají stavebními, vonnými a ochrannými složkami rostlin a podílejí se na jejich struktuře, odolnosti proti UV záření či škůdcům, procesu klíčení semen, vývoji rostliny a na mnoha dalších funkcích. Do této skupiny látek se dále řadí i některé rostlinné pigmenty, jako jsou betakyaniny či anthokyaniny, které způsobují charakteristické zbarvení rostlin [10,12,18,20,23,25].

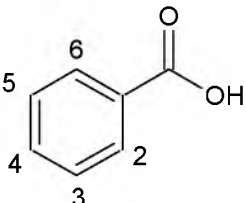
Obsah fenolických sloučenin se může v různých částech rostliny a jejich plodů značně lišit. Často také jejich koncentrace závisí na vnějších faktorech, jako je kvalita půdy, kultivační proces, klimatické podmínky nebo způsob zpracování rostlinných produktů [7,20]. Problémem je zejména příliš vysoká teplota, která může způsobit změnu struktury fenolických sloučenin, čímž dojde k jejich degradaci [3,5,20]. Z tohoto důvodu se fenolické sloučeniny obvykle přijímají formou syrových pokrmů (zelenina nebo ovoce) a při jejich úpravě je důležité volit vhodnou teplotu [11]. Naopak ke zvýšení fenolických látek dochází při klíčení, kde se uvolňují vázané fenolické sloučeniny vlivem endogenních hydrolytických enzymů [5,21,23].

1.4.1 Fenolické kyseliny

Fenolické kyseliny bývají obsaženy v potravinách rostlinného původu, kde působí jako antioxidanty zabraňující oxidaci různých potravinových složek, zejména mastných kyselin lipidů. Hlavním skeletem je benzenové jádro, na kterém jsou nasubstituované karboxylové a hydroxylové skupiny. Tato skupina látek se dále dělí na dvě podskupiny, jejichž základními strukturami jsou kyselina benzoová a skořicová [10,12,18,20]. Řada fenolických kyselin se váže na cukernou jednotku za vzniku glykosidů nebo se mohou vázat na buněčnou stěnu přírodní matrice, pro jejich uvolnění z esterových vazeb se používají chemické nebo enzymatické hydrolýzy [10,12,23].

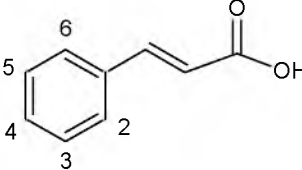
Nejvýznamnějšími deriváty kyseliny benzoové jsou kyselina gallová a její dimerní forma kyselina ellagová, které mohou dále tvořit hydrolyzované tanniny (gallotanniny a ellagotanniny). Dalšími hlavními zástupci jsou kyseliny, 4-hydroxybenzoová, 3,4-dihydroxybenzoová, vanilová, syringová a salicylová [10–12,18,23,26]. Strukturální vzorce běžných hydroxybenzoových kyselin jsou znázorněny v Tabulce 4.

Tabulka 4 – Přehled derivátů kyseliny benzoové [10,12,23].

Kyselina benzoová	2	3	4	5	6	Deriváty kyseliny benzoové
	H	OH	OH	OH	H	Gallová kyselina
	H	H	OH	H	H	4-hydroxybenzoová kyselina
	H	OH	OH	H	H	3,4-dihydroxybenzoová kyselina
	H	OCH ₃	OH	H	H	Vanilová kyselina
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Syringová kyselina
	OH	H	H	H	H	Salicylová kyselina

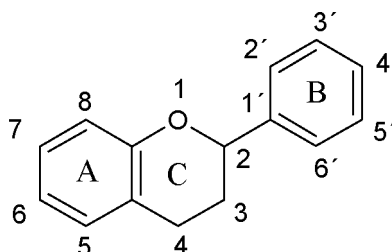
Typickými deriváty kyseliny skořicové jsou kyseliny, *p*-kumarová, *o*-kumarová, kávová, ferulová a sinapová. Tyto kyseliny mohou být ve své volné formě (Tabulka 5) nebo jako estery hydroxykyselin (kyselina šikimová nebo chinová) a glykosidů. Další dominantní kyselinou této skupiny je kyselina chlorogenová, což je kyselina kávová esterifikovaná kyselinou chinovou [10,18,20,23,26].

Tabulka 5 – Přehled derivátů kyseliny skořicové [10,12,23].

Kyselina skořicová	2	3	4	5	6	Deriváty kyseliny skořicové
	H	H	OH	H	H	<i>p</i> -kumarová kyselina
	H	OH	H	H	H	<i>o</i> -kumarová kyselina
	H	OH	OH	H	H	Kávová kyselina
	H	OCH ₃	OH	H	H	Ferulová kyselina
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Sinapová kyselina

1.4.2 Flavonoidy

Flavonoidy představují velmi početnou skupinu fenolických sloučenin, kterou můžeme najít ve všech cévních rostlinách, zejména v ovoci a zelenině. Patří mezi nejvíce konzumované fenolické sloučeniny s nejvyšší antioxidační aktivitou a často působí jako obranné pigmenty chránící rostlinu před škodlivými jevy [3,10,12,20,23]. Základní flavonoidní strukturou je flavanové jádro (Obrázek 8), které se skládá z 15 atomů uhlíku uspořádaných do tří kruhů (C6-C3-C6) [20,23,26,27].

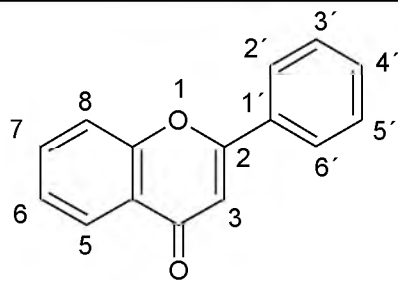
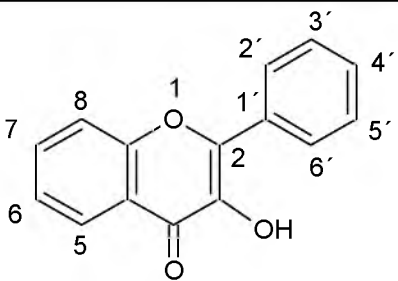
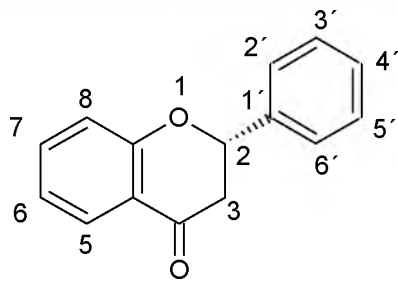
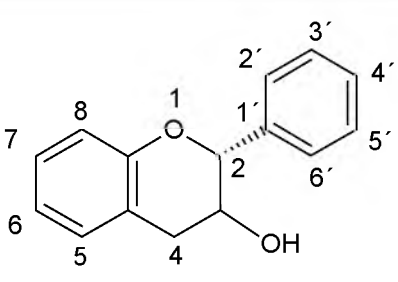


Obrázek 8 – Základní struktura flavonoidů [18,20,23,26,27]

Flavonoidy se vyskytují jak ve volné, tak i ve vázané formě. Vázané flavonoidy bývají spojeny glykosidickou vazbou s jednoduchými sacharidy (glukosa, galaktosa, arabinosa a rhamnosa) nebo oligosacharidy (rutinosa). V rostlinách jsou často přítomny jako *O*-glykosidy, kde je sacharid navázaný na hydroxylovou skupinu aglykonu (necukernou složku). Mezi ně patří například rutin neboli kvercetin-3-rutinosid. Dále mohou tvořit komplexy s lipidy, aminy či karboxylovými kyselinami. Takto substituované flavonoidy se štěpí na volné polyfenoly až v trávicím traktu, kde jsou často absorbovány. Vázané flavonoidy mívají nižší antioxidační aktivitu než jejich volné formy, protože mají méně kyselých vodíků, což je způsobeno navázáním sacharidu nebo jiné molekuly na hydroxylovou

skupinu flavonoidů [10,12,18,20,23]. Zástupci nejběžnějších flavonoidů jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6 – Běžné druhy flavonoidů [10,18,20,23,26,27].

Flavony					Flavonoly						
											
Nejběžnější deriváty	5	7	3'	4'	Nejběžnější deriváty	5	7	3'	4'	5'	
Apigenin	OH	OH	H	OH	Kvercetin	OH	OH	OH	OH	H	
Luteolin	OH	OH	OH	OH	Kaempferol	OH	OH	H	OH	H	
Chrysin	OH	OH	H	H	Myricetin	OH	OH	OH	OH	OH	
Flavanony					Flavan-3-oly						
											
Nejběžnější deriváty	5	7	3'	4'	Nejběžnější deriváty	3	5	7	3'	4'	5'
Naringenin	OH	OH	H	OH	Katechin	βOH	OH	OH	OH	OH	H
Hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃	(-) Epikatechin	αOH	OH	OH	OH	OH	H

1.4.3 Stanovení celkového množství fenolických látek

Pro stanovení celkového množství fenolických látek se často využívá jednoduchá spektrofotometrická metoda, která je založena na reakci Folin-Ciocalteuového činidla s fenolickými látkami. Folin-Ciocalteuové činidlo je směs fosfowolframových a fosfomolybdenových kyselin, které se redukují v prostředí uhličitanu sodného za vzniku

modrého zbarvení wolframových a molybdenových oxidů. Nárůst absorbance se měří při vlnové délce 750 nm. Výsledné hodnoty koncentrace polyfenolů jsou obvykle vztaheny na standardní látku kyselinu gallovou (GAE) nebo ekvivalentní množství katechinu [5,19,28].

1.5 Příprava vzorku

Příprava vzorku je velice důležitou částí celé analýzy. Musí se proto zvolit vhodný postup, který zaručí co nejvyšší možný výtěžek sledovaného analytu s co nejnižší chybou měření. Toho je často těžké dosáhnout, protože většina přírodních vzorků obsahuje velké množství různých látek, které vyžadují vícekrokovou přípravu. Problémem vícekrokové přípravy je zvýšený počet chyb zavedením interferentů a zároveň snížení výtěžnosti metody. Výhodou je naopak zlepšení selektivity a citlivosti stanovení [23].

Postupy přípravy vzorků pro analýzu fenolických sloučenin se mohou značně lišit. Výběr vhodného postupu záleží na formě rostlinného materiálu a obsahu fenolických látek [23]. Přírodní pevné vzorky jsou obvykle podrobeny mletí, homogenizaci a sušení, kterého lze docílit za pokojové či zvýšené teploty nebo tzv. lyofilizací. Při lyofilizaci se přírodní materiál suší vymrazováním a následnou sublimací přítomné vlhkosti za sníženého tlaku a teploty, čímž se zachová vzhled vzorku i jeho nutriční profil [29]. Poté následuje izolace a zakoncentrování analytu a odstranění rušivé matrice, což se provádí různým typem extrakce [10,19,23,24]. Před extrakcí se v některých případech musí provést hydrolýza, která slouží k vyvázání fenolických sloučenin z buněčné stěny přírodního materiálu [23,24].

1.5.1 Hydrolýza fenolických látek

Velká část fenolických kyselin a flavonoidů existuje v přírodních materiálech jako nerozpustné vázané komplexy, které jsou spojeny se sacharidy či proteiny buněčné stěny prostřednictvím esterových či etherových vazeb a nelze je extrahovat běžnými vodně-organickými rozpouštědly. Pro analýzu je proto velice důležité navázané látky uvolnit. Vzhledem k tomu, že se tyto navázané látky v trávicím traktu uvolňují vlivem pH prostředí nebo přítomnými enzymy, byly vyvinuty metody působící podobnými mechanismy. Pro vyvázání jednotlivých sloučenin z vazeb se obvykle používá alkalická, kyselá nebo enzymatická hydrolýza. Často se využívají i kombinace těchto typů hydrolýz [10,20,23,30].

Při alkalické hydrolýze se nejčastěji používá hydroxid sodný a při kyselé hydrolýze se používají silné anorganické kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková či sírová. Cílem hydrolýz je uvolnění jednotlivých sloučenin z glykosidických a esterových vazeb za vzniku

aglykonu. Použitím jednoho typu hydrolýzy často nedochází k vyvázání všech fenolických látek, proto je zapotřebí použít kombinaci alkalické a kyselé hydrolýzy. V prvním kroku se obvykle provádí alkalická hydrolýza, jejíž reakční doba se pohybuje v řádu několika hodin. Tato část může probíhat v inertním prostředí dusíku. Některé fenolické látky, zejména fenolické kyseliny, se při alkalické hydrolýze nemusí z buněčných stěn uvolnit, proto je nutné provést následnou kyselou hydrolýzu, která zajistí uvolnění dosud nevyvázaných fenolických látek. Kyselou hydrolýzou lze získat významné množství některých fenolických kyselin. Tyto zmiňované hydrolýzy však mohou způsobit i snížení nebo dokonce ztrátu některých sledovaných látek. Důvodem ztrát jsou vysoké teploty a drsné podmínky pH. Proto je důležité u obou typů hydrolýz zvolit takové pH a teplotu, aby se zamezil rozklad fenolických látek a zároveň tvorba nežádoucích vedlejších produktů. V alkalické hydrolýze se tato degradace látek eliminuje použitím kyseliny askorbové (silný antioxidant) a kyseliny ethylendiamintetraoctové (chelatační činidlo) [10,23,30,31].

K uvolnění fenolických látek z glykosidických vazeb se používá i méně rozšířená enzymatická hydrolýza. Tento způsob hydrolýzy využívá enzymy, jako jsou pektinázy, celulózy, amylázy nebo sulfatázy. Oproti alkalické a kyselé hydrolýze je méně drastická, ale často i méně účinná [10,13,23].

1.6 Separační metody využívané pro analýzu fenolických látek

1.6.1 Extrakce

Extrakce je separační metoda, která je založena na distribuci látky mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi. Její dělicí schopnost je dána selektivní rozpustností látek v rozpouštědle, která je závislá na typu interakcí uplatňujících se při rozpouštění. Z tohoto důvodu je důležitá volba vhodného extrakčního rozpouštědla [23,24,32,33].

Extrakci lze dělit podle skupenství fází, mezi kterými daná složka přechází: extrakce z pevné fáze do kapaliny, extrakce mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami, extrakce z kapaliny na pevnou fázi a extrakce z tekutiny na pevnou fázi [32,33].

1.6.1.1 Extrakce z pevné fáze do kapaliny

Tento typ extrakce se nejčastěji používá k izolaci jedné nebo více složek z biologického nebo přírodního pevného materiálu. Nejdůležitějším krokem je volba vhodného rozpouštědla, v němž se selektivně rozpouští izolovaná složka. Důležité je také dokonalé rozemletí testovaného materiálu. Pro dosažení vysokého výtěžku se provádí opakovaná extrakce, při které dochází k mnohonásobnému ustanovení rovnováhy mezi pevným vzorkem a rozpouštědlem. Opakovaná extrakce se může provádět buď diskontinuálně, nebo kontinuálně. Diskontinuální extrakce se obvykle provádí v třepačkách za laboratorní teploty. Vzhledem k tomu, že je extrakce tuhých látek obvykle zdlouhavá, dává se přednost kontinuálnímu provedení. Při kontinuální extrakci se nejčastěji používá Soxhletův extraktor, při kterém se extrahují látky za teploty varu. Při vyšší teplotě dojde k lepší rozpustnosti extrahovaných složek v organických rozpouštědlech, čímž se urychlí transport hmoty. Jeho výhodou je také vysoká účinnost a nižší spotřeba rozpouštědla. Extrakci testovaných látek tuhého materiálu lze rovněž podpořit mikrovlnným ohřevem nebo ultrazvukem [32,33].

Pro extrakci fenolických látek se obvykle používá klasická diskontinuální opakovaná extrakce, kde je nejdůležitější zvolit vhodné extrakční podmínky a rozpouštědlo. Rozpouštědla mívají různou polaritu a samotná extrakce probíhá při odlišných teplotách a podmínkách pH [13,23,24]. Tento typ extrakce je běžný pro izolaci volných forem fenolických kyselin a flavonoidů, které se získávají z pevného vzorku amarantových zrn. Volné fenolické sloučeniny mívají jednoduché struktury a běžně se extrahují vodnými roztoky organických rozpouštědel, jako je například vodný roztok methanolu, ethanolu, acetonu nebo ethylacetátu [23,24]. V amarantovém zrnu existují i vázané formy fenolických

sloučenin, které se nedají přímo extrahovat z pevného vzorku, proto se musí provést nejprve vhodná hydrolýza [23].

1.6.1.2 Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) patří mezi nejvíce používané analytické metody. Tento druh extrakce je založen na přechodu látek z kapalného vzorku do vhodného rozpouštědla (ethanol, methanol, ethylacetát a další) [13,23,24]. Metoda LLE umožňuje jednoduché, rychlé a selektivní dělení složek v širokém rozsahu koncentrací. Látky, které mají být extrahovány, se rozpouští v kapalině podle Liebigova pravidla (podobné se rozpouští v podobném). Pro úspěšnou extrakci je tedy zapotřebí mít dvě odlišné kapaliny, které jsou vzájemně nemísitelné. Druh rozpouštědla se volí především podle jeho schopnosti rozpouštět sledované látky. Ve většině případů se jedná o extrakci z vodných roztoků do organického rozpouštědla [32,33].

Tento typ extrakce se běžně využívá po hydrolýze k izolaci uvolněných fenolických látek. Jako extrakční rozpouštědlo se nejčastěji používá ethylacetát nebo diethylether [23].

1.6.2 Chromatografické metody

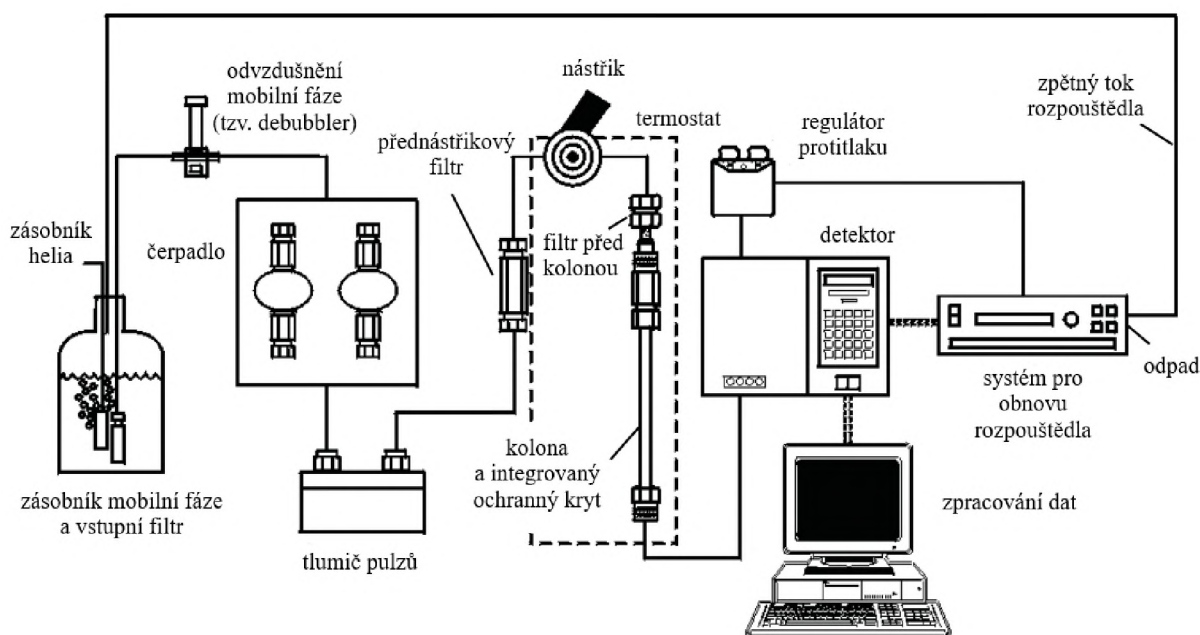
Chromatografie je separační metoda, při níž dochází k rozdělení směsi látek na základě distribuce mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní. Stacionární fáze bývá ve formě velmi malých tuhých částic, tenké vrstvy kapaliny nanesené na tuhých částicích nebo filmu kapaliny naneseném na vnitřní straně kapiláry. Mobilní fáze je plyn (plynová chromatografie) nebo kapalina (kapalinová chromatografie), která svým pohybem unáší složky vzorku směrem ke stacionární fázi, kde dochází k vzájemné interakci [33–35].

1.6.2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejpoužívanějších a nejúčinnějších chromatografických metod, která se obvykle používá k separaci, identifikaci a kvantifikaci fenolických sloučenin v přírodních matricích [23,24]. Vysokých účinností se dosahuje použitím chromatografické kolony s dostatečně malým vnitřním průměrem (do 4,6 mm) naplněnou vhodnou stacionární fází obsahující velmi malé částice pravidelného tvaru o jednotné velikosti (3–5 μm). Jelikož takto naplněná kolona klade velký odpor proti protékající mobilní fázi, musí se zvýšit hnací síla toku mobilní fáze pomocí vysokotlakého čerpadla vyrobeného z odolného materiálu (nerezová ocel). Tím se zajistí nejen vyšší účinnost

separace, ale i její rychlost. Důležitá je také odolnost chromatografické kolony vůči těmto vysokým tlakům a její chemická inertnost [32–34,36].

Principem této metody je zavedení vzorku do proudu mobilní fáze pomocí dávkovacího systému, často se používá manuální šesticestný ventil s dávkovací smyčkou nebo automatický ventil tzv. autosampler [33,34]. Vzorek unášený mobilní fází putuje do chromatografické kolony, kde dochází k samotné separaci analyzovaných látek v závislosti na interakcích mezi fázemi a vzorku. Za chromatografickou kolonou je umístěn detektor, který detekuje separované látky a zaznamenává jejich retenční časy. Volba vhodného detektoru hraje při analýze významnou roli a závisí na fyzikálně chemických vlastnostech analyzovaných látek. Nejběžněji používané detektory jsou spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické a v neposlední řadě hmotnostní spektrometry, jež se staly nejžádanějšími detektory ve spojení s kapalinovou chromatografií [32–36]. Schéma HPLC systému je znázorněno na Obrázku 9.



Obrázek 9 – Schéma HPLC systému [37].

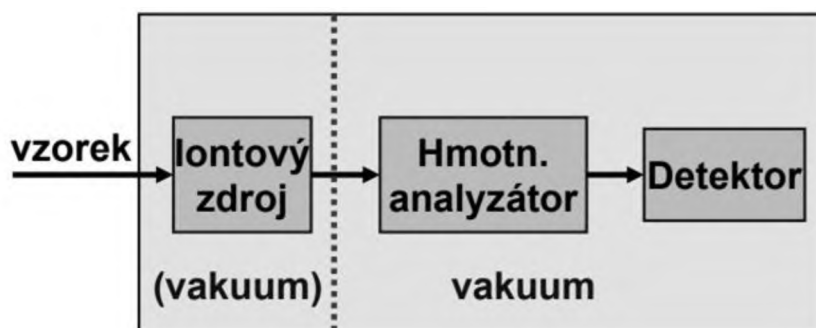
Vysokoučinná kapalinová chromatografie se dělí podle polarity mobilní a stacionární fáze na chromatografii v systému s normálními fázemi (NP-HPLC) a chromatografii v systému s obrácenými fázemi (RP-HPLC). Systém s normálními fázemi využívá polární stacionární fáze (silikagel, alumina, aminové báze a další) a méně polární mobilní fázi (organická rozpouštědla a jejich směsi). Nejčastěji se však používá HPLC v systému s obrácenými neboli reverzními fázemi, kde stacionární fází je nepolární chemicky modifikovaný silikagel

(nejčastěji pomocí oktadecylového řetězce, C18). Mobilní fázi představují vodné roztoky polárních organických rozpouštědel, jako jsou vodné roztoky methanolu nebo acetonitrilu. Pokud separace sledovaných látek probíhá za konstantního složení mobilní fáze, mluvíme o izokratické eluci. Tento typ eluce nebývá běžný, protože není vhodný pro analýzu složitějších směsí látek. Často se používá gradientová eluce, při které se složení mobilní fáze s časem mění. Tento způsob eluce zajišťuje rychlejší analýzu a lepší rozdělení složitějších směsí s velkými rozdíly retence [23,24,32–35,36].

