

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. Michaela Krocová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

HPLC/MS/MS analýza volných a vázaných fenolických látek obsažených
v merlíku čilském

Diplomová práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Krocová**
Osobní číslo: **C23251**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **HPLC/MS/MS analýza volných a vázaných fenolických látek obsažených v merlíku čilském**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

- Vypracujte literární rešerši se zaměřením na využití kapalinové chromatografie a jejího spojení s hmotnostní spektrometrií v analýze volných a vázaných fenolických látek obsažených v merlíku čilském (quinoa). Zaměřte se rovněž na různé způsoby extrakce volných a vázaných fenolických látek před jejich kvalitativní a kvantitativní analýzou. Dále se věnujte spektrofotometrickým technikám pro sledování celkové antioxidační aktivity vzorku.
- Na základě literární rešerše zvolte vhodné spektrofotometrické metody pro určení celkové antioxidační kapacity vzorku či celkového obsahu látek s antioxidačními vlastnostmi. Metody použijte pro stanovení antioxidačních vlastností extraktů připravených z merlíku čilského a výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.
- Identifikujte významné volné a vázané fenolické látky obsažené v merlíku čilském a proveďte optimalizaci jejich chromatografické separace a hmotnostně spektrometrické detekce s využitím MRM přechodů. Optimalizovanou HPLC/MS/MS metodu využijte pro kvantitativní analýzu volných a vázaných fenolických látek obsažených v extraktech připravených z různých vzorků merlíku čilského.
- Porovnejte a diskutujte obsah a zastoupení fenolických látek v jednotlivých barevných odrůdách merlíku čilského. Dále diskutujte zastoupení jednotlivých fenolických látek v extraktech po provedení hydrolyzy. 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: **prof. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2025**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem HPLC/MS/MS analýza volných a vázaných fenolických látek obsažených v merlíku čilském jsem 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 09. 05. 2025

Bc. Michaela Krocová v. r.

Poděkování:

Ráda bych touto cestou vyjádřila upřímné poděkování své vedoucí diplomové práce, paní prof. Ing. Lence Česlové, Ph.D., za její odborné vedení, cenné rady a podporu během celého procesu tvorby této práce. Velmi si vážím jejího času, trpělivosti a užitečných připomínek, které významně přispěly k prohloubení mého výzkumu i odborného rozvoje. Dále děkuji své rodině a přítelovi za jejich podporu, trpělivost a povzbuzení během mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zaměřuje na stanovení volných a vázaných fenolických látek v různých extraktech získaných ze semen quinoj. Pro uvolnění vázaných fenolických látek byly využity metody alkalické a kyselé hydrolyzy. Analýza všech extraktů probíhala s využitím optimalizované HPLC separace v systémech s obrácenými fázemi. Pro detekci byla využita tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) v MRM režimu snímání záporných iontů. Pro jednotlivé fenolické látky byly optimalizovány MRM přechody pro dosažení vyšší citlivosti a přesnosti detekce. Optimalizovaná HPLC/MS/MS metoda byla použita pro monitorování zastoupení identifikovaných volných a vázaných fenolických látek v různých vzorcích quinoj. Množství fenolických látek stanovené pomocí HPLC/MS/MS metody bylo porovnáno s výsledky získanými spektrofotometrickými metodami.

KLÍČOVÁ SLOVA

Merlík čilský, fenolické látky, extrakce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, antioxidační aktivita

TITLE

HPLC/MS/MS analysis of free and bonded phenolic compounds present in Quinoa

ANNOTATION

This thesis focuses on the determination of free and bound phenolic compounds in various extracts obtained from quinoa seeds. Alkaline and acid hydrolysis methods were used to release the bound phenolic compounds. Analysis of all extracts was carried out using optimized HPLC separation in reversed-phase systems. Tandem mass spectrometry (MS/MS) in MRM negative ion sensing mode was used for detection. MRM transitions were optimized for individual phenolics to achieve higher sensitivity and accuracy of detection. The optimized HPLC/MS/MS method was used to monitor the abundance of identified free and bound phenolic compounds in different quinoa samples. The amount of phenolic compounds determined by HPLC/MS/MS method was compared with the results obtained by spectrophotometric methods.

KEYWORDS

Quinoa, phenolic compounds, extraction, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, antioxidant activity

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD.....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1 Pseudoobiloviny.....	14
1.2 Quinoa.....	15
1.1.2 Klasifikace	16
1.1.3 Saponiny	16
1.1.4 Chemické složení.....	17
1.3 Antioxidanty	19
1.3.1 Fenolické látky.....	20
1.4 Stanovení antioxidační kapacity	23
1.4.1 Metoda DPPH	23
1.4.2 Metoda ABTS	24
1.4.3 Metoda FRAP	24
1.5 Úprava vzorku před analýzou.....	25
1.5.1 Mletí a homogenizace.....	25
1.5.2 Hydrolýza fenolických látek.....	25
1.5.3 Extrakce	26
1.6 Extrakční metody.....	26
1.6.1 Extrakce pevná fáze – kapalina a kapalina-kapalina	26
1.6.2 Soxhletova extrakce.....	26
1.6.3 Extrakce nadkritickou tekutinou	27
1.7 Chromatografické metody	28
1.7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	29
1.8 Hmotnostní spektrometrie.....	30
1.8.1 Iontový zdroj.....	31
1.8.2 Hmotnostní analyzátoři	33
1.8.3 Detektory	35
1.9 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií	36
1.10 Analýza fenolických látek obsažených v quinoe či jiných pseudoobilovinách.....	37
1.10.1 Příprava vzorků k analýze.....	37
1.10.2 Stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC/MS metody	38
1.10.3 Stanovení antioxidační kapacity a celkového množství fenolických látek.....	40