1.7 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně chemická metoda široce využívaná pro detekci fenolických sloučenin. Její podstatou je ionizace molekuly na charakteristické ionty, rozlišení jednotlivých iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) a následné vyhodnocení hmotnostního záznamu relativních intenzit těchto iontů [38,39]. Hmotnostní spektrometrie má velmi dobrou vypovídající schopnost o struktuře analyzované látky a využívá se především ve stopové analýze organických látek. Výhodou metody jsou vysoká citlivost, minimální spotřeba vzorku a možnost spojení se separačními technikami, jako je LC nebo GC. Nevýhodou je především pořizovací a provozní cena [32,38].

Hmotnostní spektrometr (Obrázek 10) se skládá ze tří základních částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Tyto jednotlivé části přístroje jsou navzájem závislé a mnohdy jejich výběr ovlivňuje kvalitu hmotnostního spektra a výsledky měření. Nedílnou součástí je i zařízení pro zavádění vzorku, výkonný vakuový čerpací systém udržující dostatečně nízký tlak při analýze, iontová optika sloužící k fokusaci iontů a počítač pro sběr naměřených dat a jejich vyhodnocení [38–40].



Obrázek 10 – Schéma hmotnostního spektrometru [38].

1.7.1 Iontový zdroj

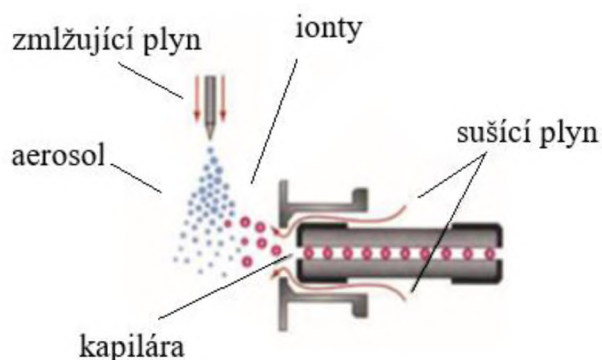
Iontový zdroj hmotnostního spektrometru slouží k ionizaci analytu, neboli k převedení neutrální molekuly analyzovaného vzorku do iontového stavu (nabité částice), za vzniku molekulárního iontu. Volba ionizační techniky závisí na mnoha faktorech, a to především na těkavosti látky, polaritě, molekulové hmotnosti, tepelné stabilitě, volbě polaritě ionizace, studiu nekovalentních interakcí a prostorovému uspořádání molekul (zejména biomolekul). Podle množství dodané energie dělíme ionizační techniky na tzv. tvrdé a měkké. Při tvrdé ionizaci získá ionizovaná molekula nadbytek vnitřní energie, která způsobí rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu. Při měkké ionizaci získá ionizovaná molekula mnohem menší energii, což se projeví nízkou fragmentací a ve spektru jsou pozorovány především protonované nebo deprotonované molekuly v závislosti na polaritě vloženého napětí. Pomocí měkkých ionizačních technik lze tedy získat informace o hmotnosti molekul v jejich původní formě. Mezi tvrdé ionizační techniky se řadí elektronová ionizace (EI). Do měkkých ionizačních technik, které jsou mnohem šetrnější, se řadí chemická ionizace (CI) a ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku, mezi které patří ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Mezi měkké ionizační techniky patří také ionizace laserem za účasti matrice (MALDI), která se využívá především pro ionizaci látek s velmi vysokou molekulovou hmotností [32,34,38–40].

1.7.1.1 Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem (ESI) je jednou z nejšetrnějších ionizačních technik, které jsou vhodné pro analýzu středně polárních až iontových látek. Často se používá při spojení hmotnostního spektrometru s kapalinovou chromatografií. Nelze ji však využít pro analýzu nepolárních sloučenin za použití nepolárních mobilních fází [32,38,40].

Principem elektrospreje (Obrázek 11) je vytvoření nabitých částic po průchodu vzorku kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí (3–5 kV). Na konci kapiláry dochází k rozprášení roztoku vlivem zmlžujícího plynu (N_2). Vzniklý nabitý aerosol je přiváděn při atmosférickém tlaku do ionizační komory, kde dochází působením protiproudu horkého inertního plynu k opařování rozpouštědla, čímž se zvýší hustota povrchového napětí a dojde k rozpadu kapiček, neboli k tzv. Coulombické explozi. Tato Coulombická exploze je způsobená převládajícími repulzními silami náboje nad povrchovým napětím kapky.

Opakováním tohoto mechanismu iontového vypařování disociované látky vede až k uvolnění iontů, které vstupují do plynné fáze hmotnostního analyzátoru [32,38–41].



Obrázek 11 – Schéma ESI zdroje [38].

Podle polaritly vkládaného napětí jsou ve spektru pozorovány ionty se sudým počtem elektronů, převážně protonované, $[M+H]^+$ nebo deprotonované molekuly, $[M-H]^-$. Fragmentové ionty jsou pozorovány zřídka. Dále mohou vznikat aduktové ionty s alkalickými kovy či se solí přítomnou v mobilní fázi, např. $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+K]^+$ nebo $[M+HCOO]^-$. Při ionizaci mohou vznikat i vícenásobně nabití ionty, čehož se využívá při analýze biomakromolekul s velmi vysokými molekulovými hmotnostmi, jako jsou peptidy, sacharidy, proteiny nebo nukleové kyseliny. Vzhledem k tomu, že se ionizují všechny přítomné kapalné fáze, je zapotřebí dbát na čistotu analyzovaného vzorku a používaného rozpouštědla [32,38].

1.7.2 Hmotnostní analyzátoary

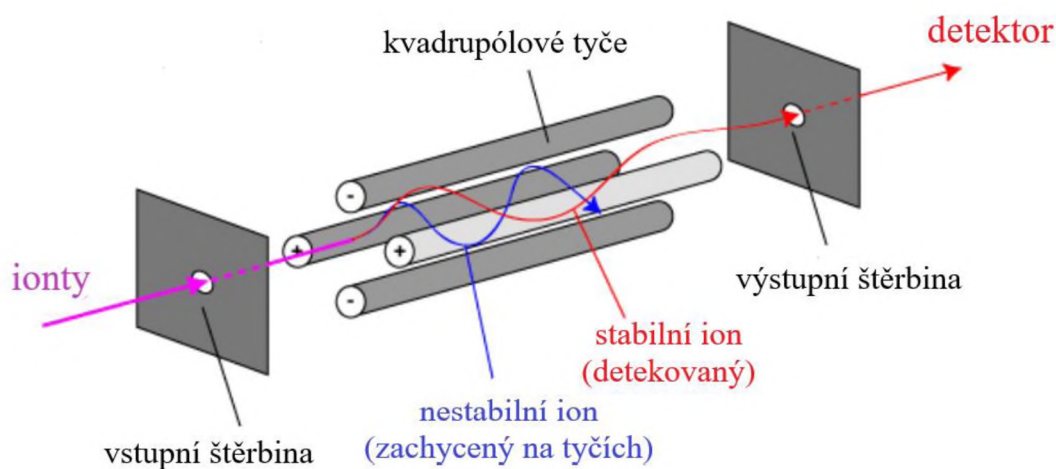
Hmotnostní analyzátoary slouží k separaci vzniklých iontů v plynné fázi podle jejich poměru m/z , které lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů. Separace iontů probíhá za velmi vysokého vakua, 10^{-3} – 10^{-11} Pa, v závislosti na použitém analyzátoaru. Mezi jejich základní parametry patří především rozlišovací schopnost, hmotnostní rozsah, dynamický rozsah (rozmezí koncentrací), správnost určení m/z a rychlost záznamu spekter. Hmotnostní analyzátoary se dělí podle způsobu separace iontů na skenující, průletové, iontové pasti a analyzátoary pohyblivosti iontů. Dále se mohou dělit podle jejich rozlišovací schopnosti na analyzátoary s nízkým a vysokým rozlišením.

Skenující analyzátoary postupně mění skenované veličiny a propouští ionty o určitém poměru m/z směrem k detektoru. Hlavními zástupci jsou kvadrupólový analyzátoar (Q) a sektorový magnetický analyzátoar. Principem iontových pastí (IT) je schopnost zadržovat

ionty pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzovat. Mezi hlavní zástupce patří lineární a 3D iontová past. Jejich výhodou je možnost získání vícenásobných spekter (MS^n). Stejným principem separace fungují i analyzátoři, jako jsou orbitrap a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR). Výhodou těchto dvou zmiňovaných analyzátořů je jejich současná kombinace analyzátoři s detektorem. Další skupinou hmotnostních analyzátořů jsou průletové analyzátoři, které měří dobu letu iontů potřebnou pro překonání určité vzdálenosti. Hlavním zástupcem je analyzátoř doby letu (TOF). Mezi jeho výhody patří rychlé měření spekter a teoreticky neomezený hmotnostní rozsah m/z [32,34,38–40].

1.7.2.1 Kvadrupólový analyzátoř

Konstrukčně se jedná o čtyři kovové tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu délky 20–30 cm. Hyperbolický průřez je optimální pro dosažení lepšího rozlišení. Na všechny tyče je vkládáno vysokofrekvenční střídavé napětí a současně stejnosměrné napětí, kdy na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí a na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí. Ionty přivedené do prostoru mezi tyčemi začnou vlivem vysokofrekvenčního střídavého napětí oscilovat. V určitý okamžik, pro vhodně zvolené hodnoty stejnosměrného napětí a amplitudy střídavého napětí, jsou oscilace stabilní jen pro ionty s určitou hodnotou m/z a projdou kvadrupólem na detektor. Ostatní ionty mají nestabilní oscilace a jsou zachyceny na kvadrupólových tyčích. Změnou vkládaných napětí, při zachování jejich konstantního poměru, je možné postupně propouštět všechny ionty o určitých hodnotách m/z [32,34,38–41]. Schéma kvadrupólového analyzátoři je znázorněno na Obrázku 12.



Obrázek 12 – Schéma kvadrupólového analyzátoři [42].

Jedná se vlastně o hmotnostní filtr, který využívá dva jednoduché skenovací režimy. Jedním z nich je základní sken (full scan), při kterém se skenuje celkový hmotnostní rozsah. Tento typ skenu slouží zejména ke kvalitativní analýze, kde jsou zjištěny všechny zaznamenané hodnoty m/z . Nevýhodou tohoto skenu je nízká citlivost měření. Pro zvýšení citlivosti se používá selektivní záznam iontů (SIM), kde se skenují pouze předem zvolené hodnoty m/z . Tento typ skenu se používá převážně pro kvantifikaci iontů.

Výhodou kvadrupólového analyzátoru je univerzálnost, citlivost a rychlá změna hodnot napětí vkládaných na kovové tyče, což umožňuje rychlé skenování. Nevýhodou je nízký hmotnostní rozsah. Další nevýhodou je, že na rozdíl od iontových pastí nelze provést MS/MS analýzu. Pro získání strukturních informací se provádí kolizně indukovaná disociace (CID), která probíhá ve zdroji, kde dochází k fragmentaci všech přítomných iontů, včetně nečistot [32,34,38,39].

1.7.3 Tandemové uspořádání hmotnostních analyzátorů

Tandemové uspořádání hmotnostních analyzátorů neboli tzv. tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) je metoda, při které dochází k postupné vícenásobné fragmentaci iontů. Při tandemovém uspořádání lze izolaci a fragmentaci provést v čase nebo v prostoru, v závislosti na použitém hmotnostním analyzátoru. Výsledné MS/MS spektrum těchto uspořádání obsahuje pouze fragmentové ionty vzniklé rozpadem vybraného prekurzoru, tudíž nejsou přítomné žádné nečistoty, jako je tomu u fragmentace v iontovém zdroji v případě CID [38,39,43,44].

1.7.3.1 Tandemová hmotnostní spektrometrie v čase

Analýza v čase probíhá v jednom analyzátoru na základě postupných změn určitých parametrů. Hlavními zástupci jsou iontová past, orbitrap a FT-ICR. Principem iontové pasti je přivádění iontu z iontového zdroje do pasti, kde jsou zachyceny v periodickém radiofrekvenčním elektromagnetickém poli. Izolaci prekurzoru lze provést změnou vloženého napětí, při kterém si pouze ionty prekurzoru zachovají stabilní trajektorii. Následně dochází vlivem CID aktivace k násobným srážkám stabilních iontů s přítomným inertním plynem (heliem). Vzniklé produktové ionty jsou zachyceny a postupně vypuzovány směrem k detektoru. Výhodou iontových pastí je obvykle cenová dostupnost, protože je zapotřebí pouze jediného hmotnostního analyzátoru. Další výhodou je možnost provedení vícenásobného opakování izolace a fragmentace charakteristického iontu, tzv. MSⁿ. Naopak nevýhodou iontových pastí je nízká rozlišovací schopnost a správnost měření [38,39,43,44].

1.7.3.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie v prostoru

Analýza v prostoru využívá dva a více analyzátorů seřazených za sebou. První hmotnostní analyzátor vybírá prekurzorový ion a poslední analyzátor skenuje produktové ionty vzniklé v oblasti mezi těmito analyzátoři. Typickými zástupci jsou trojitý kvadrupól (QqQ), kvadrupól s analyzátořem doby letu (QqTOF), dva analyzátoři doby letu (TOF/TOF), kvadrupól s iontovou cyklotronovou rezonancí (QqICR) a další. Nevýhodou této analýzy je omezení stupňů fragmentace každého analyzátoru, protože dochází ke ztrátám iontového proudu při průletu jednotlivými analyzátoři. Další nevýhodou je cena celého přístroje, neboť je zapotřebí použít více analyzátorů. Z tohoto důvodu se nejběžněji používají pouze dvojstupňové tandemové přístroje (MS/MS; MS²), např. trojitý kvadrupól [38,39,40,43,44].

Trojité kvadrupól se skládá ze tří kvadrupólů zapojených v sérii. V prvním kvadrupólovém analyzátoři (Q₁) dochází k izolaci požadovaného iontu prekurzoru. Vybraný ion dále putuje do druhého analyzátoři (q), který slouží jako kolizní cela. V kolizní cele dochází k energetickým srážkám (kolizím) prekurzorových iontů s molekulami neutrálního plynu (nejčastěji inertního argonu nebo dusíku) za vzniku produktových iontů, dochází tedy ke kolizně indukované disociaci. Vzniklé produktové ionty se následně analyzují a detekují ve třetím analyzátoři (Q₂). Trojitý kvadrupól se využívá především pro kvantitativní analýzu a MS/MS experimenty. Jeho výhodou je, že opakovanými srážkami iontů s kolizním plynem, sledujeme více fragmentových iontů než u MS/MS měření s iontovou pastí. Další výhodou je vysoká selektivita a citlivost měření [32,34,38,39,40,44].

1.7.3.3 Skenovací módy v tandemové hmotnostní spektrometrii

Všechny hmotnostní analyzátoři pracují v různých skenovacích módech, v závislosti na informacích, které chceme získat o analyzované látce. V tandemové hmotnostní spektrometrii se nejvíce používají čtyři typy skenovacích módů [38,43].

- a) **Sken produktových iontů (PR)** poskytuje informace o všech produktových iontech, které vznikly fragmentací specifického prekurzoru. Tento typ skenu využívají všechny analyzátoři pracující v MS/MS uspořádání, jako jsou QqQ, IT, sektorové analyzátoři a další hybridní analyzátoři. Sken PR je vhodný pro kvalitativní analýzu, při které lze získat informace o struktuře analyzované látky [38,43,44].
- b) **Sken iontů prekurzoru (PI)** poskytuje informace o všech iontech, které po kolizi vytvoří fragment se stejnou hodnotou m/z . To znamená, že Q₁ skenuje celé spektrum, zatímco Q₃ je nastaven pouze na hodnotu společných produktových iontů. Sken PI lze použít

především pro detekci vybrané funkční skupiny nebo třídy sloučenin s podobnou strukturou na základě jejich charakteristického fragmentového iontu [38,43,44].

- c) **Sken neutrálních ztrát (NL)** poskytuje informace o všech iontech, které se zmenší o stejnou hodnotu m/z neutrální molekuly (např. ztráta molekuly vody). V tomto případě skenují oba analyzátoři s konstantním rozdílem $\Delta m/z$. Většinou se zde detekují látky se stejnou funkční skupinou [38,43,44].
- d) **Sken jedné iontové reakce (SRM)** nebo **více iontových reakcí (MRM)** patří mezi vysoce citlivou a specifickou techniku hmotnostní spektrometrie, která se nejběžněji používá pro kvantitativní stanovení analyzovaných látek v komplexních směsích. Tato technika se využívá zejména u QqQ. Pro využití tohoto skenu je důležité, aby oba separační analyzátoři byly v určitém časovém úseku konstantní. V Q_1 se nejprve vybere předem známá hodnota m/z prekurzoru odpovídající příslušné sloučenině. Tento prekurzor se následně podrobí kolizi v dalším q za vzniku fragmentů. Ze vzniklých fragmentů se v Q_3 izoluje produktový ion o dané hodnotě m/z , který je určen pro kvantifikaci. Pro výrazné zlepšení citlivosti a selektivity je zapotřebí tuto techniku vhodným způsobem optimalizovat, v závislosti na typu přístroje. Optimalizuje se především volba prekurzorových a produktových iontů, skenovací rychlost, hodnota kolizní energie, teplota a průtok sušícího plynu nebo urychlující napětí [38,43].

1.7.4 Detektory

Poslední částí hmotnostního spektrometru jsou detektory, které slouží k detekci dopadajících iontů, neboli k určení jejich relativní intenzity. Detektory lze rozdělit do dvou základních skupin podle záznamu iontů. První skupinou jsou detektory, které detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem iontů (Faradayova klec). Výsledný indukovaný proud je následně zesílen a zaznamenán. Druhou skupinou tvoří násobičové detektory, které využívají efekt násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů na detektor. Tímto násobením se získá silnější měřitelný signál pro jednotlivé ionty. Typickými zástupci jsou elektronové násobiče a fotonásobiče [32,38,40].

1.8 Spojení HPLC/MS

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem je v současnosti nejpoužívanější analytickou metodou, jejíž aplikovatelnost je velmi široká. Výhodou spojení je možnost současně separovat a identifikovat složitější směsi látek, přičemž se využívá vysoké účinnosti separace a selektivity HPLC techniky a citlivosti hmotnostního spektrometru [23,24,32,38].

Spojení HPLC/MS je technicky náročnější než spojení plynové chromatografie a hmotnostního spektrometru (GC/MS), jelikož se do systému přivádí místo plynu kapalina, kterou je těžší odstranit [38]. Proto byly pro spojení HPLC/MS vyvinuty ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku, ESI a APCI, kdy se mobilní fáze přímo účastní ionizačního procesu. ESI technika se používá především pro silně polární látky, APCI pro méně polární látky a pro nepolární látky se běžně používá APPI [32]. Hmotnostním analyzátozem bývá trojitý kvadrupól, iontová past nebo průletový analyzátor [32,45]. Důležitý je také výběr mobilní fáze, která má vliv na tvorbu iontů. Jako mobilní fáze se často používá methanol/voda, acetonitril/voda nebo kombinace obou organických rozpouštědel methanol/acetonitril/voda. Veškerá aditiva do mobilní fáze musí být těkavá a měla by se přidat v co nejnižší koncentraci, aby nedošlo k potlačení intenzity signálu. Z kyselin se nejčastěji používají kyseliny, mravenčí, octová či trifluorooctová, z pufrů to jsou mravenčan amonný nebo octan amonný [45].

Využitím této techniky lze získat několik různých záznamů, jako je chromatogram celkového iontového proudu (TIC), rekonstruovaný iontový chromatogram (RIC) nebo hmotnostní spektrum jednotlivých látek. Získaná spektra jsou jednoduchá a jsou pozorovány zpravidla ionty se sudým počtem elektronů. Při snímání kladných iontů jsou to většinou protonované molekuly či adukty se sodnými, draselnými nebo amonnými ionty a při snímání záporných iontů to jsou většinou deprotonované molekuly. Nevýhodou hmotnostního spektra získaného HPLC/MS technik je manuální interpretace, která závisí na zkušenosti operátora a dostupnosti literatury, protože většina hmotnostních spekter analyzovaných látek nemá své knihovny [32,38].

Metoda HPLC/MS, respektive HPLC/MS/MS, se využívá pro vysoce selektivní ultrastopovou kvantitativní analýzu komplexních maticí, zejména v potravinářství, farmacii, toxikologii nebo ekologii. Pomocí této techniky je možné analyzovat především netěkavé polární látky s velmi složitou strukturou, např. námi studované fenolické sloučeniny vyskytující se v amarantovém zrně [23,32].

1.9 Analýza amarantových zrn

1.9.1 Úprava a extrakce vzorku

Úprava vzorku je nejdůležitějším prvotním krokem před analýzou jednotlivých fenolických sloučenin. Z tohoto důvodu se musí vybrat vhodný postup úpravy, při kterém nedochází k velké degradaci analyzovaných fenolických látek. Dále je zapotřebí zvolit vhodnou extrakci a rozpouštědlo, které zaručí co nejvyšší možnou účinnost separace sledovaných látek z matrice.

Pro analýzu fenolických látek se používají různé části amarantu, jako jsou semena [4,5,46–60], listy [48,51,61–63] nebo klíčky [4,5,46,59]. Před samotnou analýzou musí být rostlinný materiál upraven. Zrna amarantu je nutné rozemlít na jemný prášek, který se poté homogenizuje prosetím přes síto [51,53,58]. Dalším krokem je odstranění tuků a jiných lipofilních látek, nejčastěji extrakcí hexanem [23,47,48,50,52,62]. Nutné je také odstranit některé interferující organické látky pomocí metody SPE, čímž dojde k přečištění biologického materiálu, a tedy i ke zvýšení koncentrace cílového analytu [23,45]. Po vhodné úpravě často následuje sušení vzorku ve vakuové peci [51,59] nebo se vzorky suší pod dusíkem [52], čímž se zabrání oxidaci fenolických látek. Vysušené vzorky se použijí k následné extrakci nebo se mohou skladovat za nepřístupu světla při teplotě 4–5 °C [52,59].

Po úpravě vzorků amarantových zrn se provádí extrakce volných fenolických látek vhodným rozpouštědlem. Čistá organická rozpouštědla nelze použít pro extrakci velmi polárních fenolických kyselin [23], proto se používají jejich vodné roztoky. Obvykle to bývají vodné roztoky ethanolu [46–48,50,51], methanolu [5,46–49,51–55,59–64], acetonu [46,60,62] nebo ethylacetátu [23,61]. Často se také k vodně-organickému rozpouštědлу přidává slabá organická kyselina (kyselina octová) [46,63] nebo zředěná silná kyselina (kyselina chlorovodíková) [23,46,52,59,60,62]. Okyselením extraktu dojde ke zvýšení extrakční účinnosti, protože se zabrání nežádoucí ionizaci fenolických látek. Po extrakci je směs práškového vzorku a rozpouštědla oddělena pomocí centrifugy [23,46,49,50]. Rozpouštědlo je následně odděleno a vysušeno odfoukáním pomocí dusíku [23]. Dále je možné rozpouštědlo odpařit ve vakuové peci [47,51,59,61], kde se musí zvolit taková teplota, při které nedochází k degradaci fenolických látek. Vysušené extrakty se poté skladují v chladu při teplotě –20 °C až do analýzy [5,46,50,53,61].

Extrakce vázaných fenolických sloučenin je složitější než extrakce volných sloučenin. Pro uvolnění vázaných fenolických sloučenin z buněčné stěny se nejprve musí provést

alkalická [10,23,50,57] či kyselá hydrolýza [10,14,23]. Častěji se však používá alkalická hydrolýza nebo kombinace obou hydrolýz. Při alkalické hydrolýze se používá NaOH o různých koncentracích. Jelikož se pracuje ve velmi silném zásaditém prostředí, je nutné ke vzorku přidat kyselinu askorbovou a EDTA, čímž se zabrání degradaci některých fenolických látek [54]. Alkalická hydrolýza obvykle probíhá po dobu několika hodin při laboratorní teplotě. Důležité je také dokonalé promísení reakční směsi, kterého se docílí použitím laboratorní třepačky nebo magnetického míchadla [10,23,50,51,54]. Po ukončení reakční doby se obvykle směs okyseluje kyselinou chlorovodíkovou, čímž se podpoří následná extrakce fenolických látek [50,54]. Metoda kyselé hydrolýzy využívá pro uvolnění látek z vazeb anorganickou kyselinu, nejčastěji HCl za velmi vysoké teploty (např. 85 °C) [10,23,52,54]. Pokud se hydrolýza provádí nad teplotou varu, musí se vařit pod zpětným chladičem ve vodných nebo alkoholových rozpouštědlech (např. methanol) [23]. Reakční doba se obvykle pohybuje v rozmezí od 30 minut [23,54] do 1 hodiny [23]. Uvolněné fenolické sloučeniny se po obou hydrolýzách běžně extrahují ethylacetátem [50] nebo diethyletherem [54]. Konečné extrakty se nakonec suší pod argonem [23] nebo častěji dusíkem [50,57], aby se odstranilo přebytečné rozpouštědlo, a poté se skladují v chladu až do analýzy.

1.9.2 Stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC/MS metody

Získané extrakty se běžně rozpouštějí ve vodném roztoku organického rozpouštědla, např. methanolu. Methanолоvé extrakty je dále možné přecistit přes PTFE (polytetrafluoroethylen) filtry a následně použít k HPLC analýze [5,10,23,47,48,53,58,59,63].

Pro analýzu fenolických sloučenin obsažených v získaných extraktech se běžně používá RP-HPLC. Protože jsou ve vzorku obsaženy látky lišící se svou polaritou, a tedy i svou retencí, je nutné separaci provádět s využitím gradientové eluce. Často se jedná o velmi složité směsi látek, proto je výsledný gradientový profil eluce složen z několika gradientových kroků s různou strmostí gradientu a někdy bývá kombinován i s isokratickou elucí [5,14,46–49,54,57,58,62].

Výhodou HPLC techniky je možnost širokého výběru chromatografických kolon, které se liší stacionární fází. Jako stacionární fáze se nejčastěji používá chemicky modifikovaný oktadecyl silikagel [14,47–49,54,57,62]. Mobilní fází je obvykle binární směs rozpouštědel, která je složena z vodné a organické fáze, jako je methanol/voda [14,57] nebo acetonitril/voda [5,46,48,49,54,57–59,62–64]. Pro zabránění ionizace fenolických kyselin [24] se vodná část mobilní fáze běžně okyseluje na pH = 2–4 pomocí kyseliny

mravenčí [14,59], octové [5,14,47,59,62,63], fosforečné [49,54] nebo kyseliny trifluorocetové [48,57,64]. Separace obvykle probíhá při laboratorní teplotě [48,64] nebo při zvýšených teplotách, např. 30 °C [49,58,63], 35 °C [54,59,63] nebo 40 °C [46].

Pro detekci fenolických sloučenin se běžně používají spektrofotometrické detektory, jako je detektor s diodovým polem (DAD) [14,48,49,54,57,64], dále hmotnostní spektrometr (MS) [57,58,62,64] nebo jejich kombinace [59]. Výhody spojení HPLC/MS již byly zmíněné, a proto se toto spojení stalo standardní metodou pro identifikaci a charakterizaci fenolických sloučenin [62,63]. Z ionizačních technik se nejčastěji využívá ionizace ESI [58,59,62,63] a z analyzátorů je nejvíce používán trojitý kvadrupól [58,59], který vyniká svou citlivostí v případě kvantitativní analýzy.

Přítomnost jednotlivých fenolických sloučenin v rostlinných extraktech se identifikuje porovnáním retenčních časů, UV spektra nebo hmotnostního záznamu se standardními sloučeninami [58,59,62].

1.9.3 Stanovení antioxidační aktivity a celkového množství fenolických látek

Pro stanovení antioxidační aktivity fenolických látek se využívá několik spektrofotometrických metod. Mezi nejběžněji používané metody patří ABTS a DPPH [16]. Při ABTS metodě dochází vlivem působení přítomných fenolických látek ke zhašení radikálového kationtu $ABTS^{+}$, který se generuje oxidací s $K_2S_2O_8$ [16,52,56]. Výsledkem eliminace $ABTS^{+}$ je odbarvení původně modrozeleného roztoku, čímž dojde k poklesu absorbance, který se spektrofotometricky měří při 734 nm [48,52,60,61,64]. Vzhledem k tomu, že se sleduje úbytek látky, je možné použít i HPLC metodu, při které se sleduje plocha pásu odpovídající radikálovému kationtu [16]. Tato metoda je velmi jednoduchá, rychlá a má široké uplatnění, od stanovení TAA látek různého původu až po směsné vzorky. Metoda ABTS poskytuje velmi spolehlivé výsledky, protože reaguje se všemi přítomnými fenolickými látkami, hydrofilní i lipofilní povahy. Na rozdíl od metod DPPH, ORAC a FRAP bývá také citlivější a přesnější [16,21]. Podobný způsob měření využívá i metoda DPPH, kde se spektrofotometricky nebo HPLC metodou sleduje snížení koncentrace DPPH $^{\bullet}$. Spektrofotometrické měření úbytku absorbance většinou probíhá při vlnových délkách 514 nm [60], 515 nm [54] nebo 517 nm [48,52,55,64]. Metoda DPPH bývá jednoduchá, spolehlivá a velice rychlá, proto se běžně používá jako předběžný test určený pro posouzení TAA rostlinných extraktů [21,52]. Její hlavní výhodou je také reaktivita radikálu DPPH $^{\bullet}$ se slabými antioxidanty. Novým způsobem analýzy TAA je metoda ORAC, která je založená na eliminaci peroxylových radikálů. Tato metoda využívá k detekci fluorescenční sondu,

kteřá sleduje úbytek fluorescenčního signálu při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 520 nm [53,59]. Jako fluorescenční sonda se obvykle používá fluorescein, díky němuž je metoda citlivější. Méně často využívanou metodou je metoda FRAP, která je založená na redukci Fe^{3+} -TPTZ komplexu. Výsledkem je nárůst absorpance odpovídající množství vzniklého modře zbarveného komplexu Fe^{2+} -TPTZ, který je měřitelný při vlnové délce 593 nm [48,60,64]. Výsledné hodnoty získané metodou FRAP, bývají nižší než u předchozích metod, protože se zde nestanovuje antioxidační aktivita látek, ale pouze jejich redukční vlastnosti. Jelikož nezachycuje pomalu reagující antioxidanty, bývá tato metoda často nepřesná. Vzhledem k tomu, že má každá metoda odlišné výsledky, je nutné použít při stanovení TAA více než jednu metodu. Pro přesnost měření je také nutné porovnat výsledné hodnoty těchto metod se standardními sloučeninami, jako je Trolox [21].

Pro stanovení celkového množství fenolických sloučenin se běžně používá metoda s Folin–Ciocalteuovým činidlem. Pro dosažení reakce je nutné, aby činidlo bylo v alkalickém prostředí. Jako alkalické činidlo se používá vodný roztok Na_2CO_3 o koncentraci 7,5 % [59], 14 % [54] nebo 20 % [49]. Reakcí dochází k nárůstu absorpance, který je spektrofotometricky monitorován při vlnové délce 720 nm [54], 725 nm [48,64], 735 nm [5], 739 nm [59], 750 nm [21] nebo 765 nm [49,52]. Obsah fenolických látek je vyjadřován jako ekvivalentní množství kyseliny gallové (GAE). Tato metoda však může být ovlivněna nefenolickými molekulami, které mohou činidlo redukovat. Z tohoto důvodu mohou být výsledné hodnoty zkreslené [29,53,59,61].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

Pro přípravu vzorků a standardů byly použity digitální váhy Sartorius ED 224 S-OCE (Sartalex, Ústí nad Labem), mikropipety Biohit-Proline (Biohit, Finsko) s nastavitelným objemem a běžné laboratorní nádobí. Vzorek amarantových zrn byl rozemlet pomocí nožového mlýnu GRINDOMIX GM 200 (Retsch, Česká republika) a zhomogenizován prosetím přes síto o velikosti pórů 0,5 mm. K extrakci rostlinných vzorků byla použita laboratorní třepačka REAX 2 (Heidolph, Německo), ultrazvuková vana K-12LE (Kraintek, Česká republika) a centrifuga Universal 320 (Hettich, Německo). Vzorky byly odpařeny pod dusíkem s využitím termostatované sušicí vany Digital Dry Bath (Miulab, Čína). Dále byl použit pH-metr (Methrom 827, Švýcarsko) a magnetické míchadlo s ohřevem MR 2002 (Heidolph, Německo). Pro přečištění vzorků byly použity PTFE filtry o velikosti pórů 0,45 μm (Labicom, Česká republika) a injekční stříkačky (3 ml).

Jednotlivé fenolické sloučeniny byly analyzovány pomocí HPLC/MS systému s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (AB SCIEX, Framingham USA), kde byla použita kolona Ascentis Express C18 plněná povrchově porézními částicemi (délka 150 mm, průměr 3,0 mm, zrnitost 2,7 μm , Supelco, Belfonte, USA). Kapalinový chromatograf dále obsahoval:

- 2 čerpadla mobilní fáze LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japonsko; vysokotlaký gradient)
- směšovač mobilní fáze (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- autosampler SIL-20A (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)
- termostat kolony LCO 102 single (Ecom, Praha)

Měření antioxidační aktivity a celkového množství fenolických sloučenin bylo provedeno pomocí UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2450 (Kyoto, Japonsko) s využitím kyvety S/G10 optické délky 10 mm (Fisher Scientific, Německo).

2.2 Použité chemikálie

2.2.1 Chemikálie

Pro odstranění lipofilních látek byl použit 95% n-hexan (Lab-Scan, Polsko). K extrakci a přípravě vzorků byl použit $\geq 99,9\%$ methanol čistoty pro HPLC/MS (Sigma Aldrich, USA), aceton, p.a. (Lach-Ner, Neratovice), diethylether, p.a., a ethylacetát, p.a. (oba PENTA, Česká

republika). Pro alkalickou hydrolýzu byl použit hydroxid sodný, p.a. (PENTA, Česká republika), kyselina ethylendiaminotetraoctová, p.a., a 99% kyselina L-askorbová (obě Sigma Aldrich, USA). Ke kyselé hydrolýze a úpravě pH byla využita 35% kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Neratovice). Na přípravu mobilní fáze byl použit $\geq 99,9$ % acetonitril čistoty pro HPLC/MS (Sigma Aldrich, USA) a deionizovaná voda připravená pomocí zařízení Mili-Q (Merck, Německo). Aditivem vodné mobilní fáze byla 98% kyselina mravenčí, HPLC/MS čistoty (Sigma Aldrich, USA). Ke stanovení antioxidační aktivity byla použita ABTS diamoniiová sůl (Sigma Aldrich, USA), peroxodisíran draselný (Laborchemie Apoldo, Německo), trihydrát octanu sodného (PENTA, Česká republika) a 99,8 % kyselina octová (PENTA, Česká republika). K určení celkového množství fenolických sloučenin bylo použito 2M Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich, USA) a uhličitan sodný, p.a. (Lach-Ner, Neratovice).

2.2.2 Vzorek

Pro experimentální část diplomové práce byl použit vzorek 100% amarantového zrna (Zdraví z přírody, Indie), který je zobrazen na Obrázku 13.



Obrázek 13 – Vzorek amarantového zrna.

2.2.3 Standardy

Ke stanovení antioxidační aktivity byla použita standardní látka Trolox, 97 % (Sigma Aldrich, USA). K určení celkového množství fenolických sloučen byla použita 98% kyselina gallová (Sigma Aldrich, USA). Pro identifikaci fenolických látek obsažených ve vzorcích amarantových zrn byly použity standardní látky uvedené v Tabulce 7.

Tabulka 7 – Standardní látky fenolických kyselin a flavonoidů (vše Sigma Aldrich, USA).

Značení	Standardní látka	Sumární vzorec	Molární hmotnost [g/mol]	[M-H] ⁻
1	Vanilová kyselina	C ₈ H ₈ O ₄	168,14	167,14
2	Káвовá kyselina	C ₉ H ₈ O ₄	180,16	179,16
3	Ferulová kyselina	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	193,18
4	<i>p</i> -kumarová kyselina	C ₉ H ₈ O ₃	164,05	163,05
5	4-hydroxybenzoová kyselina	C ₇ H ₆ O ₃	138,12	137,12
6	3,4-dihydroxybenzoová kyselina	C ₇ H ₆ O ₄	154,12	153,12
7	Salicylová kyselina	C ₇ H ₆ O ₃	138,12	137,12
8	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,52	609,52
9	Kvercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,24	301,24
10	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,23	285,23
11	Myricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318,24	317,24
12	Isokvercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,38	463,38

2.3 Pracovní postup

2.3.1 Příprava vzorku

Amarantová zrna byla rozemleta a zhomogenizována prosetím přes síto s velikostí pórů 0,5 mm. Na analytických vahách byly naváženy 2 g rozemletého vzorku, které byly převedeny do plastové centrifugační zkumavky. K naváženému množství bylo přidáno 15 ml hexanu a směs byla třepána 15 minut pomocí laboratorní třepačky. Poté byla kapalná fáze, do které se vyextrahovaly lipofilní látky, odstraněna a extrakce opakována. Celkem byla extrakce hexanem provedena třikrát. Odtučněné vzorky byly poté vysušeny pod dusíkem.

2.3.2 Alkalická hydrolýza a extrakce vázaných fenolických látek

Vzorky amarantových zrn byly hydrolyzovány podle postupu, který byl převzat z práce [65]. K upravenému vysušenému vzorku bylo přidáno 15 ml 4M NaOH (16 g/100 ml), 87,6 mg EDTA a 300 mg kyseliny askorbové. Reakční směs byla umístěna do třepačky, kde byla promíchávána po dobu 4 hodin při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby byla směs vyjmuta z laboratorní třepačky, okyselena pomocí 35% HCl na pH 2 a extrahována 20 ml směsí diethyletheru a ethylacetátu v poměru 1:1 (v/v) po dobu 15 minut. Extrakce byla provedena třikrát. Vrchní organická vrstva byla oddělena a vysušena pod dusíkem. Odparek byl uchováván v lednici až do analýzy.

2.3.3 Kyselá hydrolýza a extrakce vázaných fenolických látek

Vzorky amarantových zrn byly hydrolyzovány podle postupu, který byl převzat z práce [65]. K upravenému vysušenému vzorku bylo přidáno 15 ml předem připravené 1M HCl (1,75 ml/20 ml) a směs byla umístěna do vodní lázně o teplotě 90 °C, kde byla ponechána po dobu 45 minut. Po uplynutí reakční doby byla směs vyjmuta z vodní lázně a ponechána v klidu při laboratorní teplotě. Vychlazená směs byla poté extrahována 20 ml extrakční směsí diethyletheru a ethylacetátu v poměru 1:1 (v/v) po dobu 15 minut. Extrakce byla provedena třikrát. Vrchní organická vrstva byla oddělena a vysušena pod dusíkem. Odparek byl uchováván v lednici až do analýzy.

2.3.4 Extrakce volných fenolických látek

Po odstranění lipofilních látek a vysušení vzorku amarantových zrn bylo provedeno několik typů extrakce volných fenolických látek pomocí 20 ml organického extrakčního

činidla (Tabulka 8). V případě přídavku HCOOH bylo přidáno 100 μ l 98% kyseliny, tzn. 0,5% (v/v). Jednotlivé kapalné extrakty byly odděleny od pevného vzorku pomocí centrifugy (5 minut, 5000 rpm). Extrakce byla provedena celkem třikrát a kapalné fáze byly převedeny do centrifugační zkumavky. Rozpouštědlo bylo odpařeno pod dusíkem a odparky byly uchovávány v lednici až do analýzy. Každý extrakt byl pro porovnání připraven dvakrát.

Tabulka 8 – Souhrn jednotlivých provedených extrakcí.

Značení	Extrakční činidlo		Způsob a doba extrakce	Extrakční činidlo	
	I			II	Způsob a doba extrakce
E1	70% methanol + HCOOH		25 minut třepání	–	–
E2	80% methanol		25 minut třepání	–	–
E3	80% methanol + HCOOH		25 minut třepání	–	–
E4	80% methanol + HCOOH		25 minut v ultrazvukové lázni	–	–
E5	70% aceton		25 minut třepání	–	–
E6	70% aceton + HCOOH		25 minut třepání	–	–
E7	70% aceton + HCOOH		25 minut v ultrazvukové lázni	–	–
E8	70% aceton		25 minut třepání	diethylether a ethylacetát (1:1)	15 minut třepání
E9	70% aceton + HCOOH		25 minut třepání	diethylether a ethylacetát (1:1)	15 minut třepání
E10	70% aceton + HCOOH		25 minut v ultrazvukové lázni	diethylether a ethylacetát (1:1)	15 minut třepání

2.3.5 Postupná extrakce volných a vázaných fenolických látek

Byla provedena postupná extrakce sledovaných látek dle postupu převzatého z práce [65], která zahrnovala alkalickou a kyselou hydrolyzu. V prvním kroku byly odtučněné vzorky extrahovány 20 ml 70% (v/v) acetonu, ke kterému bylo přidáno 100 μ l kyseliny mravenčí. Tato extrakce byla provedena třikrát v laboratorní třepačce po dobu 25 minut. Vodná část všech tří podílů byla převedena do skleněné lahve a okyselená koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou na pH 2, čímž byla podpořena následná extrakce pomocí 20 ml směsi diethyletheru a ethylacetátu (1:1). Extrakce touto extrakční směsí byla provedena v laboratorní třepačce po dobu 15 minut. Vzniklá organická vrstva byla oddělena a převedena do centrifugační zkumavky. Vodný podíl byl dále podroben alkalické hydrolyze a extrakci (viz kapitola 2.3.2). Posledním krokem byla kyselá hydrolyza vodného podílu vzniklého z předchozího kroku a její následná extrakce (viz kapitola 2.3.3). Zbylý podíl pevného vzorku (po extrakci 70% acetonem) byl hydrolyzován a extrahován stejným způsobem jako u předchozí alkalické hydrolyzy. Všechny jednotlivé extrakce byly provedeny třikrát. Získané extrakty pak byly převedeny do centrifugačních zkumavek a sušeny pod proudem dusíku. Odparky byly uchovávány v lednici až do analýzy.

2.3.6 HPLC/MS/MS analýza amarantového zrna

2.3.6.1 Příprava vzorku

Předem vysušené extrakty vzorků byly rozpuštěny ve 4 ml 50% methanolu. Extrakty byly umístěny do ultrazvukové vany, aby došlo k úplné homogenizaci extraktu a rozpouštění. Methanolvý extrakt byl umístěn do centrifugy a kapalná fáze byla zfiltrována pomocí stříkačkových filtrů PTFE 0,45 μ m. Nakonec byl extrakt zředěn 50% (v/v) methanolem ve vodě v poměru 1:1 (v/v).

2.3.6.2 Příprava standardů

Standardy sloužící k identifikaci jednotlivých látek byly naváženy a rozpuštěny v methanolu tak, aby jejich koncentrace byla 1 g/l.

2.3.6.3 Příprava mobilní fáze

Vodnou mobilní fází (MF-A) byl 0,3% vodný roztok kyseliny mravenčí (pH 2,43), který byl připraven smícháním deionizované vody a 98% kyseliny mravenčí (HPLC/MS čistoty). Organickou mobilní fází (MF-B) byl čistý 100% acetonitril určený pro HPLC/MS analýzu.

2.3.6.4 Optimalizované podmínky analýzy

Separace a následná identifikace fenolických látek byla provedena pomocí RP-HPLC ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Před samotnou analýzou bylo provedeno promytí kolony mobilní fází po dobu 10 minut. Separace fenolických látek byla provedena gradientovou elucí (Tabulka 9) při teplotě kolony 40 °C a průtoku mobilní fáze 0,4 ml/min. Všechny vzorky a standardy byly dávkovány v objemu 2 µl.

Tabulka 9 – Optimalizovaný gradient.

Čas [min]	MF-B [%]
0	10
6	37
7	100
9	10

K identifikaci byl použit hmotnostní spektrometr Q-TRAP pracující při snímání záporných iontů. Iontovým zdrojem byl elektrosprej (ESI) a analyzátozem byl trojitý kvadrupól (QqQ). Pro kvantitativní analýzu jednotlivých fenolických látek v připravených extraktech byly optimalizovány jednotlivé parametry pro využití MRM (multiple reaction monitoring) analýzy. U komerčně dostupných standardů byly jednotlivé parametry optimalizovány pomocí přímé infúze (viz Tabulka 7). U látek, které nebyly komerčně dostupné, byly jednotlivé parametry optimalizovány postupně pomocí HPLC/MS analýzy.

Hmotnostní spektrometr při přímé infúzi pracoval za následujících podmínek: průtok: 5–10 µl/min; ESI⁻; „curtain gas“ (CUR): 10 psi; collision gas: medium; napětí na kapiláře iontového zdroje (ion spray voltage, IS): -4 500 V; teplota zmlžujícího plynu (drying temperature, TEM): 0 °C; tlak zmlžujícího plynu (nebulizing gas pressure, GS1): 20 psi; tlak sušícího plynu (drying gas pressure, GS2): 0 psi; vstupní potenciál (entrance potential, EP): -10 V; deklasterační potenciál (declustering potential, DP): v závislosti na sloučenině.

Při HPLC/MS analýze se pracovalo za následujících podmínek: průtok: 0,4 ml/min; ESI⁻; „curtain gas“ (CUR): 10 psi; collision gas: medium; napětí na kapiláře iontového zdroje (ion spray voltage, IS): -4 500 V; teplota zmlžujícího plynu (drying temperature, TEM): 400 °C; tlak zmlžujícího plynu (nebulizing gas pressure, GS1): 40 psi; tlak sušícího plynu (drying gas pressure, GS2): 50 psi; vstupní potenciál (entrance potential, EP): -10 V; parametry MRM přechodů: deklasterační potenciál (declustering potential, DP), kolizní energie (collision energy, CE) a výstupní potenciál kolizní cely (collision cell exit potential, CXP) jsou uvedeny ve výsledkové a diskuzní části (Tabulka 10).

2.3.7 Měření antioxidační aktivity

2.3.7.1 Příprava roztoků standardních látek

Pro určení antioxidační aktivity fenolických látek amarantových zrn byl připraven zásobní roztok standardu Troloxu o koncentraci 0,01 mol/l (0,0626 g/25 ml), který byl rozpuštěn v 50% (v/v) methanolu. K určení celkového množství fenolických sloučenin byl připraven zásobní roztok standardu kyseliny gallové o koncentraci 3 g/l. Z každého zásobního roztoku standardních látek pak byly připraveny kalibrační roztoky o různých koncentracích.

2.3.7.2 Metoda ABTS

Nejprve byl připraven zásobní roztok ABTS rozpuštěním 10 mg ABTS diazoniové soli (1 tableta) v 5 ml deionizované vody ($c = 3,6$ mmol/l), ke kterému bylo přidáno 100 μ l roztoku $K_2S_2O_8$ o koncentraci 0,064 mol/l. Takto připravený modrozelený roztok byl ponechán v chladu po dobu 12–16 hodin. Dále byl připraven acetátový pufr smícháním se 4,66 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ a 170 ml deionizované vody, který byl následně okyselen 99,8% kyselinou octovou na pH 4,3. Pro měření TAA byl poté zásobní roztok ABTS zředěn acetátovým pufrem tak, aby jeho absorbance byla cca 0,8. Ke 3 ml tohoto zředěného pracovního roztoku bylo přidáno 100 μ l extraktu vzorku. Reakční směs byla promíchána a inkubována ve tmě po dobu 60 minut. Po uplynutí reakční doby byl změřen pokles absorbance při vlnové délce 734 nm proti slepému pokusu, kdy byl k reakční směsi ABTS přidán 50% (v/v) methanol. Každý vzorek byl změřen pětkrát. Pokles absorbance byl vyjádřen v procentech a pomocí kalibrační křivky byl přepočítán na ekvivalentní množství Troloxu. Pro získání kalibrační křivky byly připraveny kalibrační roztoky standardu Troloxu o různých koncentracích, které byly dávkovány a měřeny stejným způsobem jako jednotlivé extrakty.