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
2.1 Přístroje a zařízení	41
2.2 Použité chemikálie	42
2.3 Standardy	43
2.4 Vzorky	44
2.5 Pracovní postupy.....	45
2.5.1 Příprava vzorků.....	45
2.5.2 Spektrofotometrické metody.....	46
2.5.3 HPLC/MS/MS analýza	47
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	50
3.1 Optimalizace HPLC/MS	50
3.2 Identifikace fenolických látek ve vzorcích quinoových zrn	52
3.3 Optimalizace MRM přechodů	53
3.4 Porovnání fenolických látek v jednotlivých extraktech.....	57
3.5 Kvantifikace fenolických látek	61
3.6 Stanovení antioxidační kapacity	65
3.7 Stanovení celkového množství fenolických látek.....	67
ZÁVĚR	69
POUŽITÁ LITERATURA	70
PŘÍLOHY	77

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Zástupci pseudoobilovin.	14
Obrázek 2: Rostlina merlíku čilského.	15
Obrázek 3: Barevná rozmanitost semen quinooy.	16
Obrázek 4: Chemická struktura saponinu extrahovaných ze slupek quinooy.	16
Obrázek 5: Struktura kyselin odvozených od kyseliny benzoové.	20
Obrázek 6: Struktura kyselin odvozených od kyseliny skořicové.	21
Obrázek 7: Základní struktura flavonoidů.	22
Obrázek 8: Strukturní vzorec DPPH (vlevo) a strukturní vzorec Troloxu (vpravo).	23
Obrázek 9: Strukturní vzorec ABTS.	24
Obrázek 10: Strukturní vzorec TPTZ.	24
Obrázek 11: Soxhletův extraktor.	27
Obrázek 12: Fázový diagram v p-T souřadnicích s vyznačením oblasti nadkritické tekutiny.	28
Obrázek 13: Schéma HPLC.	30
Obrázek 14: Obecné schéma hmotnostního spektrometru.	31
Obrázek 15: Ionizace elektrosprejem.	33
Obrázek 16: Princip normálního a MS/MS skenovacího režimu u trojitého kvadrupólu.	35
Obrázek 17: Vzorky quinoových zrn.	44
Obrázek 18: Optimalizovaná separace studovaných fenolických látek.	51
Obrázek 19: MS/MS spektrum glykosidu kyseliny ferulové (m/z= 355, ESI).	52
Obrázek 20: Optimalizace deklasteračního potenciálu pro sloučeninu o m/z 755.	53
Obrázek 21: Optimalizace kolizní energie pro m/z 329 (glykosid kyseliny vanilové).	54
Obrázek 22: Optimalizace CXP pro m/z 595 (derivát kvercetinu).	55
Obrázek 23: Separace volných fenolických látek ve vzorku červené quinooy.	58
Obrázek 24: Separace látek po alkalické hydrolyze ve vzorku červené quinooy.	59
Obrázek 25: Separace látek po kyselé hydrolyze ve vzorku červené quinooy.	60
Obrázek 26: Antioxidační kapacita jednotlivých extraktů měřená metodou ABTS.	66
Obrázek 27: Stanovení celkového množství fenolických látek.	67
Tabulka 1: Chemické složení quinoové celozrnné mouky ve srovnání s amarantovou a pohankovou celozrnnou moukou.	17
Tabulka 2: Nutriční složení listů, klíčků a zrn quinooy.	18
Tabulka 3: Přehled volných radikálů.	19
Tabulka 4: Referenční standardy fenolických kyselin a flavonoidů (Sigma Aldrich, USA).	43
Tabulka 5: Přehled vzorků quinooy.	44
Tabulka 6: Optimalizovaný gradient.	48
Tabulka 7: Optimalizované MRM přechody pro HPLC/MS/MS analýzu fenolických látek.	56
Tabulka 8: Regresní parametry kalibračních křivek, limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) pro vybrané referenční standardy fenolických látek.	61
Tabulka 9: Koncentrace jednotlivých fenolických látek (μg/g) ve vzorcích quinooy (V1–V6) po extrakci volných fenolických sloučenin.	64
Tabulka 10: Souhrnný obsah fenolických látek (μg/g) ve vzorcích quinooy.	65