2.3.7.3 Stanovení celkového množství fenolických látek

Pro stanovení celkového množství fenolických látek amarantových zrn byl připraven pracovní roztok smícháním 2M Folin-Ciocalteuového činidla s deionizovanou vodou v poměru 1:20 (v/v). Ke 2 ml pracovního roztoku bylo přidáno 100 µl extraktu vzorku. Směs byla promíchána a umístěna na 5 minut do prostředí bez přístupu světla. Po této době byl k reakční směsi přidán 1 ml 7,5% roztoku Na₂CO₃. Reakční směs byla opět ponechána v klidu bez přístupu světla po dobu 30 minut. Po reakční době byl změřen nárůst absorbance při vlnové délce 750 nm proti slepému vzorku (stejný objem 50% (v/v) methanolu). Každý vzorek byl změřen pětkrát. Pomocí kalibrační křivky byl přepočítán nárůst absorbance na ekvivalentní množství kyseliny gallové. Pro získání kalibrační křivky byly připraveny kalibrační roztoky standardu kyseliny gallové o různých koncentracích, které byly dávkovány a měřeny stejným způsobem jako jednotlivé extrakty.

2.3.8 Statistické zpracování experimentálních dat

Naměřená data byla zpracována pomocí programu Analyst 1.6.2. a následně vyhodnocena v programu Microsoft Office Excel 2016. Pomocí statistického programu QC Expert byly vyhodnoceny rovnice regrese kalibračních křivek. Pro odstranění vlivných bodů byl použit Pregibonův, Williamsův, McCulloh-Meterův a L-R graf. Dále byla testována významnost regresních parametrů pomocí Studentova t-testu.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace extrakce

Bylo provedeno několik typů extrakce volných fenolických látek s využitím 70% (v/v) acetonu [46,65] a 80% (v/v) methanolu [48,64]. Z literatury bylo zjištěno, že extrakci fenolických látek podporuje okyselení roztoku pomocí slabé organické kyseliny nebo zředěné silné kyseliny [52]. Jelikož se v HPLC/MS technice používá okyselená mobilní fáze 98% kyselinou mravenčí, byla tato slabá kyselina využita i pro okyselení extrakčního rozpouštědla a to v koncentraci 0,5% (v/v). Jednotlivé extrakce byly provedeny v laboratorní třepačce či za pomoci ultrazvuku, po odpaření extrakčního rozpouštědla byl odparek rozpuštěn v 50% methanolu a poté proměřen optimalizovanou HPLC/MS metodou. Z výsledných chromatografických záznamů bylo zjištěno, že nejvyšší množství přítomných fenolických látek vykazoval 80% methanol a nejnižší množství látek bylo získáno extrakcí 70% acetonem. V dalších postupech bylo ověřeno, že přidavek kyseliny mravenčí pozitivně ovlivňuje extrakci fenolických látek, především fenolických kyselin. Dále byla testována dvojitá extrakce volných fenolických látek kdy v druhém kroku po extrakci 80% methanolem a 70% acetonem byla přidána směs diethyletheru a ethylacetátu v poměru 1:1 (v/v). Tento poměr byl převzat z diplomové práce [66], ve které bylo zjištěno, že tato směs organických rozpouštědel vykazuje vyšší účinnost extrakce než při využití pouze čistého diethyletheru nebo ethylacetátu. Vzhledem k tomu, že v případě 80% methanolu nedošlo k tvorbě fázového rozhraní, byl pro testování účinnosti tohoto extrakčního postupu použit pouze extrakt se 70% acetonem, kdy k tvorbě fázového rozhraní došlo. Dále byl porovnáván obsah fenolických látek v extraktech provedených pouhým třepáním nebo podpořené ultrazvukem. Obě extrakce byly provedeny stejnou dobu, 25 minut. Delší doba extrakce nebyla u extrakce ultrazvukem možná z důvodu zahřívání roztoku, které by mohlo způsobit degradaci některých fenolických látek. V neposlední řadě byl pro porovnání vybrán 70% methanol s přidavkem kyseliny mravenčí. Všechny provedené extrakce jsou uvedeny v experimentální části v Tabulce 8.

Kromě analýzy volných fenolických látek byla provedena kyselá a alkalická hydrolýza pro uvolnění konjugovaných a vázaných fenolických látek. Závěrem byla provedena postupná extrakce, která v postupu zahrnovala extrakci volných fenolických látek spolu s kyselou a alkalickou hydrolýzou. Tento postup byl převzat z práce [65], kde byl použit na vzorky ječmene.

3.2 Identifikace fenolických látek v extraktech amarantových zrn

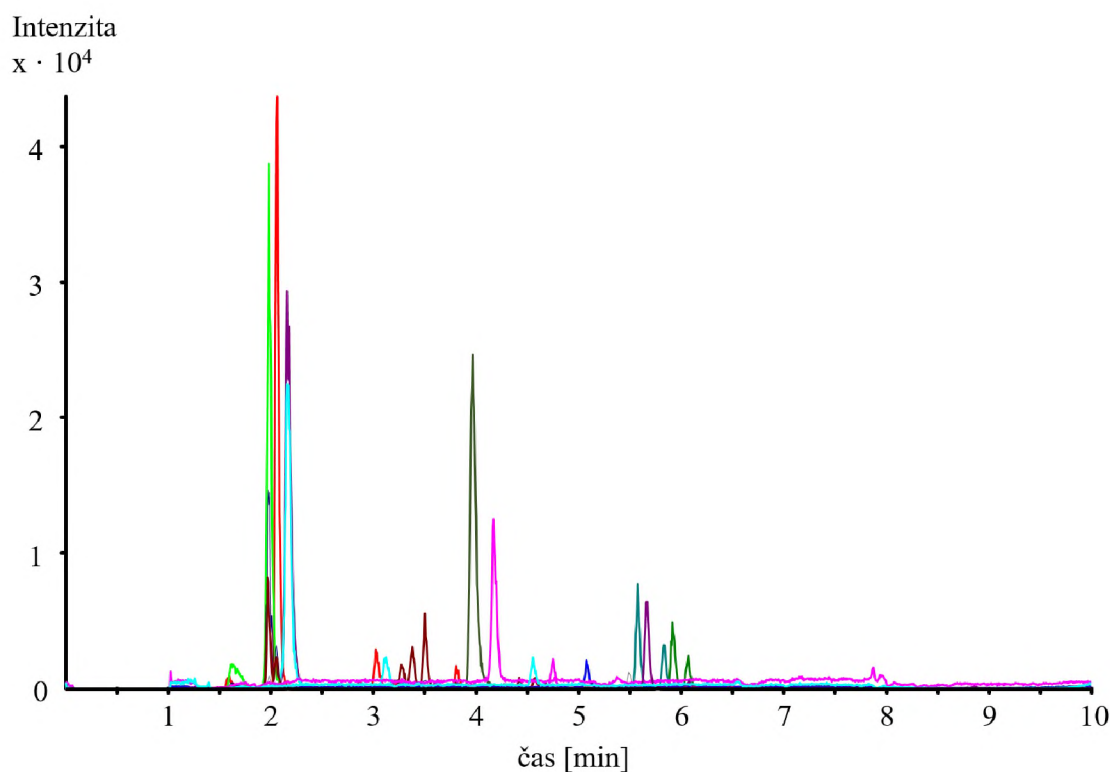
Identifikace fenolických látek obsažených v různých extraktech amarantového zrna byla provedena pomocí RP-HPLC ve spojení s hmotnostním spektrometrem vybaveném elektrosprejovou ionizací a trojitým kvadrupólem jako analyzátozem. Nejprve byly provedeny analýzy v režimu „full sken“, kde byly zaznamenány všechny ionty v daném hmotnostním rozsahu, a to jak při snímání záporných, tak kladných iontů. Pro získání dalších strukturních informací byla provedena tandemová hmotnostní spektrometrie. Z výsledných MS spekter byly určeny molekulární ionty (deprotonované, $[M-H]^-$, a protonované, $[M+H]^+$, molekuly) a ze získaných MS/MS spekter byly nalezeny typické fragmenty daných molekulárních iontů (viz příloha Obrázek P1–P3). Na základě všech těchto informací a informací nalezených v literatuře [46,59,64], byla provedena identifikace látek. U fenolických látek s dostupnými standardy byla jejich identifikace podpořena porovnáním s jejich retenčními časy.

Velice přínosná byla identifikace glykosidů fenolických kyselin, které nejsou tolik běžné. Na obrázcích P1–P3 jsou uvedeny ukázky MS a MS/MS spekter glykosidů kyselin ferulové, vanilové a 4-hydroxybenzoové. Jak je z obrázků patrné, dochází zde k typickým neutrálním ztrátám molekul sacharidu. V tomto případě se jedná o ztrátu molekuly glukosy či galaktosy (m/z 162) a arabinosy (m/z 132).

3.3 Optimalizace HPLC/MS

Optimalizace separace fenolických látek byla provedena na modelovém extraktu vzorku amarantových zrn (E3, 80% okyselený methanol), který se vyznačoval vyšším obsahem fenolických látek. Tento extrakt byl naředěn deionizovanou vodou v poměru 1:1 (v/v), a poté byl analyzován pomocí RP-HPLC/MS. K separaci byla využita kolona plněná klasickou oktadecylsilikagelovou stacionární fází, která je ve většině případů ideální pro separaci fenolických látek. Pro zvýšení účinnosti separace byla vybrána kolona plněná povrchově porézními částicemi. Optimalizovanými parametry byly organická složka mobilní fáze (methanol, acetonitril), průtok mobilní fáze, teplota kolony, počáteční koncentrace organické složky při gradientové eluci a strmost gradientu. Cílem bylo najít optimální podmínky separace, při kterých bylo docíleno vysokého počtu sledovaných látek v co nejkratší době. Během měření však došlo k poruše HPLC systému a bylo zjištěno, že při tlaku nad 30 MPa dochází k vymývání neznámých nečistot, které značně ovlivňují kvalitu chromatogramu. Z toho důvodu bylo nutné separaci přizpůsobit těmto pracovním podmínkám. Jako organická složka mobilní fáze byl tedy zvolen acetonitril, který má nižší

viskozitu a nezpůsobuje tak velký protitlak v HPLC systému. Dále byla zvýšena teplota na 40 °C a snížen průtok mobilní fáze na 0,4 ml/min. Za těchto podmínek bylo možné HPLC systém využít a pracovní tlak nepřesáhl 30 MPa. Vodná složka mobilní fáze byla okyselena kyselinou mravenčí na pH 2,43 (cca 0,3%) pro zamezení disociace fenolických kyselin. Dále bylo nutné zvolit počáteční koncentraci organické složky a nejlepší strmost gradientu. Nejprve bylo provedeno několik testů gradientů o různé strmosti, při kterých byla počáteční hodnota organické složky 5 %. Vzhledem k tomu, že při této počáteční koncentraci docházelo k vysoké koeluci sledovaných látek, byla tato hodnota navýšena na 10 %. Tím bylo dosaženo lepšího rozlišení látek a zároveň docházelo k jejich menší koeluci. Vhodnou volbou strmosti gradientu pak bylo dosaženo separace všech sledovaných látek za 9 minut (Obrázek 14).

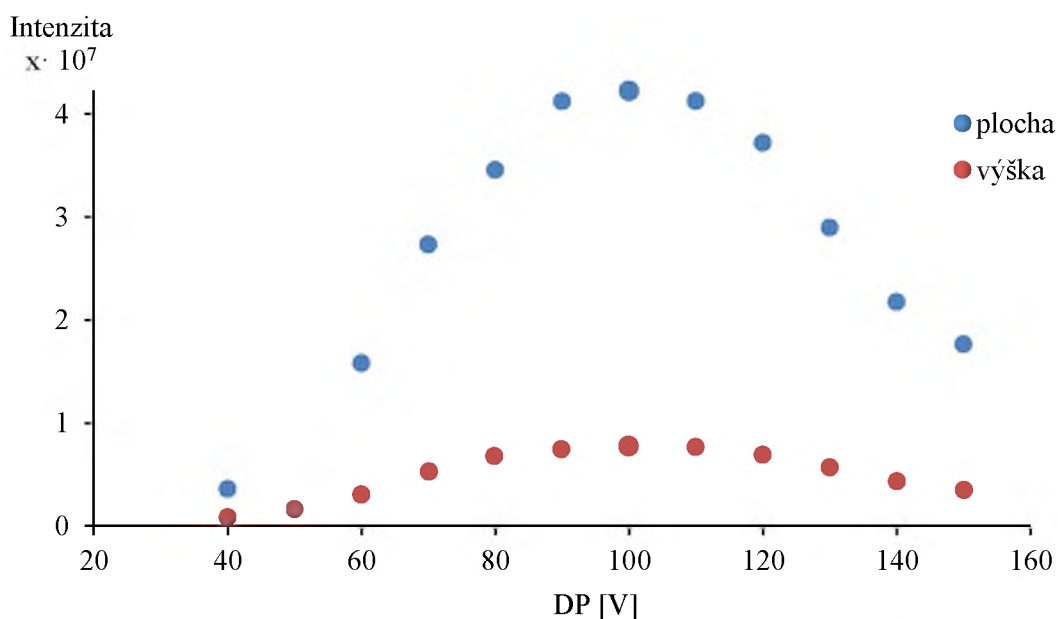


Obrázek 14 – Optimalizovaný gradient separace fenolických látek získaných z extraktu E3.

Kolona: Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm); mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43); gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μl; teplota kolony: 40 °C; detekce: ESI/MS.

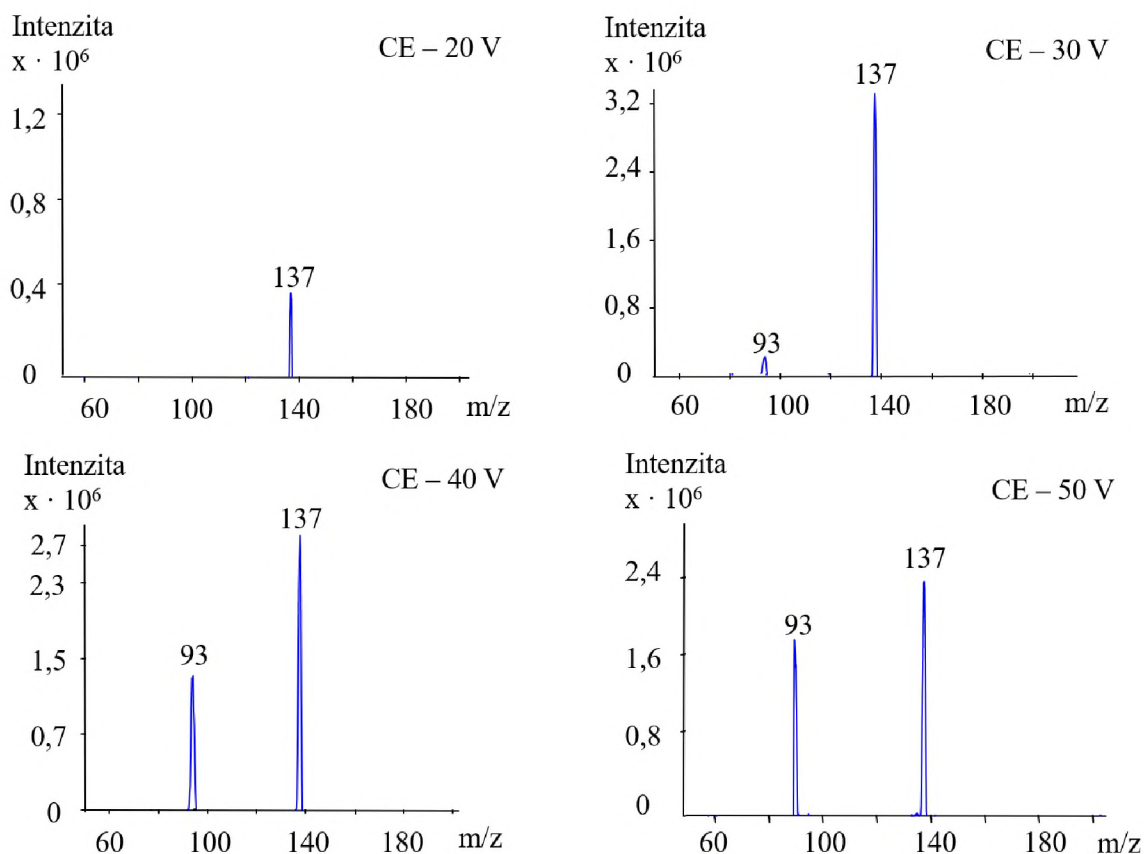
3.4 Optimalizace MRM přechodů

Pro citlivější a selektivnější detekci byla vybrána metoda monitorování MRM přechodů. Optimalizace parametrů MRM přechodů (DP, CE a CXP) byla provedena přímou infúzí směsi dostupných standardních látek, které byly rozděleny do dvou skupin. Tyto skupiny byly rozděleny tak, aby v každé skupině byly látky o různých molárních hmotnostech. Standardy byly vybrány na základě literatury, ve kterých byly studovány fenolické látky amarantu. Jelikož amarantová zrna obsahovala i fenolické látky konjugované se sacharidy, u kterých nejsou dostupné standardy, byla pro tyto látky následně provedena optimalizace jednotlivých parametrů MRM přechodů pomocí HPLC/MS/MS spojení. Nejprve byl optimalizován deklasterační potenciál (DP) sledovaných látek. Měření DP bylo provedeno od hodnoty – 150 do – 40 V. Z naměřených hodnot byl sestrojen graf závislosti intenzity plochy a výšky píku na hodnotě DP (Obrázek 15). Optimální hodnota DP byla zvolena na základě maxima plochy či výšky píku sledované látky (nejvyšší pík chromatogramu).



Obrázek 15 – Optimalizace deklasteračního potenciálu pro m/z 431 (glykosid 4–hydroxybenzoové k.).

Dalším optimalizovaným parametrem byla kolizní energie (CE). Kolizní energie byla měřena od hodnoty – 50 do – 20 V. Z naměřených hodnot byla sledována intenzita hlavních fragmentů produktového iontu. Optimální kolizní energie byla zvolena podle nejvyšší intenzity daného fragmentu. Na Obrázku 16 je znázorněno měření CE pro m/z 431 (glykosid 4-hydroxybenzoové kyseliny).



Obrázek 16 – Optimalizace kolizní energie pro m/z 431.

Posledním optimalizovaným parametrem byl výstupní potenciál kolizní cely (CXP). Měření CXP bylo měřeno od hodnoty -14 do -5 V. Z naměřených dat byla nalezena optimální hodnota CXP jednotlivých sledovaných látek nejintenzivnějšího píku chromatogramu.

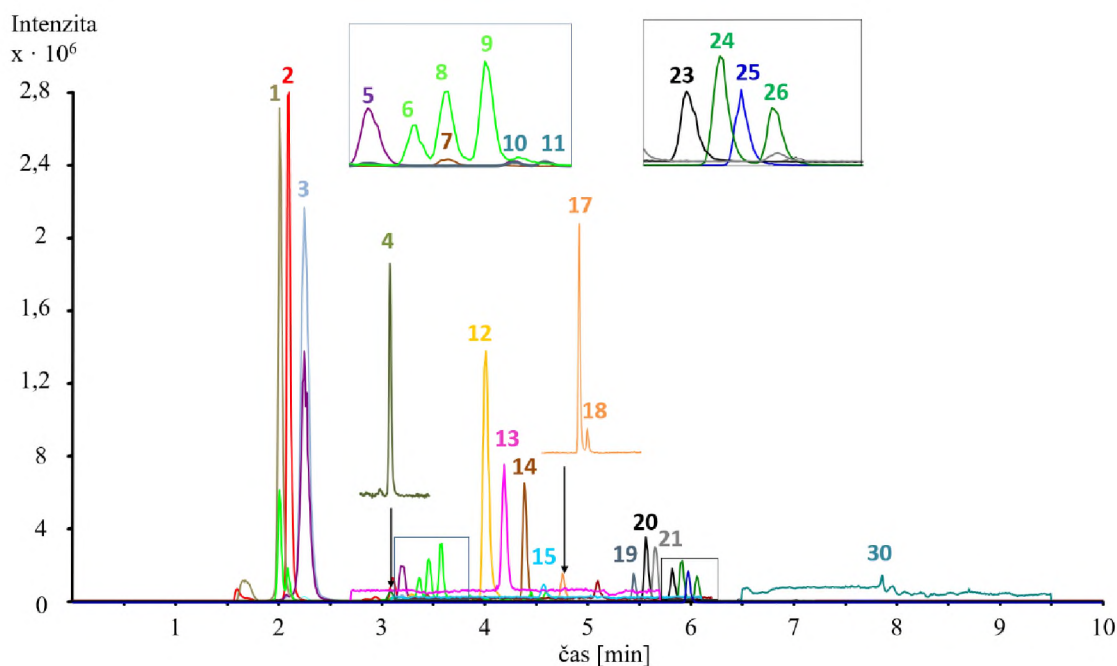
Optimalizované parametry všech sledovaných látek včetně standardů jsou uvedeny v Tabulce 10. Jak je z této tabulky patrné, v extraktu amarantu bylo obsaženo velké množství derivátů a izomerů kyselin 4-hydroxybenzoové, vanilové, ferulové, kafeoylchinové, kumaroylchinové a feruoylchinové.

Tabulka 10 – Optimalizované parametry pro MS/MS analýzu.

Značení	Látka	Q ₁	Q ₃	Čas [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
1	Glykosid 4-hydroxybenzoové k.	299	137	1,98	- 80	- 20	- 6
2	Glykosid 4-hydroxybenzoové k.	431	137	2,06	- 100	- 30	- 5
3	Glykosid vanilové k.	329	167	2,16	- 80	- 20	- 5
4	3,4-dihydroxybenzoová k.	153	109	3,05	- 50	- 20	- 7
5	Glykosid vanilové k.	329	167	3,13	- 115	- 20	- 5
6	Glykosid 4-hydroxybenzoové k.	299	137	3,27	- 150	- 20	- 5
7	Glykosid ferulové k.	355	193	3,36	- 75	- 20	- 6
8	Glykosid 4-hydroxybenzoové k.	299	137	3,37	- 150	- 20	- 5
9	Glykosid 4-hydroxybenzoové k.	299	137	3,50	- 150	- 20	- 5
10	Glykosid vanilové k.	329	167	3,58	- 140	- 20	- 5
11	Glykosid vanilové k.	329	167	3,68	- 140	- 20	- 5
12	Glykosid vanilové k.	299	167	3,97	- 50	- 20	- 6
13	4-hydroxybenzoová k.	137	93	4,17	- 50	- 20	- 3
14	Glykosid ferulové k.	355	193	4,35	- 75	- 20	- 6
15	Kávoová k.	179	135	4,55	- 70	- 20	- 7
16	Vanilová k.	167	123	4,68	- 50	- 18	- 5
17	Kaffeoylchinová k.	353	111	4,74	- 50	- 30	- 7
18	Kaffeoylchinová k.	353	111	4,92	- 50	- 30	- 7
19	Rutin	609	300	5,48	- 140	- 48	- 5
20	Kumaroylchinová k.	337	111	5,57	- 50	- 30	- 7
21	<i>p</i> -kumarová k.	163	119	5,66	- 45	- 18	- 9
22	Isokvercitrin	463	300	5,80	- 160	- 40	- 6
23	Kumaroylchinová k.	337	111	5,83	- 50	- 30	- 7
24	Feruoylchinová k.	367	173	5,91	- 50	- 20	- 5
25	Kaempferol-rutinosid	593	285	5,98	- 120	- 40	- 5
26	Feruoylchinová k.	367	173	6,06	- 50	- 20	- 5
27	Ferulová k.	193	134	6,12	- 45	- 22	- 11
28	Ferulová k.	193	134	6,46	- 45	- 22	- 11
29	Myricetin	317	151	7	- 125	- 30	- 9
30	Salicylová k.	137	93	7,94	- 50	- 20	- 3
31	Kvercetin	301	151	8,19	- 90	- 30	- 7
32	Kaempferol	285	185	8,55	- 130	- 36	- 7

3.5 Porovnání fenolických látek v různých extraktech

Optimalizovaná separace fenolických látek byla provedena pro všechny připravené extrakty E1–E10 a extrakty, které byly předem upraveny alkalickou a kyselou hydrolyzou. Dále byly separovány látky v extraktech získaných postupnou hydrolyzou a následnou extrakcí. Celkem bylo připraveno 15 typů extraktů ve dvojitěm opakování, tzn. že analyzováno bylo 30 extraktů, které byly třikrát proměřeny optimalizovanou HPLC/MS/MS metodou. Fenolické látky byly monitorovány na základě předchozí identifikace a dostupných standardů, které byly vybrány podle identifikovaných vázaných fenolických látek a literatury. Na Obrázku 17 je znázorněn chromatografický záznam fenolických látek při analýze extraktu E3 (80% methanol + kyselina mravenčí). Intenzita a koncentrace sledovaných látek je velmi různorodá, proto některé z nich nejsou v celkovém záznamu viditelné. Hlavními fenolickými sloučeninami tohoto methanolového extraktu jsou glykosidy fenolických kyselin, zejména kyseliny 4-hydroxybenzoové (1, 2, 6, 8 a 9), vanilové (3, 5, 10, 11 a 12) a ferulové (7 a 14). Jedná se o různé deriváty nebo izomery, které byly měřeny při různých MRM přechodech. Největší zastoupení z fenolických kyselin ve své volné formě měla kyselina 4-hydroxybenzoová (13) a *p*-kumarová (21). Kyselina kumarová eluovala ve dvou retenčních časech (5,66 a 6,08 minut). Na základě porovnání retenčního času se standardem byla identifikována jako první z píků, tedy v 5,66 minutě. V čase 6,08 minut eluuje zřejmě její izomer, který dle poznatků z literatury nebyl předpokládán. Potvrzení o jaký izomer se jedná nebylo z časových důvodů provedeno. Ve své volné formě byly identifikovány také kyseliny, 3,4-dihydroxybenzoová (4) a kávová (15). Tyto kyseliny se však vyznačovaly velmi nízkou intenzitou. Kyseliny vanilová (16) a salicylová (30) nebyly detekovány vůbec. Nalezeny byly však deriváty kyseliny chinové, jako jsou kyseliny, kafeoylchinová (17 a 18), kumaroylchinová (20 a 23) a feruoylchinová (24 a 26). Tyto kyseliny se nacházejí v přírodních matricích v mnoha izomerních formách. Zde byly pozorovány dva izomery od každé z kyselin. Nejmenší zastoupení fenolických látek měly flavonoidy. Hlavními flavonoidy amarantového zrna byly rutin (19) a kaempferol-rutinosid (25). Tyto flavonoidy se v analyzovaném extraktu vyskytovaly ve velmi malém množství. Isokvercitrin (22), myricerin (29), kvercetin (31) a kaempferol (32) nebyli detekováni vůbec. Výsledné chromatogramy všech získaných extraktů volných fenolických látek (E1–E10) poskytovaly podobný profil fenolických látek, lišily se pouze jejich intenzitou (viz příloha Tabulka P1). Ukázky chromatogramů při analýze extraktů s přídavkem HCOOH (E1, E6 a E9) jsou zobrazeny v příloze Obrázek P4–P6.



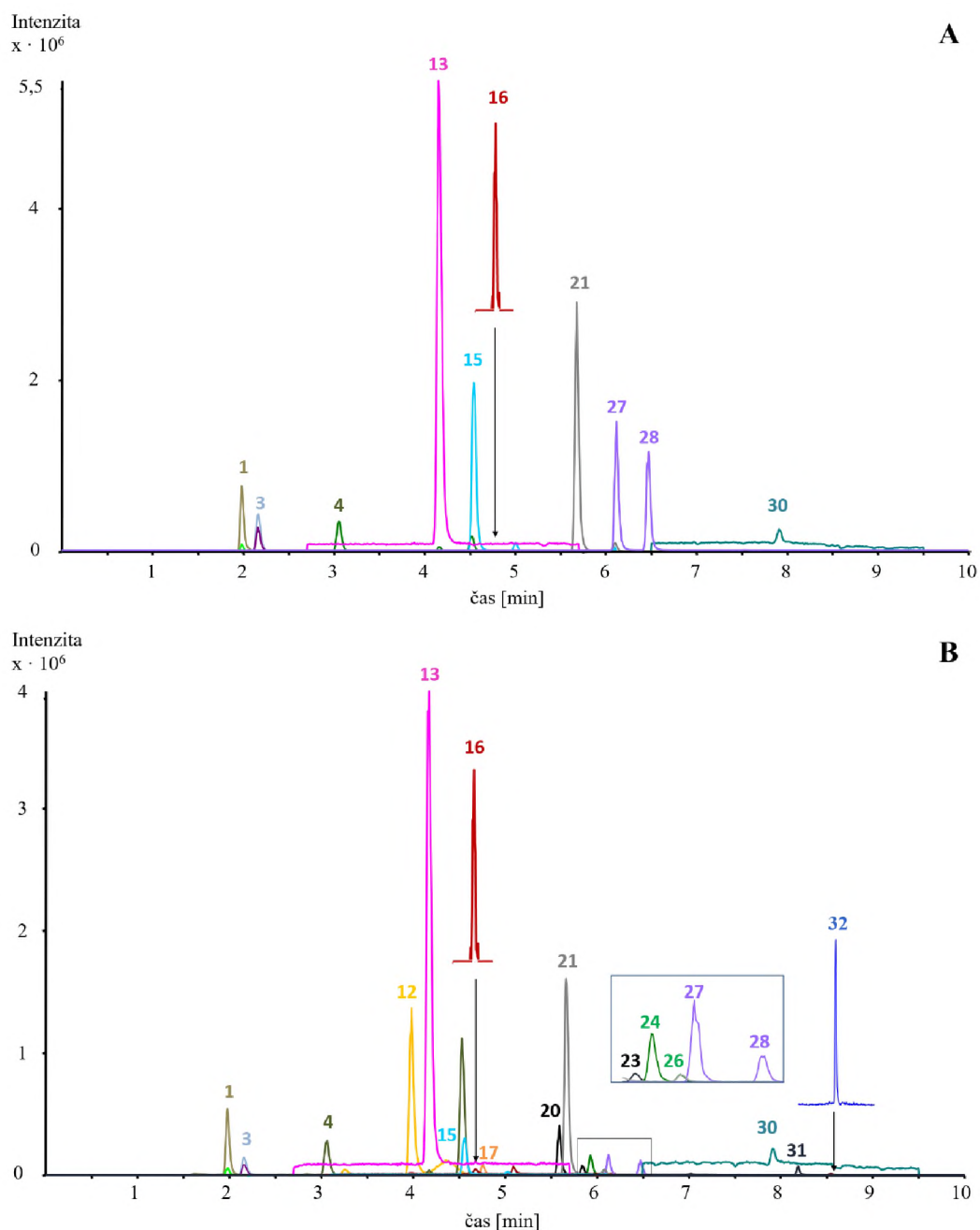
Obrázek 17 – Optimalizovaná separace látek obsažených v extraktu E3.

Kolona: Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm); mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43); gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μl; teplota kolony: 40 °C; detekce: ESI⁻/MS; MRM přechody viz Tabulka 10.

1, 2 – glykosidy 4-hydroxybenzoové k.; 3 – glykosid vanilové k.; 4 – k. 3,4-dihydroxybenzoová; 5 – glykosid vanilové k.; 6, 8, 9 – glykosidy 4-hydroxybenzoové k.; 7 – glykosid ferulové k.; 10, 11 – glykosidy vanilové k.; 12 – glykosid vanilové k.; 13 – k. 4-hydroxybenzoová; 14 – glykosid ferulové kyseliny; 15 – k. kávová; 17, 18 – k. kafeoylchinová; 19 – rutin; 20, 23 – k. kumaroylchinová; 21 – k. *p*-kumarová; 24, 26 – feruoylchinová k.; 25 – kaempferol-rutinosid; 30 – k. salicylová.

Vzhledem k tomu, že fenolické látky se vyskytují v obilovinách také ve vázané formě na buněčné stěny, byla pro jejich uvolnění provedena kyselá či alkalická hydrolýza. Zároveň by mělo při hydrolýze docházet k uvolnění volných fenolických kyselin z glykosidické vazby. Chromatografické záznamy extraktu po alkalické a kyselé hydrolýze jsou znázorněny na Obrázku 18. Porovnáním obou záznamů uvolněných fenolických látek lze vidět, že vyšších intenzit uvolněných fenolických látek bylo dosaženo alkalickou hydrolýzou, protože vlivem zásady dochází k uvolnění látek z buněčné stěny zrna. Avšak u kyselé hydrolýzy byl záznam bohatší na některé konjugované fenolické látky, u kterých vlivem působení kyseliny nedochází k porušení vazby. Při alkalické hydrolýze vykazovaly nejvyšší intenzitu kyseliny, kávová (15), *p*-kumarová (21) a ferulová (27 a 28), které jsou zpravidla vázané na buněčnou stěnu, navíc se ve vzorku vyskytují ve velkém množství v konjugované formě. Kyselina ferulová se ve vzorku vyskytovala ve dvou formách, *-cis* a *-trans*, tudíž byly pozorovány dva píky. Nejvyšší intenzitu měla kyselina 4-hydroxybenzoová. Její vysoká intenzita zřejmě

souvisí s velkým počtem glykosidů, které byly v extraktech zastoupeny a díky hydrolyze došlo k porušení vazby a k uvolnění volné kyseliny.

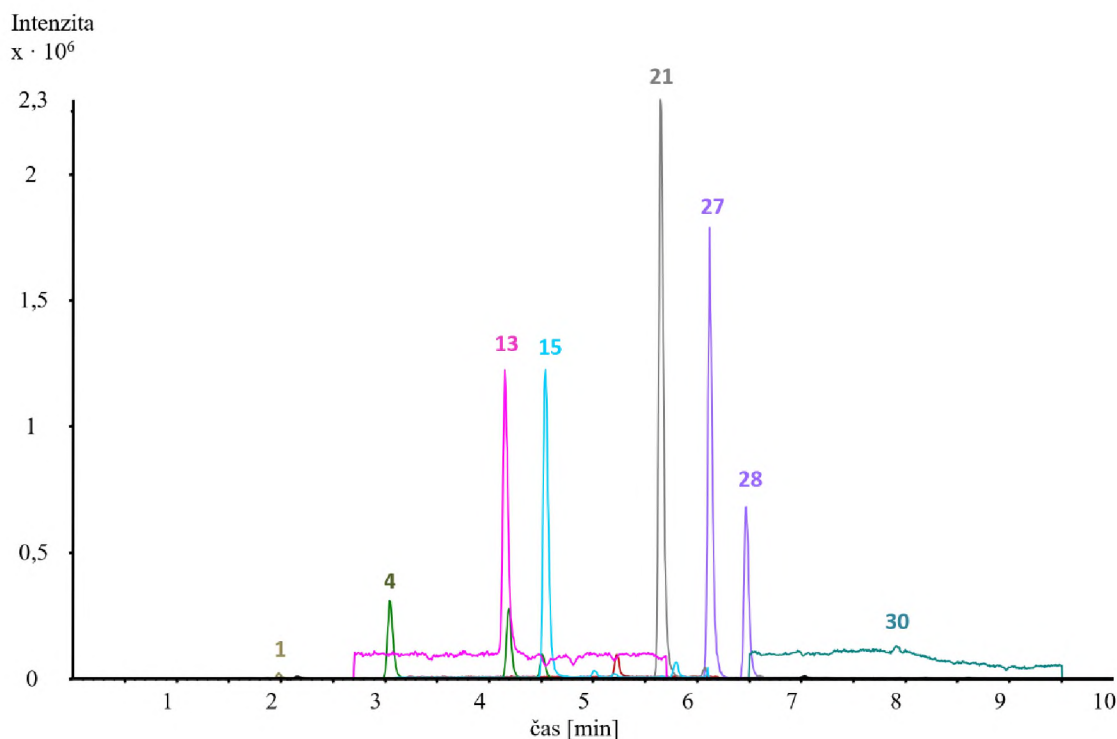


Obrázek 18 – Optimalizovaná separace vázaných fenolických látek po alkalické (A) a kyselé (B) hydrolyze.

Kolona: Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm); mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43); gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μl; teplota kolony: 40 °C; detekce: ESI⁻/MS; MRM přechody viz Tabulka 10.

1 – glykosid 4-hydroxybenzoové k.; 3 – glykosid vanilové k.; 4 – k. 3,4-dihydroxybenzoová; 12 – glykosid vanilové k.; 13 – k. 4-hydroxybenzoová; 15 – k. kávová; 16 – k. vanilová; 17 – k. kafeoylchinová; 20, 23 – k. kumaroylchinová; 21 – k. *p*-kumarová; 24, 26 – feruoylchinová k; 27, 28 – kyselina ferulová; 30 – k. salicylová; 31 – kvercetin; 32 – kaempferol.

Dále byla provedena alkalická hydrolyza pevného podílu po extrakci volných fenolických látek vzorku 70% acetonem (Obrázek 19). Cílem bylo zjistit, jaké látky jsou vázané na buněčnou stěnu. Z obrázku 19 je patrné, že ve vázané formě na buněčnou stěnu jsou přítomné především kyseliny 3,4-dihydroxybenzoová (4), 4-hydroxybenzoová (13), kávová (15), *p*-kumarová (21) a izomery kyseliny ferulové (27 a 28).



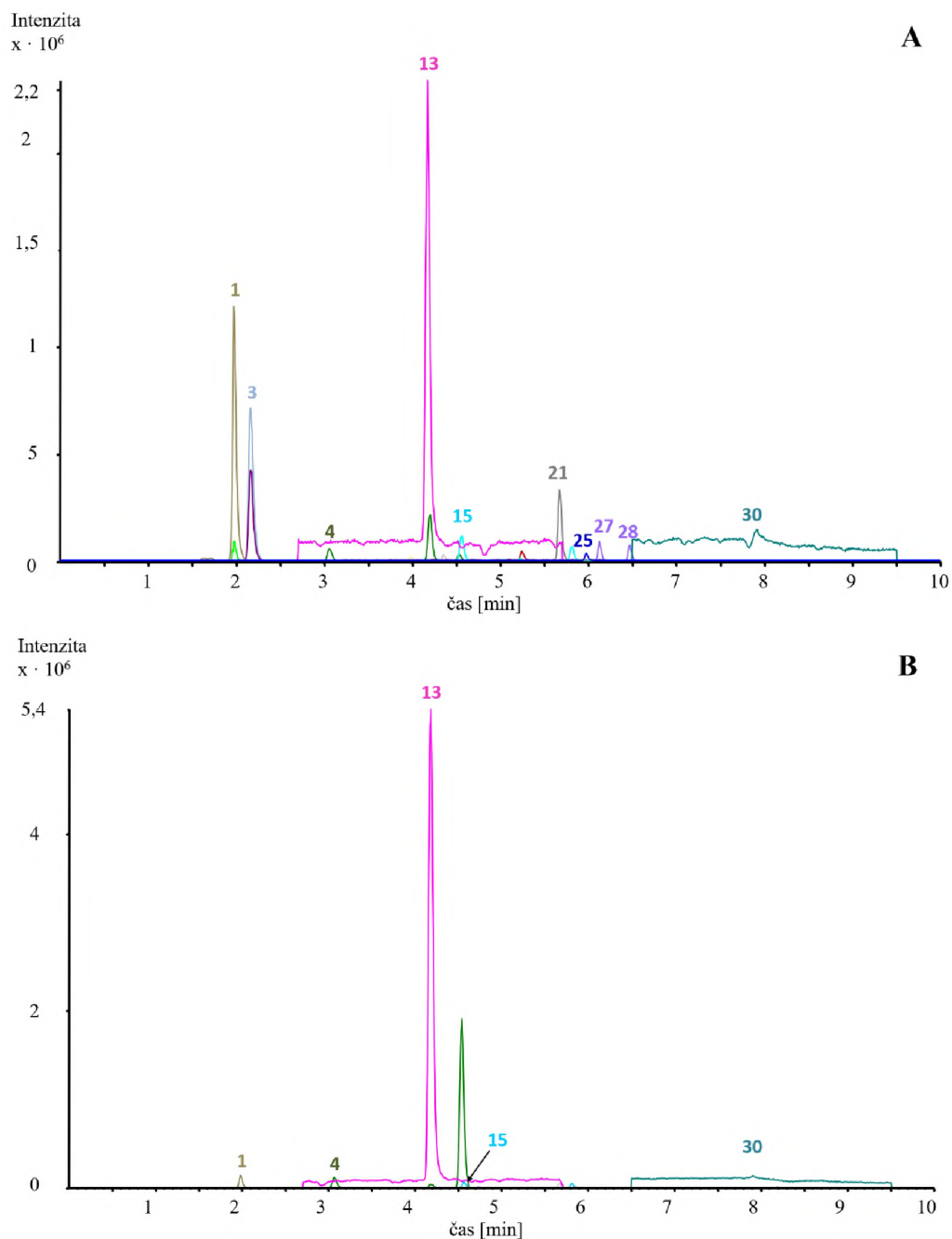
Obrázek 19 – Optimalizovaná separace fenolických látek získaných po alkalické hydrolyze pevného podílu po předchozí extrakci volných fenolických látek.

Kolona: Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm); mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43); gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μl; teplota kolony: 40 °C; detekce: ESI⁻/MS; MRM přechody viz Tabulka 10.

1 – glykosid 4-hydroxybenzoové k; 4 – k. 3,4-dihydroxybenzoová; 13 – k. 4-hydroxybenzoová; 15 – k. kávová; 21 – k. *p*-kumarová; 27, 28 – k. ferulová; 30 – k. salicylová.

Dále byly analyzovány extrakty po alkalické a kyselé hydrolyze vodného podílu po extrakci volných fenolických látek, tzn. látky které zůstaly ve vodné fázi a nepřešly do směsi diethylether a ethylacetát (Obrázek 20). Nejprve byla provedena alkalická hydrolyza a extrakce uvolněných látek. Jak je z obrázku patrné, do směsi diethylether a ethylacetát nepřechází všechny konjugované fenolické látky a některé ve vodné fázi zůstávají. Především se jedná o glykosid 4-hydroxybenzoové a vanilové kyseliny a 4-hydroxybenzoovou kyselinu. U následné kyselé hydrolyzy vodného zbytku je vidět,

že téměř všechny látky byly vyextrahovány až na kyselinu 4-hydroxybenzoovou (13) a deriváty kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové, které se ještě uvolnily kyselou hydrolyzou.



Obrázek 20 – Optimalizovaná separace fenolických látek získaných po alkalické (A) a kyselé (B) hydrolyze vodného podílu po extrakci volných fenolických látek.

Kolona: Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm); mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43); gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μl; teplota kolony: 40 °C; detekce: ESI⁻/MS; MRM přechody viz Tabulka 10.

1 – glykosid 4-hydroxybenzoové k.; 3 – glykosid vanilové k.; 4 – k. 3,4-dihydroxybenzoová; 13 – k. 4-hydroxybenzoová; 15 – k. kávová; 21 – k. *p*-kumarová; 25 – kaempferol-rutinosid; 27, 28 – kyselina ferulová; 30 – k. salicylová.

3.6 Kvantifikace fenolických látek

Z důvodu pandemie a závady při HPLCM/MS měření, bylo nedostatek času na přípravu a analýzu kalibračních roztoků. Proto byla provedena kvantifikace sledovaných fenolických látek všech extraktů včetně extraktů získaných při postupné hydrolýze a extrakci uvolněných látek na základě intenzity ploch získaných z chromatografických záznamů. Výsledné hodnoty naměřených dat pak byly zprůměrovány a porovnány. V Tabulce P1 jsou výsledky analýzy volných fenolických látek, kde je patrné, že nelze s jistotou říci, které extrakční činidlo je pro extrakci volných fenolických látek nejvhodnější. Každá ze sledovaných fenolických látek vyžaduje pro získání maximální účinnosti jiné rozpouštědlo. Pro optimalizaci extrakce by tak bylo potřeba využít některou z metod plánování experimentu.

3.7 Spektrofotometrické metody

3.7.1 Stanovení antioxidační aktivity

Stanovení antioxidační aktivity bylo nejprve provedeno metodami, ABTS a DPPH. Vzhledem k tomu, že činidlo DPPH se vzorkem téměř nereagovalo, byla stanovena TAA vše extraktů amarantových zrn pouze ABTS metodou.

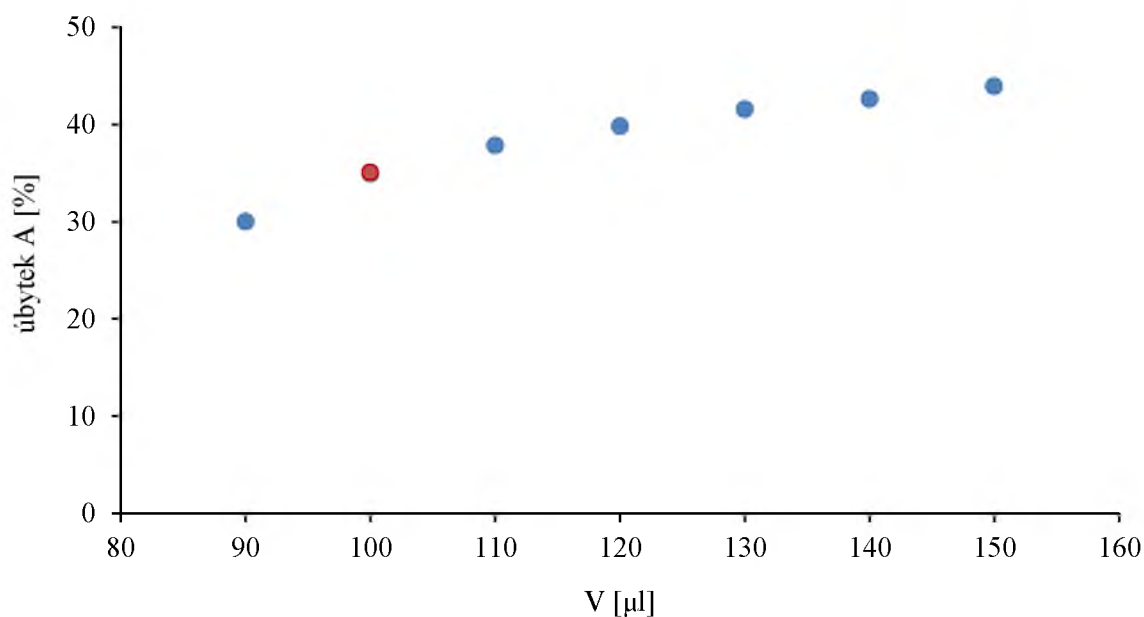
3.7.1.1 Optimalizace metody ABTS

Pro měření antioxidační aktivity bylo nejprve zapotřebí optimalizovat koncentraci extraktu. Bylo zjištěno, že amarantová zrna neobsahují významné množství antioxidantů, které reagují s ABTS činidlem, proto extrakty nebyly ředěny. Dále bylo nutné optimalizovat objem zvoleného extraktu, který byl přidán ke 3 ml stabilního roztoku radikálu ABTS připraveného podle postupu popsaného v experimentální části (kapitola 2.3.7.2). Pro rozpuštění ABTS roztoku byl použit acetátový pufr (pH 4,3), protože ve vodném prostředí docházelo k zakalení roztoku. Úbytek absorbance byl vypočítán podle následujícího vztahu:

$$\text{úbytek } A = \frac{A_{\text{blank}} - A}{A_{\text{blank}}} \cdot 100 \text{ [\%]}$$

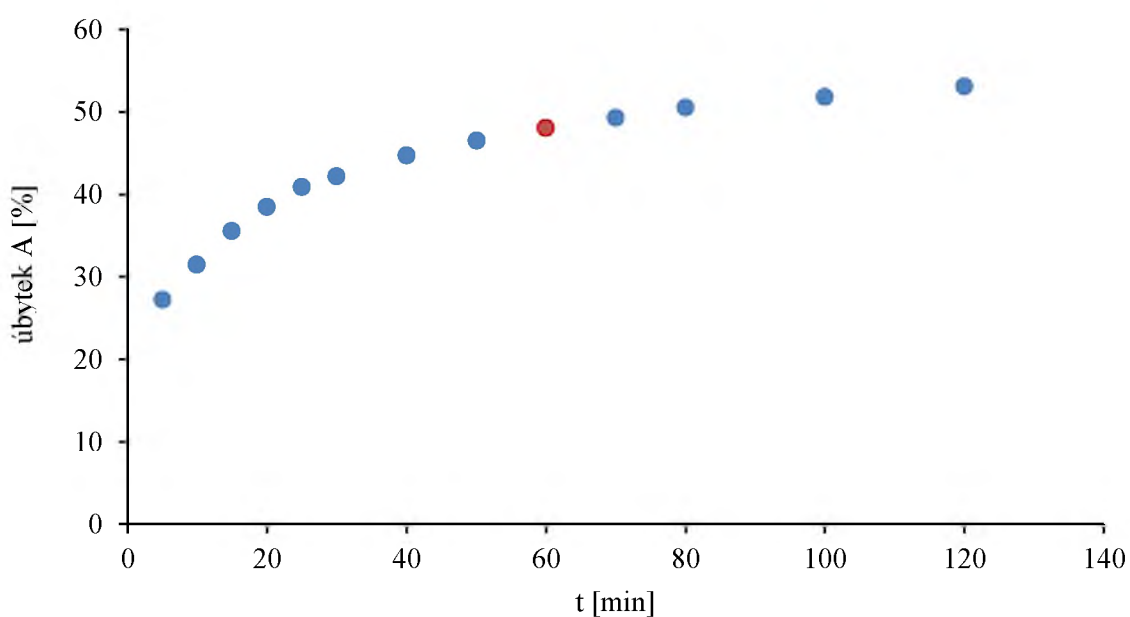
kde A je absorbance vzorku v čase 30 min a A_{blank} je absorbance slepého pokusu.

Z naměřených hodnot byl sestaven graf závislosti úbytku absorbance na dávkovaném objemu extraktu (Obrázek 21).



Obrázek 21 – Závislost úbytku absorbance v procentech na množství přidávaného extraktu vzorku (E3).

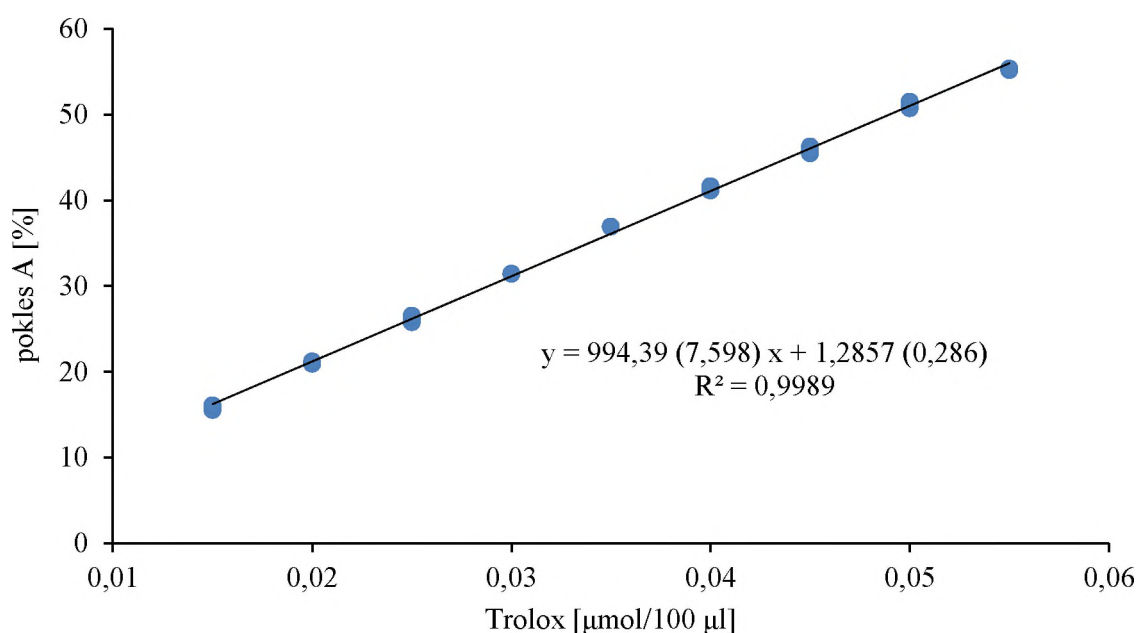
Z tohoto grafu je patné, že postupným zvyšováním objemu extraktu přestává být závislost lineární. Vyšší dávkované objemy extraktu reagují s radikálovým kationtem ABTS pouze nepatrně a směřují k ustáleným hodnotám úbytku absorbance. Proto byl zvolen objem 100 μl, který vykazoval vyšší reaktivitu a spadal do lineární části závislosti. Následně byla optimalizována doba reakce, při níž byl pozorován nejvyšší a zároveň pozvolný lineární pokles absorbance (Obrázek 22). Byla zvolena ideální a zároveň dostačující doba reakce 60 minut.



Obrázek 22 – Závislost úbytku absorbance v procentech na době reakce.

3.7.1.2 Stanovení antioxidační aktivity různých typů extraktů ze vzorku amarantových zrn

Pro kvantitativní stanovení antioxidační aktivity bylo proměřeno 10 typů extraktů amarantových zrn, připravených dle postupu uvedeném v experimentální části (kapitola 2.3.4). Dále byl proměřen extrakt po kyselé hydrolýze. Každý z extraktů byl připraven dvakrát, tzn. že bylo celkem proměřeno 22 extraktů. Extrakt získaný po alkalické hydrolýze nebylo možné spektrofotometricky monitorovat, protože byl ovlivněn přítomností kyseliny askorbové (antioxidant), která sloužila k ochraně fenolických látek. Každý extrakt byl proměřen pětkrát. Pro kvantitativní vyjádření poklesu absorbance bylo nutné přepočítat jednotlivé výsledné hodnoty získané ABTS metodou na ekvivalentní množství Troloxu. K tomu bylo zapotřebí nejprve připravit kalibrační řadu ze zásobního roztoku Troloxu připraveného dle postupu uvedeného v experimentální části (kapitola 2.3.7.1) a sestavit kalibrační křivku závislosti poklesu absorbance na molárním množství standardní látky. Kalibrační křivka spolu s rovnicí regrese a odchylkami jednotlivých parametrů jsou uvedeny na Obrázku 23.



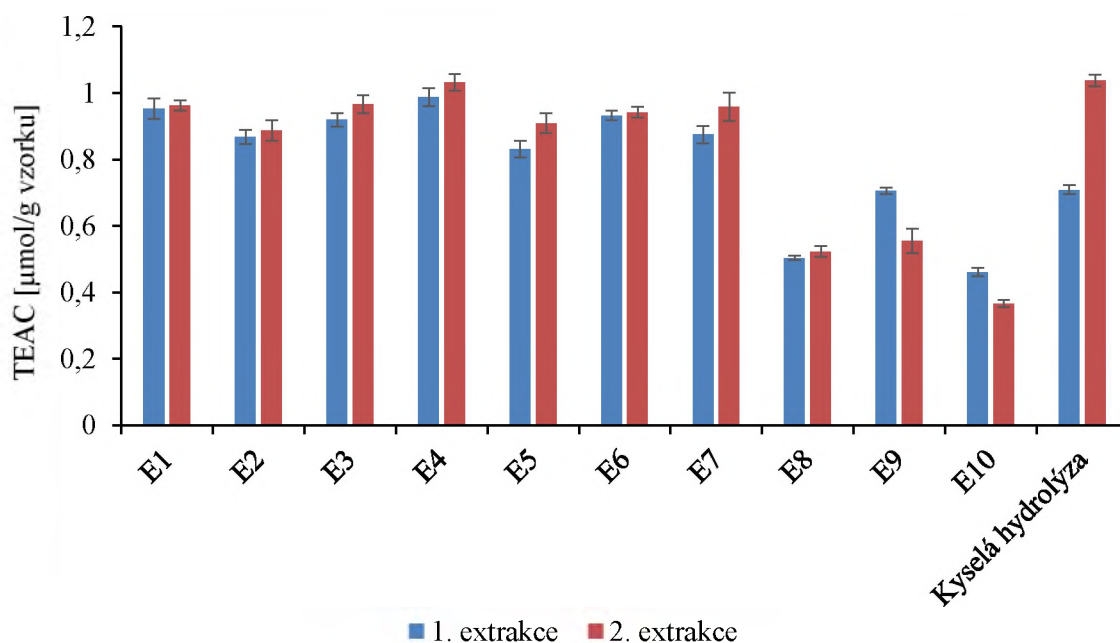
Obrázek 23 – Kalibrační křivka závislosti úbytku A na množství Troloxu v dávkovaném objemu.

Pomocí výsledné rovnice regrese byly přepočítány hodnoty poklesu absorbance u všech sledovaných extraktů na ekvivalentní množství Troloxu. Výsledná hodnota celkové antioxidační aktivity byla vztažena na jednotku vzorku (1 g amarantových zrn) dle následujícího vztahu:

$$\text{TEAC } (\mu\text{mol/g}) = \frac{\text{aktivita vzorku } (\mu\text{mol Troloxu})}{m \text{ (g)}} \cdot f_R$$

kde m je navážka vzorku amarantových zrn a f_R je faktor zahrnující dávkované množství extraktu vzorku a ředění.

Z vypočítaných průměrných hodnot byl vytvořen sloupcový graf (Obrázek 24), kde je možné vidět rozdíl antioxidační aktivity při různých typech extrakce a během přípravy.



Obrázek 24 – Antioxidační aktivita fenolických látek různých extraktů získaných ze vzorků amarantových zrn.

Z Obrázku 24 je patrné, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazují extrakty s přidavkem kyseliny mravenčí (E1, E3, E4, E6 a E7). Okyselením tedy došlo k mírnému podpoření extrakce. Hodnoty TEAC extraktu E1 se pohybují v rozsahu koncentrace 0,9523 – 0,9619 μmol/g, E3 v rozsahu 0,9191 – 0,9665 μmol/g, E4 v rozsahu 0,9875 – 1,0312 μmol/g, E6 v rozsahu 0,9317 – 0,9417 μmol/g a E7 v rozsahu 0,8747 – 0,9417 μmol/g. Je zde také vidět, že tyto extrakty byly připravené s minimální

chybou, s výjimkou extraktu E5 a E7. Nejnižší hodnoty TAA vykazovaly extrakty získané několikanásobnou extrakcí E8–E10 (aceton-diethylether-ethylacetát). Jejich hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,3659 – 0,7053 $\mu\text{mol/g}$. Důvodem byla zřejmě ztráta fenolických látek při vícekrokové přípravě. U těchto extraktů lze také vidět vyšší chybu při opakované přípravě. Extrakty methanolu a acetonu, které byly připraveny bez okyselení (E2 a E5) a s přidavkem kyseliny mravenčí (E3 a E6), nevykazovaly mezi sebou zásadní rozdíl. Hodnoty TAA extraktu E2 se pohybovaly v rozmezí 0,8679 – 0,8867 $\mu\text{mol/g}$ a extraktu E5 v rozmezí 0,8307 – 0,9089 $\mu\text{mol/g}$. Mezi těmito extrakty byl však rozdíl s využitím ultrazvuku, který u methanolvých extraktů (E4) způsobil vzrůst antioxidační aktivity, naopak u extrakce acetonem byla antioxidační aktivita mírně snížena. Působením ultrazvuku při vícenásobné extrakci (E10) byl zpozorován značný pokles TAA, jejíž hodnoty se pohybovaly v rozsahu koncentrace 0,3659 – 0,4603 $\mu\text{mol/g}$. Extrakt získaný po kyselé hydrolyze se vyznačoval podobnou TAA jako neokyselené extrakty E3 a E5. Rozmezí hodnot TAA se od sebe lišily v závislosti na přípravě extraktů (0,7084 – 1,0378 $\mu\text{mol/g}$). Důvodem mohlo být nedokonalé uvolnění některých fenolických látek v průběhu hydrolyzy nebo chyba při postupu, protože bylo provedeno několik kroků přípravy (odlišná doba extrakce, teplota nebo příprava roztoku kyseliny chlorovodíkové). Z chybových úseček je však patrné, že nedocházelo k velkým rozdílným hodnotám při spektrofotometrickém měření. Největší chyba byla pozorována v průběhu extrakce, obzvláště u extraktů s vícekrokovou přípravou. Všechny průměrné hodnoty TEAC a jejich směrodatné odchylky jsou uvedeny v příloze (Tabulka P2).

3.7.2 Stanovení celkového množství fenolických látek

3.7.2.1 Optimalizace metody s Folin-Ciocalteuovým činidlem

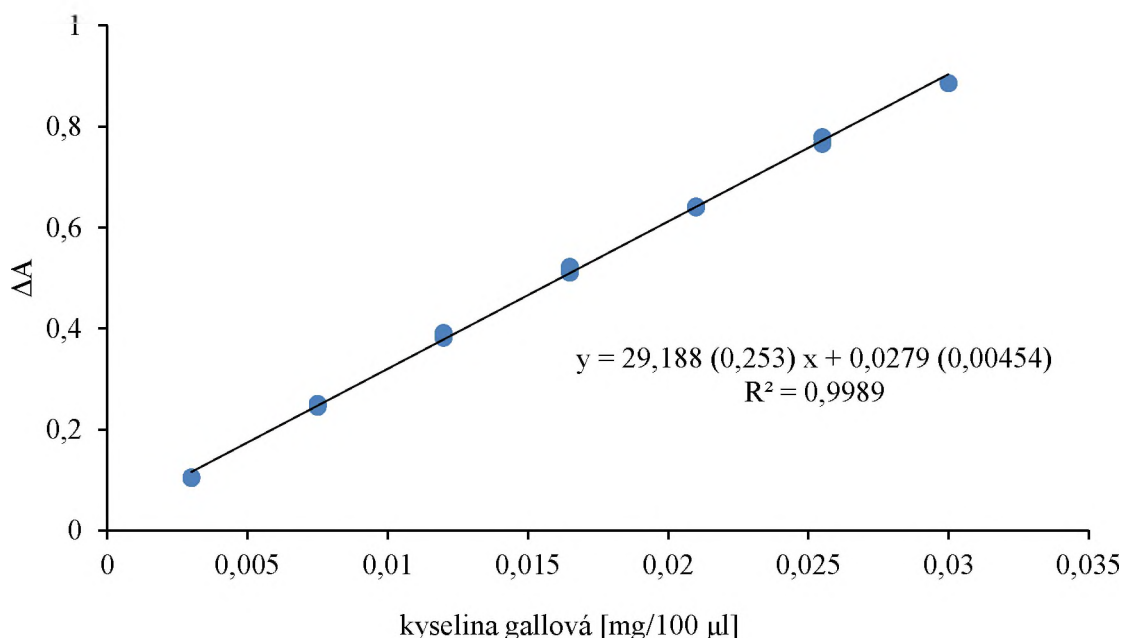
Stejným způsobem jako u metody ABTS byl optimalizován nejprve dávkovaný objem extraktu vzorku a následně reakční doba směsi. Pro stanovení celkového množství fenolických látek byl zvolen optimální objem 100 μl a reakční doba 30 minut. Nárůst absorbance byl vypočítán dle následujícího vztahu:

$$\Delta A = A - A_{blank}$$

kde A je absorbance vzorku v čase 30 min od počátku reakce a A_{blank} je absorbance slepého pokusu ve stejném čase.

3.7.2.2 Stanovení celkového množství fenolických látek různých typů extraktů získaných ze vzorku amarantových zrn

Pro stanovení celkového množství fenolických látek bylo spektrofotometricky monitorováno 10 typů extraktů amarantových zrn a jeden extrakt získaný po kyselé hydrolýze. Každý z extraktů byl připraven dvakrát, tzn. že bylo celkem proměřeno 22 extraktů. Extrakty získané po alkalické hydrolýze nebylo možné spektrofotometricky proměřit, protože obsahovaly kyselinu askorbovou. Pro kvantitativní vyjádření nárůstu absorbancí určující celkové množství fenolických látek extraktů byla sestrojena kalibrační křivka závislosti ΔA na ekvivalentní množství kyseliny gallové. Kalibrační závislost je spolu s parametry lineární regrese (úsek a směrnice) a jejich směrodatnými odchylkami uvedena na Obrázku 25.



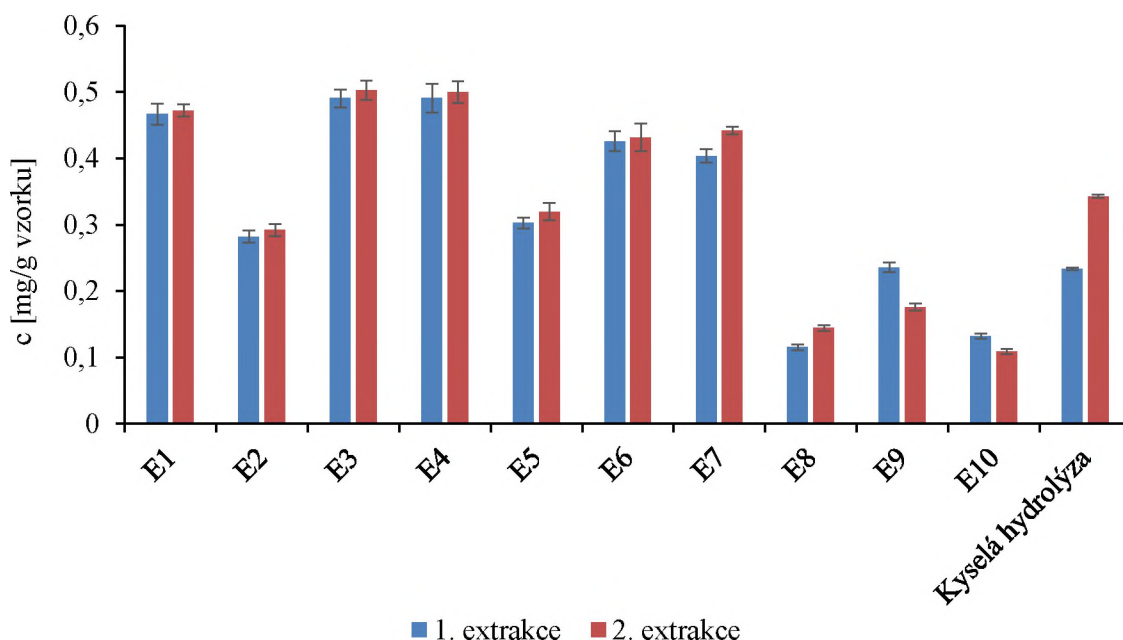
Obrázek 25 – Kalibrační křivka závislosti nárůstu A na množství kyseliny gallové v dávkovaném objemu.

Pomocí výsledné rovnice regrese byly přepočítány hodnoty nárůstu absorbance u všech sledovaných extraktů na ekvivalentní množství kyseliny gallové. Výsledné hodnoty celkového množství fenolických látek byly vztaženy na 1 g amarantových zrn dle následujícího vztahu:

$$c \text{ (mg/g)} = \frac{\text{aktivita vzorku (mg kyseliny gallové)}}{m \text{ (g)}} \cdot f_R$$

kde m je navážka vzorku amarantových zrn a f_R je faktor zahrnující dávkované množství extraktu vzorku a ředění.

Ze získaných průměrných hodnot byl vytvořen sloupcový graf (Obrázek 26), kde je možné vidět rozdíl obsahu fenolických látek v různých extraktech a během přípravy.



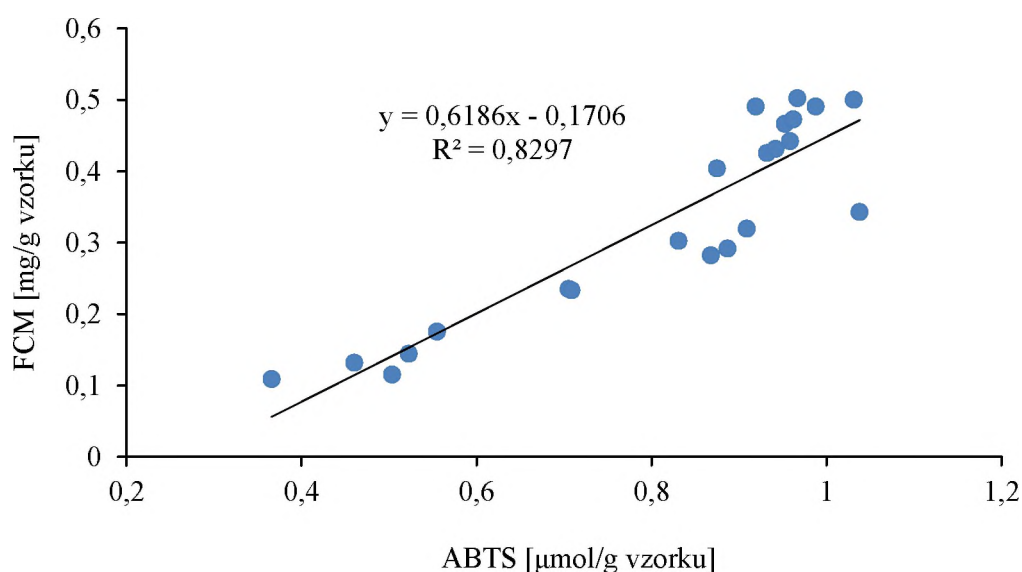
Obrázek 26 – Celkové množství fenolických látek různých extraktů získaných ze vzorků amarantových zrn.

Z Obrázku 26 je patrné, že extrakty podpořené kyselinou mravenčí vykazují nejvyšší množství fenolických látek (E1, E3, E4, E6 a E7). Hodnoty celkového množství fenolických látek extraktu E1 se pohybují v rozsahu 0,4664 – 0,4724 mg/g, E3 v rozsahu 0,4904 – 0,5024 mg/g, E4 v rozsahu 0,4905 – 0,4998 mg/g, E6 v rozsahu 0,4255 – 0,4314 mg/g a E7 v rozsahu 0,4038 – 0,4419 mg/g. Přídavek kyseliny mravenčí mohl způsobit nejen zvýšení celkového množství fenolických látek v průběhu extrakce, ale také vyšší reaktivitu s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Tyto extrakty byly připravené s minimální chybou (v rámci chyby měření), s výjimkou extraktu E7. Jelikož se methanolvý extrakt E4 (extrakce podpořená ultrazvukem) nelišil od E3, můžeme předpokládat, že extrakty E6 a E7 by si měly být také velmi blízké. Proto předpokládáme, že hodnoty prvního extraktu E7 jsou nízké z důvodu nedokonalé extrakce či chyby při přípravě. Nejnížší množství fenolických látek mají opět extrakty získané vícenásobnou extrakcí (E8–E10). Jejich hodnoty se pohybovaly v rozsahu 0,1086 – 0,2352 mg/g. Důvodem byla pravděpodobně ztráta fenolických látek při vícekrokové přípravě, kdy docházelo k tvorbě dvou extrakčních

rovnováh a do směsi diethylether:ethylacetát zřejmě nepřechází velké množství látek. Extrakty methanolu a acetonu, které byly připraveny bez okyselení (E2 a E5), nevykazovaly mezi sebou zásadní rozdíl. Jejich hodnoty však byly mnohem nižší, než s přidavkem kyseliny mravenčí. Hodnoty TAA extraktu E2 se pohybovaly v rozmezí 0,282 – 0,2915 mg/g a extraktu E5 v rozmezí 0,3025 – 0,3195 mg/g. Porovnáním methanolového extraktu E3 s acetonovým extraktem E5, se zjistilo, že kyselina mravenčí podpořila více extrakci s methanolem. Stejně tak hodnoty získané z extrakce v ultrazvukové lázni jsou vyšší než u acetonového extraktu. Působením ultrazvuku u vícenásobné extrakci (E10) se celkové množství fenolických látek výrazně snížilo. Extrakt získaný po kyselé hydrolyze se vyznačoval podobnou TAA jako neokyselené extrakty E2 a E5. Hodnoty celkového množství fenolických látek se pohybovaly v rozmezí 0,2333 – 0,343 mg/g. Z chybových úseček jednotlivých měření je patrné, že nedocházelo k velkým chybám při samotném spektrofotometrickém měření. Největší chyba byla pozorována v průběhu kyselé hydrolyzy a extrakce, obzvláště u extraktů s víceřadovou přípravou. Všechny průměrné hodnoty celkového množství fenolických látek a jejich směrodatné odchylky jsou uvedeny v příloze (Tabulka P3).

3.7.3 Porovnání spektrofotometrických metod

Pro porovnání spektrofotometrických metod byl sestaven graf lineární regrese závislosti koncentrace GAE (metoda FCM) na koncentraci TAEC (metoda ABTS). Jejich korelační závislost je znázorněna na Obrázku 27.



Obrázek 27 – Závislost mezi celkovým množstvím fenolických látek (FCM metoda) a celkovou antioxidační aktivitou (ABTS metoda).

Jak je z obrázku patrné, je pozorována silná korelace mezi naměřenými daty pomocí dvou spektrofotometrických metod. Nejvíce rozdílné hodnoty vykazovaly neokyselené extrakty E2 a E5. U FCM metody byla intenzita těchto extraktů mnohem nižší v porovnání s okyselenými extrakty. Tento značný rozdíl mohl být způsobený kyselinou mravenčí, která zajistila vyšší reaktivitu fenolických látek s činidlem. U měření TEAC takový rozdíl mezi přidavkem kyseliny mravenčí nenastal. Okyselením došlo pouze k mírnému navýšení antioxidační aktivity. U ostatních extraktů byl rozdíl intenzit spektrofotometrických metod podobný.

4 ZÁVĚR

Náplní této práce bylo stanovení jednotlivých fenolických látek získaných z různých extraktů amarantových zrn a studium antioxidační aktivity vzorku.

První část diplomové práce byla zaměřena na identifikaci a kvantifikaci volných a vázaných fenolických látek v připravených extraktech. Nejprve byla provedena optimalizace chromatografické separace a hmotnostně spektrometrické detekce. Separace sledovaných látek probíhala v systému s obrácenými fázemi na koloně Ascentis Express C18, která byla plněna povrchově porézními částicemi. Všechny analyzované látky byly separovány gradientovou elucí po dobu 9 minut. Mobilní fázi představoval acetonitril a okyselená voda (0,3% kyselina mravenčí). K identifikaci látek byla provedena HPLC/MS analýza při snímání kladných a záporných iontů. Pro zjištění jejich strukturní informace byla následně provedena tandemová hmotnostní spektrometrie. Na základě identifikovaných látek byly optimalizovány parametry MRM přechodů. Takto optimalizovanou chromatografickou separací bylo analyzováno 10 typů extraktů volných fenolických látek, dále pak extrakty získané po alkalické a kyselé hydrolýze a extrakty získané postupnou extrakcí. Každý extrakt byl připraven dvakrát a jednotlivé extrakty byly mezi sebou porovnány. Z výsledných hodnot bylo zjištěno, že nejvyšší množství fenolických látek vykazují extrakty s přidavkem kyseliny mravenčí. Při porovnávání naměřených dat bylo zjištěno, že jednotlivé extrakty se od sebe liší v závislosti na interakci fenolické látky s daným extrakčním činidlem. Nemůžeme tedy říci, jaký typ rozpouštědla je vhodný k celkové izolaci fenolických látek. Dále bylo zjištěno, že amarantové zrno obsahuje převážně fenolické kyseliny a jejich deriváty, zejména glykosidy. Zastoupení flavonoidů bylo minimální.

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na spektrofotometrickém stanovení antioxidační aktivity a celkového množství fenolických látek v různých extraktech volných fenolických látek (E1–E10) a extraktu získaného po kyselé hydrolýze. Jelikož byl každý extrakt připraven dvakrát, bylo analyzováno celkem 22 extraktů, které byly navzájem porovnány. Antioxidační aktivita byla měřena metodou ABTS a celkové množství fenolických látek metodou s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Pomocí těchto metod bylo zjištěno, že nejvyšší hodnoty antioxidační aktivity i celkového množství fenolických látek vykazují extrakty s přidavkem kyseliny mravenčí, naopak nejnižší hodnoty poskytovaly extrakty získané vícenásobnou extrakcí. Bylo také zjištěno, že amarantová zrna se vyznačují nízkým obsahem fenolických látek a jejich antioxidační aktivitou, bez ohledu na použitou extrakci.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BÉKÉS, Ferenc, Regine SCHOENLECHNER a Sándor TÖMÖSKÖZI. Ancient Wheats and Pseudocereals for Possible use in Cereal-Grain Dietary Intolerances. *Cereal Grains*. Elsevier, 2017, 353–389.
- [2] ALVAREZ-JUBETE, L., E. K. ARENDT a E. GALLAGHER. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends in Food Science & Technology*. 2010, 21(2), 106–113.
- [3] SCHOENLECHNER, Regine, Susanne SIEBENHANDL a Emmerich BERGHOFER. Pseudocereals. *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. 1st ed. Cambridge: Academic Press, 2008, s. 149–190.
- [4] PAŚKO, Paweł, Henryk BARTOŃ, Paweł ZAGRODZKI, Shela GORINSTEIN, Maria FOLTA a Zofia ZACHWIEJA. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry*. 2009, 115(3), 994–998.
- [5] ALVAREZ-JUBETE, L., H. WIJNGAARD, E.K. ARENDT a E. GALLAGHER. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chemistry*. 2010, 119(2), 770–778.
- [6] VALCÁRCEL-YAMANI, Beatriz a Suzana Caetano DA SILVA LANNES. Applications of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) and Amaranth (*Amaranthus* Spp.) and Their Influence in the Nutritional Value of Cereal Based Foods. *Food and Public Health*. 2012, 2(6), 265–275.
- [7] VENSKUTONIS, Petras R. a Paulius KRAUJALIS. Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013, 12(4), 381–412.
- [8] ARENDT, Elke K. a Emanuele ZANNINI. Amaranth. *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*. 1st ed. Sawston: Woodhead Publishing, 2013, s. 439–473.
- [9] Amaranth. *HerbaZest* [online]. 2020 [cit. 2020-02-21]. Dostupné z: <https://www.herbazest.com/herbs/amaranth>
- [10] TANG, Yao a Rong TSAO. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. *Mol. Nutr. Food Res*. 2017, 61(7), 1–16.

- [11] OPLETAL, Lubomír. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Svazek 3, Nutraceutika: sekundární metabolity rostlin. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2016.
- [12] STRATIL, Pavel a Vlastimil KUBÁŇ. *Reaktivní kyslíkové radikály, přírodní antioxidanty a jejich zdravotní účinky*. Český Těšín: 2 THETA, 2018.
- [13] DEY, Tapati Bhanja, Subhojit CHAKRABORTY, Kavish Kr. JAIN, Abha SHARMA a Ramesh Chander KUHAD. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2016, 53, 60–74.
- [14] CAI, Yizhong, Qiong LUO, Mei SUN a Harold CORKE. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*. 2004, 74(17), 2157–2184.
- [15] ANTOLOVICH, Michael, Paul D. PRENZLER, Emilos PATSALIDES, Suzanne MCDONALD a Kevin ROBARDS. Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*. 2001, 127(1), 183–198.
- [16] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy*. 2004, 98(4), 174–179.
- [17] PISOSCHI, Aurelia Magdalena a Gheorghe Petre NEGULESCU. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 2011, 1(1), 1–10.
- [18] VUOLO, Milena Morandi, Verena Silva LIMA a Mário Roberto MARÓSTICA JUNIOR. Phenolic Compounds. *Bioactive Compounds*. Elsevier, 2019, 33–50.
- [19] CHEDEA, Veronica Sanda a Raluca Maria POP. Total Polyphenols Content and Antioxidant DPPH Assays on Biological Samples. *Polyphenols in Plants*. 2019, 169–183.
- [20] PANDEY, Kanti Bhooshan a Syed Ibrahim RIZVI. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009, 2(5), 270–278.
- [21] ALAM, Md. Nur, Nusrat Jahan BRISTI a Md. RAFIQUZZAMAN. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, 21(2), 143–152.
- [22] NEMZER, Boris, Yi LIN a Dejian HUANG. Antioxidants in sprouts of grains. *Sprouted Grains*, 2019, 55–68.

- [23] STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 2007, 30(18), 3268–3295.
- [24] GHARAATI JAHROMI, Shadab. Extraction Techniques of Phenolic Compounds from Plants. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. IntechOpen, 2019, 2019-9-4. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/books/plant-physiological-aspects-of-phenolic-compounds/extraction-techniques-of-phenolic-compounds-from-plants>
- [25] SCALBERT, Augustin, Ian T JOHNSON a Mike SALTMARSH. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005, 81(1), 215–217.
- [26] RICE-EVANS, Catherine A., Nicholas J. MILLER a George PAGANGA. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996, 20(7), 933–956.
- [27] Flavonoids. *Oregon State University* [online]. 2015 [cit. 2020-02-25]. Dostupné z: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>
- [28] CHEN, Liang-Yu, Chien-Wei CHENG a Ji-Yuan LIANG. Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*. 2015, 170, 10–15.
- [29] NIREESHA, GR., L. DIVYA, C. SOWMYA, N. VENKATESHAN, M. NIRANJAN BABU a V. LAVAKUMAR. Lyophilization/Freeze Drying – An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Science*. 2013, 3(4), 87–98.
- [30] NARDINI, M. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*. 2002, 79(1), 119–124.
- [31] ROSS, K.A., T. BETA a S.D. ARNTFIELD. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*. 2009, 113(1), 336–344.
- [32] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 2004. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [33] CHURÁČEK, Jaroslav. *Analytická separace látek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
- [34] CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0010-0.

- [35] OPEKAR, František. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-246-0553-8.
- [36] MALVIYA, R., V. BANSAL, O. P. PAL a P. K. SHARMA. High Performance Liquid Chromatography: A Short Review. *Journal of Global Pharma Technology*. 2010, 2(5), 22–26.
- [37] SIGMA–ALDRICH. *HPLC Troubleshooting Guide: How to identify, isolate, and correct the most common HPLC problems*. 2009 [cit. 2020-02-25]. Dostupné také z: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Bulletin/4497.pdf>
- [38] HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní spektrometrie [online]. Mass spektrometry group, Univerzita Pardubice. 2019 [cit. 2020-02-20].
- [39] HOLČAPEK, Michal. *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS): sborník přednášek kurzu HPLC/MS pořádaného 5.-7.11. 2001 v Kongresové hale Univerzity Pardubice*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-390-8.
- [40] FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* 2012, 20(41), 152–157.
- [41] HANUŠ, V., Z. HERMAN a K. LEMR. Hmotnostní spektrometrie a velké molekuly: Ionizační metody analýzy biologických makromolekul. *Vesmír*. 2003, 6, 312–313.
- [42] Quadrupole Mass Analysis. *University of Bristol: SCHOOL OF CHEMISTRY Mass Spectrometry Facility* [online]. United Kingdom, 2014 [cit. 2020]. Dostupné z: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml>
- [43] SADÍLEK, M. Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy*. 2020, 114(2), 133–144.
- [44] HOFFMANN, Edmond de. Tandem mass spectrometry: A primer. *JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY*. 1996, 31(2), 129–137.
- [45] KLAPKOVÁ, E., R. UŘINOVSÁ a R. PRŮŠA. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Klin. Biochem. Metab.* 2011, 19(40), 5–8.

- [46] PAŠKO, P., M. SAJEWICZ, S. GORINSTEIN a Z. ZACHWIEJA. Analysis of selected phenolic acids and flavonoids in *Amaranthus cruentus* and *Chenopodium quinoa* seeds and sprouts by HPLC. *Acta Chromatographica*. 2008, 20(4), 661-672.
- [47] KLIMCZAK, I., M. MAŁECKA a B. PACHOLEK. Antioxidant activity of ethanolic extracts of amaranth seeds. *Nahrung/Food*. 2002, 46(3), 184–186.
- [48] PEIRETTI, Pier Giorgio, Giorgia MEINERI, Francesco GAI, Erica LONGATO a Ryszard AMAROWICZ. Antioxidative activities and phenolic compounds of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seeds and amaranth (*Amaranthus caudatus*) grain extracts. *Natural Product Research*. 2017, 31(18), 2178–2182.
- [49] VOLLMANNOVÁ, A., E. MARGITANOVÁ, T. TÓTH, M. TIMORACKÁ, D. URMINSKÁ, T. BOJŇANSKÁ a I. ČIČOVÁ. Cultivar Influence on Total Polyphenol and Rutin Contents and Total Antioxidant Capacity in Buckwheat, Amaranth, and Quinoa Seeds. *Czech Journal of Food Sciences*. 2013. 31, 589–595.
- [50] PERALES-SÁNCHEZ, Janitzio X. K., Cuauhtémoc REYES-MORENO, Mario A. GÓMEZ-FAVELA, Jorge MILÁN-CARRILLO, Edith O. CUEVAS-RODRÍGUEZ, Angel VALDEZ-ORTIZ a Roberto GUTIÉRREZ-DORADO. Increasing the Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Contents by Optimizing the Germination Conditions of Amaranth Seeds. *Plant Foods Hum Nutr*. 2014, 69(3), 196–202.
- [51] LÓPEZ-MEJÍA, O. Araceli, Aurelio LÓPEZ-MALO a Enrique PALOU. Antioxidant capacity of extracts from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seeds or leaves. *Industrial Crops and Products*. 2014, 53, 55–59.
- [52] GORINSTEIN, Shela, Oscar J. Medina VARGAS, Nicolas O. JARAMILLO, et al. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. *European Food Research and Technology*. 2007, 225(2–4), 321–328.
- [53] PAZINATTO, Caroline, Luciana Gomes MALTA, Gláucia Maria PASTORE a Flavia Maria NETTO. Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology*. 2013, 33(3), 485–493.
- [54] OGRODOWSKA, D., S. CZAPLICKI, R. ZADERNOWSKI, P. MATTILA, J. HELLSTRÖM a M. NACZK. Phenolic acids in seeds and products obtained from *Amaranthus cruentus*. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2012, 51(2), 96–101.

- [55] PALOMBINI, Sylvio Vicentin, Thiago CLAUS, Swami Arêa MARUYAMA, et al. Evaluation of nutritional compounds in new amaranth and quinoa cultivars. *Food Science and Technology*. 2013, 33(2), 339–344.
- [56] DRZEWIECKI, J., A. L. MARTINEZ-AYALA, M. A LOZANO-GRANDE, H. LEONTOWICZ, M. LEONTOWICZ, Z. JASTRZEBSKI, P. PASKO a S. GORINSTEIN. In Vitro Screening of Bioactive Compounds in some Gluten-Free Plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018, 1–14.
- [57] BUNZEL, Mirko, John RALPH a Hans STEINHART. Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005, 49(6), 551–559.
- [58] STEFFENSEN, Stine Krogh, Åsmund RINNAN, Anne G. MORTENSEN, et al. Variations in the polyphenol content of seeds of field grown *Amaranthus* genotypes. *Food Chemistry*. 2011, 129(1), 131–138.
- [59] PAUCAR-MENACHO, Luz María, Elena PEÑAS, Montserrat DUEÑAS, Juana FRIAS a Cristina MARTÍNEZ-VILLALUENGA. Optimizing germination conditions to enhance the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) using response surface methodology. *LWT – Food Science and Technology*. 2017, 79, 245–252.
- [60] PAŚKO, PAWEŁ, HENRYK BARTOŃ, MARIA FOŁTA a JADWIGA GWIŹDŹ. Evaluation of Antioxidant Activity of Amaranth (*Amaranthus Cruentus*) Grain and By-Products (Flour, Popping, Cereal). *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. 2007, 58(1), 35–40.
- [61] OZSOY, N., T. YILMAZ, O. KURT, A. CAN a R. YANARDAG. In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L. *Food Chemistry*. 2009, 116(4), 867-872.
- [62] KUMAR, B. Ramesh. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2017, 7(6), 349–364.
- [63] BARBA DE LA ROSA, Ana Paulina, Antonio DE LEÓN-RODRÍGUEZ, Bente LAURSEN a Inge S. FOMSGAARD. Influence of the growing conditions on the flavonoids and phenolic acids accumulation in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves. *REVISTA TERRA LATINOAMERICANA*. 2019, 37(4), 449–457.

- [64] KARAMAĆ, Magdalena, Francesco GAI, Erica LONGATO, Giorgia MEINERI, Michał A. JANIĄK, Ryszard AMAROWICZ a Pier Giorgio PEIRETTI. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Amaranth (*Amaranthus caudatus*) during Plant Growth. *Antioxidants*. 2019, 8(6), 1–14.
- [65] ARIGÒ, Adriana, Petr ČESLA, Petra ŠILAROVÁ, Maria Luisa CALABRÒ a Lenka ČESLOVÁ. Development of extraction method for characterization of free and bonded polyphenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in Czech Republic using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2018, 245, 829–837.
- [66] HOFMEISTER, Pavel. *Vliv úpravy vzorku na obsah a zastoupení fenolických látek v obilovinách*. Pardubice, 2017. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.

PŘÍLOHY

Tabulky

Tabulka P1 – Zastoupení fenolických látek v extraktech amarantových zrn, průměrná plocha A/1000.

Značení	Látka	E1	E2	E3	E4	E5
1	Glykosid 4-HBA	7 572	7 435	7 332	6 216	7 493
2	Glykosid 4-HBA	7 174	6 828	6 646	5 205	7 120
3	Glykosid vanilové k.	8 692	8 195	8 857	7 699	8 385
4	3,4-DHBA	210,5	156,5	197,7	192,6	193,1
5	Glykosid vanilové k.	641,6	600,9	656,6	586,5	594,1
6	Glykosid 4-HBA	260,4	315,3	275,7	215,5	320,8
7	Glykosid ferulové k.	98,54	55,48	88,62	65,97	36,52
8	Glykosid 4-HBA	562,6	674,2	569,1	448,8	698,5
9	Glykosid 4-HBA	762,1	964,9	798,1	612,3	996,4
10	Glykosid vanilové k.	29,55	33,65	28,44	23,51	33,63
11	Glykosid vanilové k.	32,95	36,88	29,63	24,39	37,12
12	Glykosid vanilové k.	5 720	3 493	5 516	5 065	4 397
13	4-HBA	2 282	2 083	2 241	2 035	2 222
14	Glykosid ferulové k.	1 603	1 496	1 564	1 360	1 576
15	Kávová k.	213,1	111,4	195,1	197,8	163,1
16	Vanilová k.	–	–	–	–	–
17	Kaffeoylchinová k.	404,6	122,3	433,3	439,4	251,6
18	Kaffeoylchinová k.	37,66	18,89	35,41	34,27	10,54
19	Rutin	200,5	239,2	218,4	192,9	239,2
20	Kumaroylchinová k.	1 071	383,3	1 131	1 085	756,9
21	<i>p</i> -kumarová k.	949,1	727,3	813,3	829,1	1 011
22	Isokvercitrin	1,58	2,33	2,01	1,61	2,19
23	Kumaroylchinová k.	455,9	211,5	432,8	363,3	190,8
24	Feruoylchinová k.	750,1	270,7	759,8	755,2	527,3
25	Kaempferol-rutinosid	432,9	431,9	461,8	384,3	323,6
26	Feruoylchinová k.	375,1	192,9	364,7	284,1	137,7
27	Ferulová k.	36,18	26,97	33,45	33,49	36,15
28	Ferulová k.	36,43	41,48	33,78	27,82	25,11
29	Myricetin	–	–	–	–	–
30	Salicylová k.	–	–	–	–	–
31	Kvercetin	1,12	1,06	–	–	1,12
32	Kaempferol	–	–	–	–	–

Značení	Látka	E6	E7	E8	E9	E10
1	Glykosid 4-HBA	5 675	5 997	4 392	7 444	3 685
2	Glykosid 4-HBA	5 174	4 962	363,3	346,68	1 846
3	Glykosid vanilové k.	7 098	6 880	3 925,6	6 786	3 070
4	3,4-DHBA	199,2	205,2	262,3	304,9	246,2
5	Glykosid vanilové k.	567,6	542,4	81,56	143,2	172,9
6	Glykosid 4-HBA	215,8	206,7	10,31	15,18	28,02
7	Glykosid ferulové k.	36,38	50,93	26,01	49,81	54,17
8	Glykosid 4-HBA	497,3	478,9	24,22	32,37	87,26
9	Glykosid 4-HBA	685,6	665,3	54,43	73,11	141,6
10	Glykosid vanilové k.	23,17	23,24	1,17	1,64	3,54
11	Glykosid vanilové k.	27,99	27,26	2,03	2,52	5,08
12	Glykosid vanilové k.	4 566	4 698	2 959	4 708	4 125
13	4-HBA	1 878	1 935	6 909	8 211	2 089
14	Glykosid ferulové k.	1 288	1 209	223,9	274,7	525,9
15	Kávová k.	203,9	200,4	117,6	107,9	131,2
16	Vanilová k.	–	–	–	–	–
17	Kaffeoylchinová k.	477,3	437,5	89,31	162,3	214,1
18	Kaffeoylchinová k.	21,75	30,62	21,79	40,22	51,39
19	Rutin	227,3	219,3	41,87	51,53	71,98
20	Kumaroylchinová k.	1 140	1 029	333,3	549,8	757,6
21	<i>p</i> -kumarová k.	832,7	815,2	931,5	961,1	959,9
22	Isokvercitrin	2,22	2,05	0,64	0,74	1,06
23	Kumaroylchinová k.	236,8	307,6	168,1	278,2	440,9
24	Feruoylchinová k.	782,7	683,3	206,5	329,8	423,1
25	Kaempferol-rutinosid	388,5	385,8	77,04	111,1	180,6
26	Feruoylchinová k.	141,9	212,7	152,1	216,7	348,1
27	Ferulová k.	31,26	28,06	24,31	23,98	21,26
28	Ferulová k.	25,52	23,06	29,19	27,64	37,16
29	Myricetin	–	–	–	–	–
30	Salicylová k.	–	–	–	–	–
31	Kvercetin	1,06	–	–	–	–
32	Kaempferol	–	–	–	–	–

Značení	Látka	Alkalická hydrolyza	Kyselá hydrolyza	Alkalická hydrolyza pevného podílu	Alkalická hydrolyza vodného podílu	Kyselá hydrolyza vodného podílu
1	Glykosid 4-HBA	1 989	1 296	55,74	2 898	475,1
2	Glykosid 4-HBA	57,25	3,25	0,49	25,52	–
3	Glykosid vanilové k.	1 465	315,69	23,11	2 333	59,94
4	3,4-DHBA	1 401	1 288	1 014	235,6	498,3
5	Glykosid vanilové k.	–	–	–	–	–
6	Glykosid 4-HBA	–	–	–	–	–
7	Glykosid ferulové k.	9,64	2,14	2,05	12,99	–
8	Glykosid 4-HBA	–	–	–	–	–
9	Glykosid 4-HBA	–	–	–	–	–
10	Glykosid vanilové k.	–	–	–	–	–
11	Glykosid vanilové k.	–	–	–	–	–
12	Glykosid vanilové k.	51,24	4 938	–	51,56	–
13	4-HBA	20 518	22 001	3 811	7 103	20 053
14	Glykosid ferulové k.	79,72	7,84	–	7,5	–
15	Kávoová k.	6 843	1 074	4 123	336,4	200,3
16	Vanilová k.	37,89	138,1	–	–	121,56
17	Kaffeoylchinová k.	–	235,1	–	1,27	52,68
18	Kaffeoylchinová k.	–	13,21	–	–	–
19	Rutin	14,53	3,04	–	19,69	–
20	Kumaroylchinová k.	49,05	1 048	–	–	–
21	<i>p</i> -kumarová k.	8 983	5 455	6 773	1 011	149,1
22	Isokvercitrin	1,52	0,26	–	–	–
23	Kumaroylchinová k.	–	153,47	–	–	–
24	Feruoylchinová k.	3,96	546,2	–	–	–
25	Kaempferol-rutinosid	72,77	8,36	–	61,81	–
26	Feruoylchinová k.	4,29	92,27	–	–	–
27	Ferulová k.	4 150	691,3	4 788	197,99	24,18
28	Ferulová k.	4 019	386,2	2 882	214,84	–
29	Myricetin	–	–	–	–	–
30	Salicylová k.	656,1	466	–	–	–
31	Kvercetin	8,84	145,9	1,52	3,42	44,21
32	Kaempferol	–	26,31	–	–	7,74

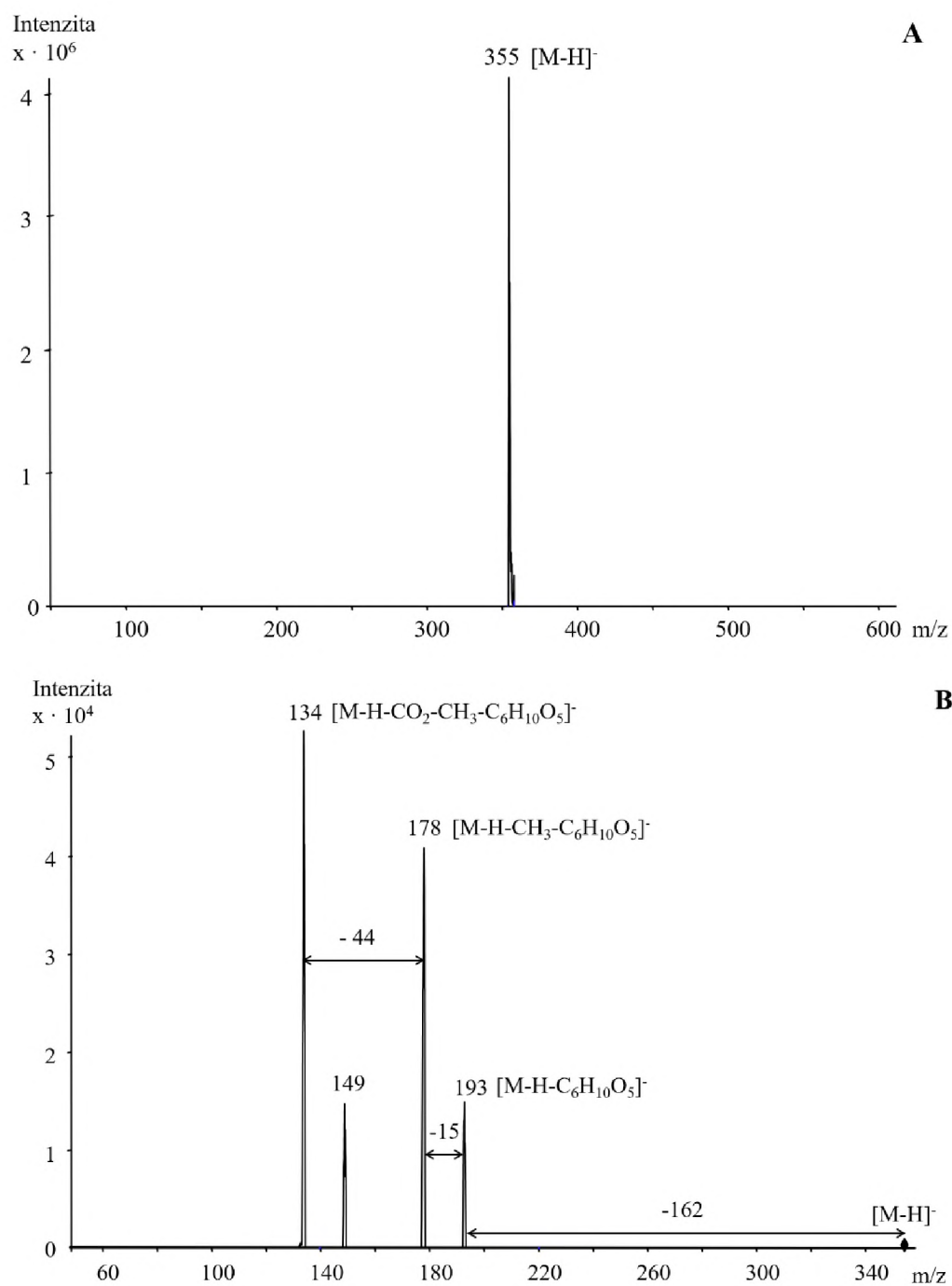
Tabulka P2 – Průměrné hodnoty TEAC fenolických látek v extraktech amarantových zrn.

Značení	c [$\mu\text{mol/g}$ vzorku]
E1	$0,9571 \pm 0,0251$
E2	$0,8773 \pm 0,0279$
E3	$0,9427 \pm 0,034$
E4	$1,0093 \pm 0,0339$
E5	$0,8698 \pm 0,0479$
E6	$0,9367 \pm 0,0159$
E7	$0,9165 \pm 0,0549$
E8	$0,4893 \pm 0,0695$
E9	$0,6301 \pm 0,0883$
E10	$0,4131 \pm 0,0487$
Extrakt po kyselé hydrolyze	$0,8731 \pm 0,165$

Tabulka P3 – Průměrné hodnoty celkového množství fenolických látek v extraktech amarantových zrn.

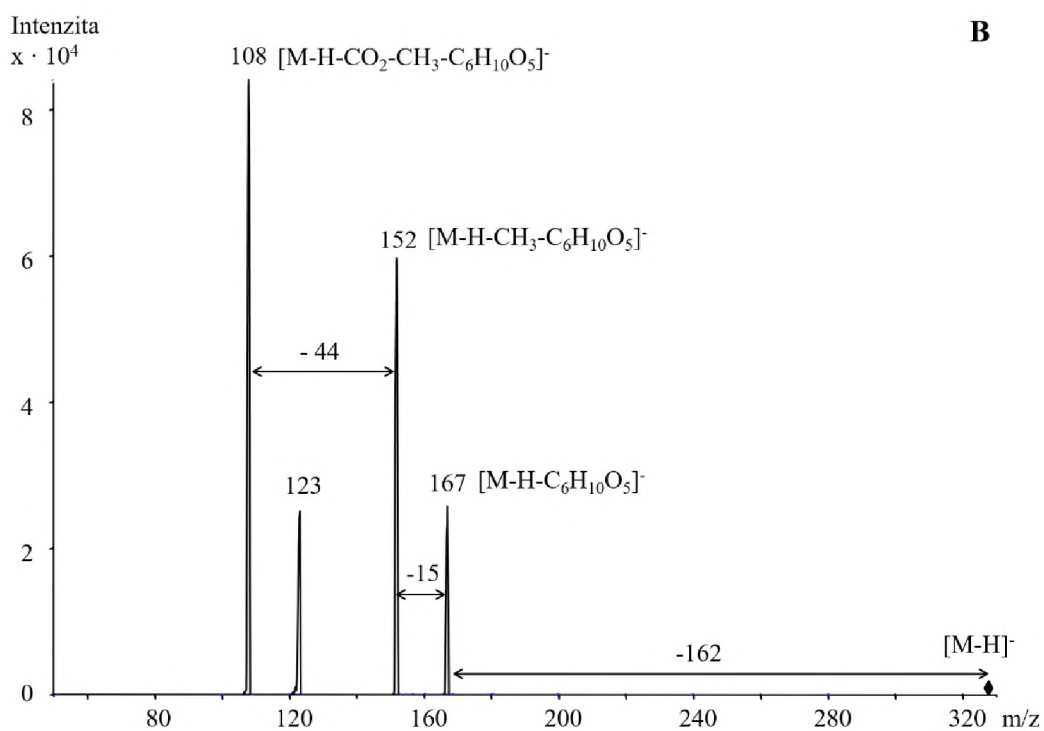
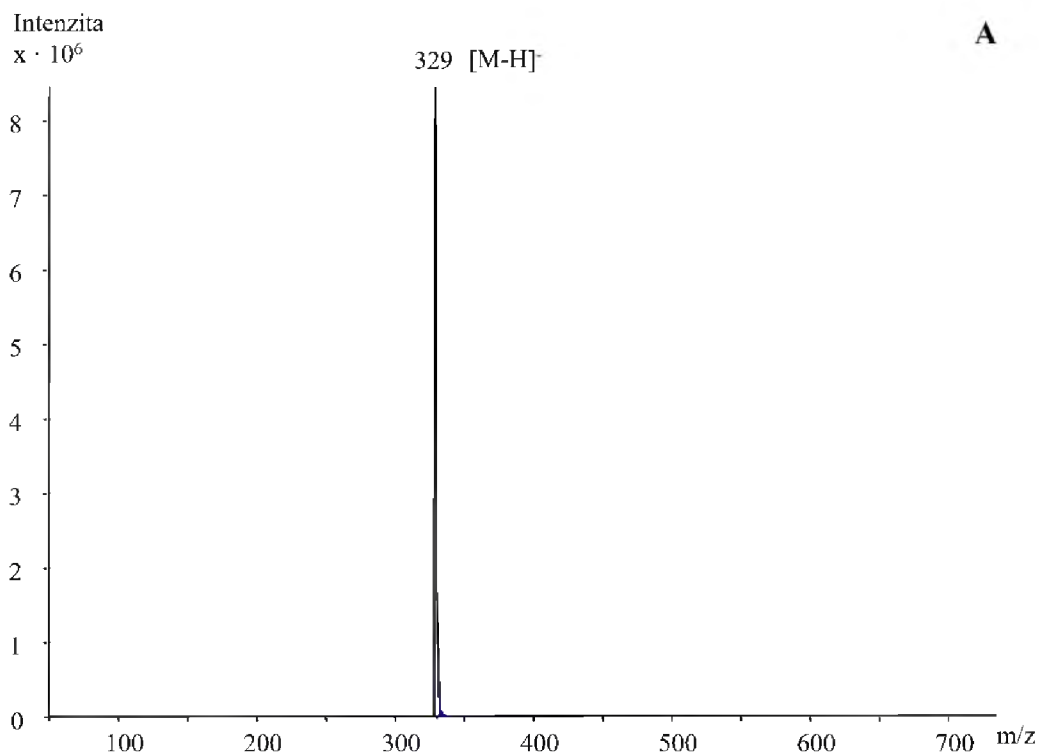
Značení	c [mg/g vzorku]
E1	$0,4694 \pm 0,0136$
E2	$0,2868 \pm 0,01$
E3	$0,4964 \pm 0,0167$
E4	$0,4952 \pm 0,0196$
E5	$0,3111 \pm 0,0138$
E6	$0,4264 \pm 0,0184$
E7	$0,4229 \pm 0,0208$
E8	$0,1344 \pm 0,0188$
E9	$0,2053 \pm 0,0375$
E10	$0,1201 \pm 0,0123$
Extrakt po kyselé hydrolyze	$0,2881 \pm 0,0548$

Obrázky



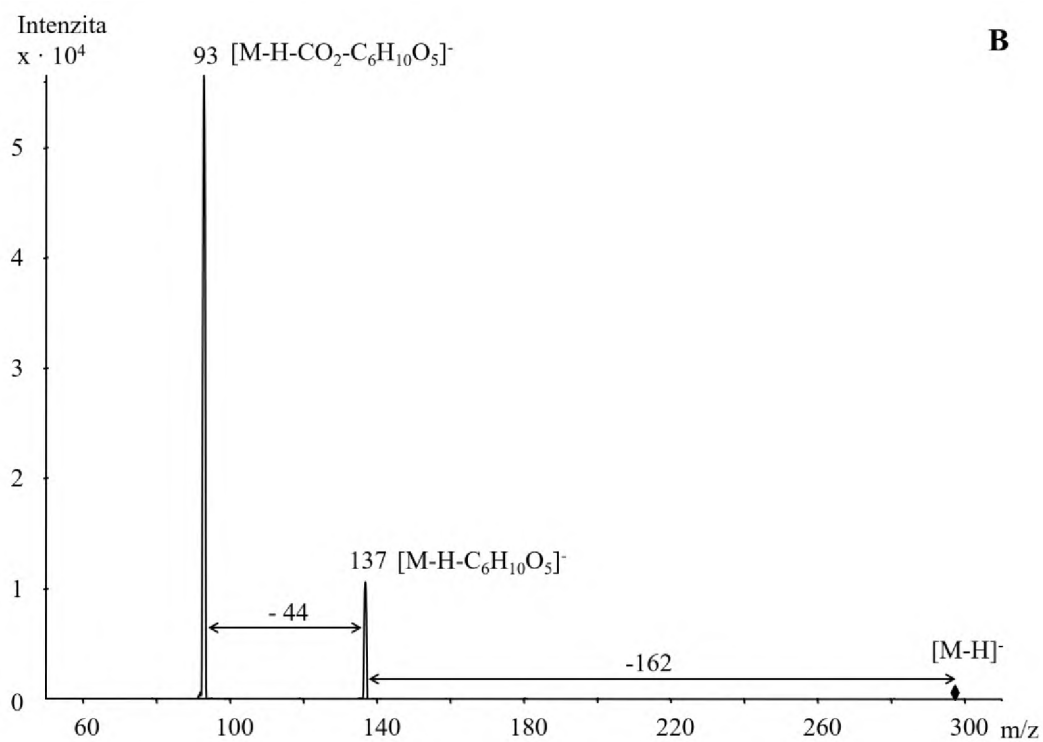
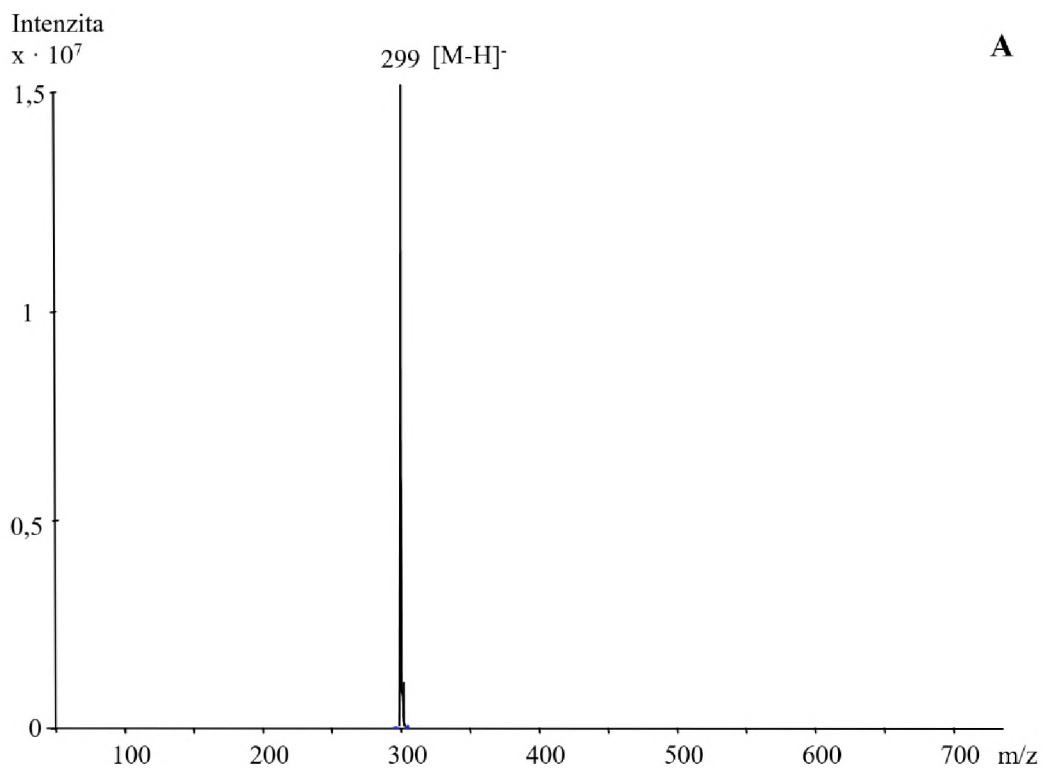
Obrázek P1 – Hmotnostní spektrum glykosidu k. ferulové ($m/z = 355$) získané ESI⁻ ionizací.

- A. MS spektrum
- B. MS/MS spektrum



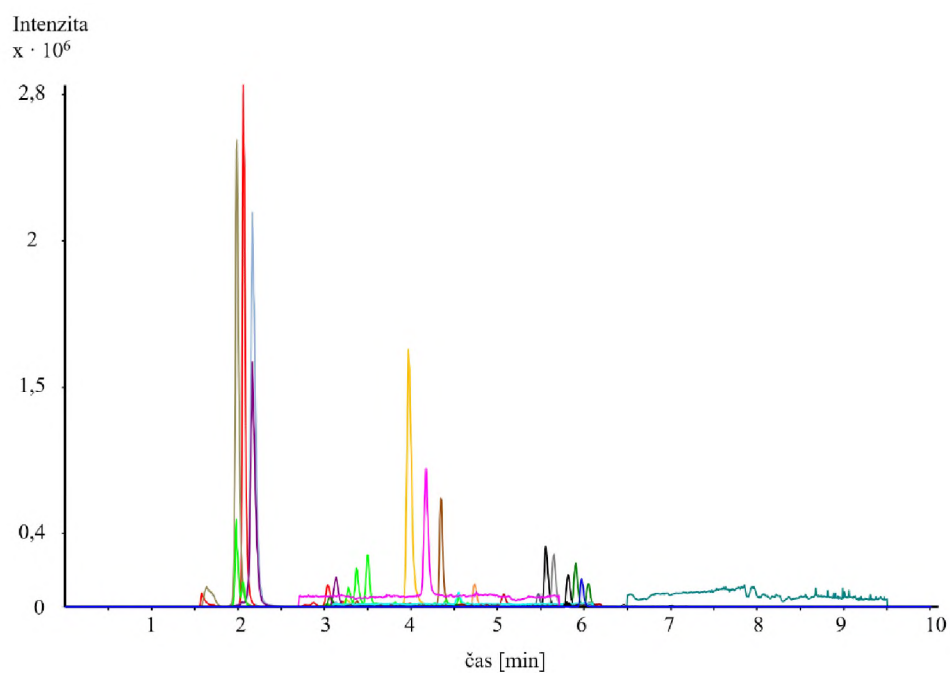
Obrázek P2 – Hmotnostní spektrum glykosidu k. vanilové ($m/z=329$) získané ESI⁻ ionizací.

- A. MS spektrum
- B. MS/MS spektrum



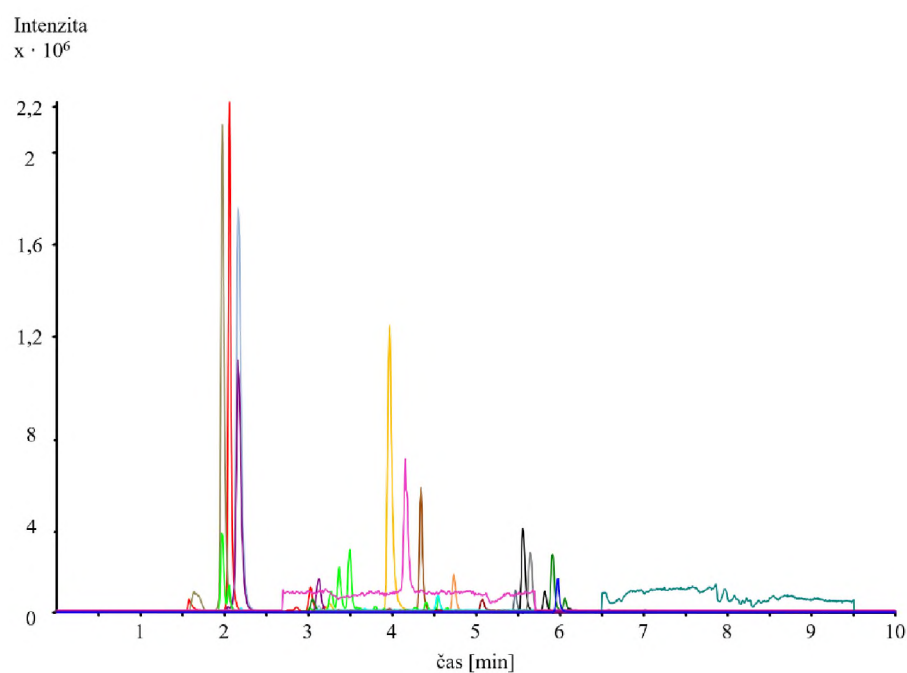
Obrázek P3 – Hmotnostní spektrum glykosidu k. 4-hydroxybenzoové ($m/z=299$) získané ESI⁻ ionizací.

- A. MS spektrum
- B. MS/MS spektrum



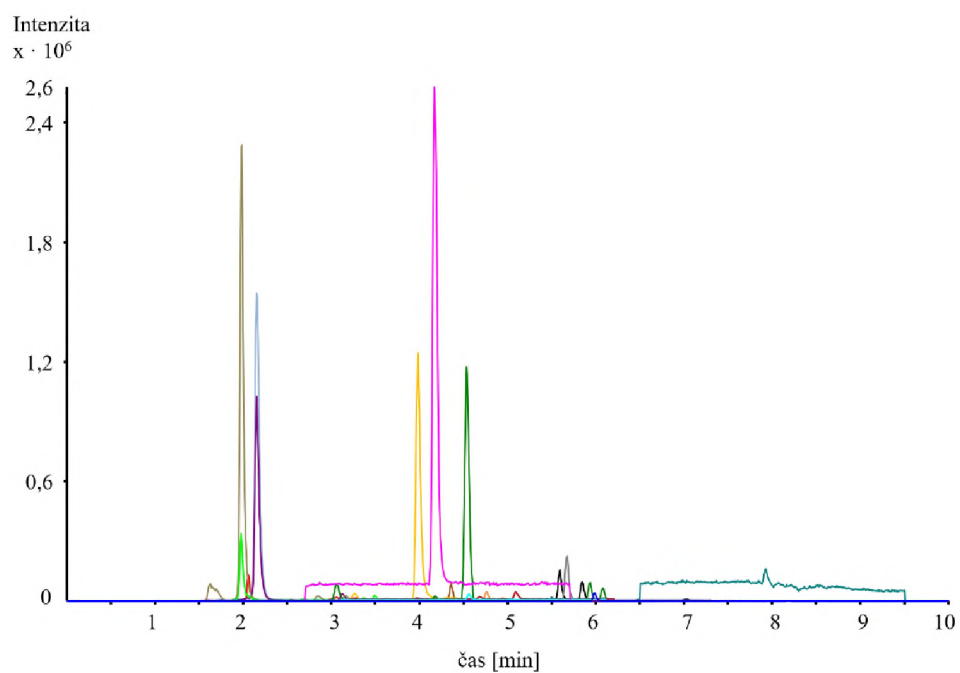
Obrázek P4 – Optimalizovaná separace extraktu E1.

Kolona: Ascentis Express C18 (150 × 3,0 mm × 2,7 μm); mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43); gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μl; teplota kolony: 40 °C; detekce: ESI⁻/MS; MRM přechody viz Tabulka 10.



Obrázek P5 – Optimalizovaná separace extraktu E6.

Kolona: Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm); mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43); gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μl; teplota kolony: 40 °C; detekce: ESI⁻/MS; MRM přechody viz Tabulka 10.



Obrázek P6 – Optimalizovaná separace extraktu E9.

Kolona: Ascentis Express C18 (150 mm × 3,0 mm × 2,7 μm); mobilní fáze: ACN/H₂O + HCOOH (pH 2,43); gradient: 0 minut – 10 % ACN, 6 min – 37 % ACN, 7 min – 100 % ACN; průtok: 0,4 ml/min; dávkování: 2 μl; teplota kolony: 40 °C; detekce: ESI⁻/MS; MRM přechody viz Tabulka 10.