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A	absorbance
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethyl-2, 3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
BHA	butylovaný hydroxytoluen
BHT	butylovaný hydroxyanizol
C18	oktadecylsilikagel
CE	kolizní energie
CI	chemická ionizace
CXP	výstupní potenciál kolizní cely
DHB	3,4- dihydroxybenzoová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DP	deklasterační potenciál
DPPH	1,1'-difenyl-2-pikrylhydrazyl
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FRAP	měření antioxidační kapacity pomocí železitých iontů
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GAE	ekvivalentní množství kyseliny gallové
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
HBA	<i>p</i> -hydroxybenzoová kyselina
HMF	5- hydroxymethylfurfural
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MF	mobilní fáze
MMF	5-methoxymethylfurfural
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MRM	monitorování hmotnostních přechodů vybraných iontů
ORAC	metoda založená na zhášení kyslíkových radikálů
PTFE	polytetrafluoroethylen
QqQ	trojitý kvadrupól
RIC	rekonstruovaný iontový chromatogram

RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
SFE	extrakce nadkritickou tekutinou
SIM	selektivní záznam iontů
SPE	extrakce tuhou fází
SRM	monitorování vybraného hmotnostního přechodu
TEAC	celková antioxidační aktivita vztažená ke standardní látce Troloxu
TIC	celkový iontový chromatogram
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

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) je pseudoobilovina pocházející z Jižní Ameriky, která v posledních letech získává na popularitě díky svému nutričnímu složení a zdravotním benefitům. Obsahuje vysoké množství bílkovin s vyváženým zastoupením esenciálních aminokyselin, vlákninu, vitamíny a minerální látky. Významnou skupinou bioaktivních látek přítomných v quinoe jsou fenolické látky, které vykazují antioxidační aktivitu a mohou přispívat k prevenci civilizačních onemocnění.

Fenolické látky se v rostlinných matricích vyskytují jako volné i ve vázané formě na buněčnou stěnu materiálu, přičemž jejich biologická dostupnost a účinnost mohou být ovlivněny procesem hydrolýzy. K jejich kvantitativní i kvalitativní analýze se využívají moderní chromatografické a hmotnostně spektrometrické metody, jako je vysokoučinná kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS/MS). Tato metoda umožňuje přesné stanovení jednotlivých fenolických látek a monitorování jejich změn v závislosti na typu vzorku a jeho úpravě.

Tato diplomová práce se zaměřuje na analýzu fenolických látek v semenech quinoe pomocí HPLC/MS/MS, se zvláštním důrazem na vliv hydrolýzy na jejich uvolňování. Cílem je nejen identifikovat a kvantifikovat jednotlivé fenolické látky, ale také posoudit jejich antioxidační aktivitu. Výsledky této studie mohou přispět k hlubšímu pochopení nutriční hodnoty této pseudoobiloviny a jejího potenciálního přínosu pro lidské zdraví.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Pseudoobiloviny

V dnešní době se klade důraz na zdravý životní styl a vyváženou stravu. Neustále se provádějí výzkumy zaměřené na objevování nových potravin, které by mohly zlepšit stravovací návyky a podpořit zdraví populace. Pseudoobiloviny jsou v tomto směru vhodnou alternativou ke klasickým obilovinám [1-5].

Ve srovnání s tradičními obilovinami, jako jsou pšenice, rýže a kukuřice, jsou pseudoobiloviny bohatší na kvalitní bílkoviny a vlákninu. Obsahují také více esenciálních aminokyselin a často poskytují vyšší množství vitamínů a minerálních látek, což z nich činí výživově hodnotnější alternativu [2-4]. Dalším rozdílem je, že pseudoobiloviny jsou dvouděložné rostliny, které jsou přirozeně bezlepkové, a proto jsou vhodné pro osoby s intolerancí na lepek nebo celiakii. Naopak obiloviny jsou jednoděložné rostliny, které lepek obsahují [3-5].

Mezi nejběžnější pseudoobiloviny patří quinoa, amarant a pohanka (obrázek 1) [1-5].



QUINOA



AMARANT



POHANKA



Obrázek 1: Zástupci pseudoobilovin [6].

1.2 Quinoa

Quinoa (merlík čilský, *Chenopodium quinoa*) je dvouděložná rostlina (obrázek 2), která patří do čeledi laskavcovité (*Amaranthaceae*). Pochází z andské oblasti v Jižní Americe, kde se pěstovala po staletí. Díky své vysoké schopnosti růstu v různých klimatických podmínkách se však její pěstování rozšířilo i do dalších částí světa, včetně Evropy, Asie, Austrálie a Afriky [7,8].

Tato rostlina dorůstá do výšky 2 metrů a má lodyhy obsahující malá semena, které jsou hlavní formou pro lidskou spotřebu. Semena jsou kulatá a zploštělá, asi 1,5–4,0 mm v průměru a 0,5 mm na tloušťku. Zrna quinoj obsahují vysoké množství bílkovin, kyseliny askorbové a minerálních látek, jako je fosfor a draslík. Rovněž jsou bohatá na bioaktivní sloučeniny, jakou jsou flavonoidy, fenolické kyseliny, bioaktivní peptidy, fytosteroly a saponiny. Zelené listy, klíčky a mikroklíčky quinoj, stejně jako její zrna, jsou bohaté na živiny a přínosné pro naše zdraví. Prokazují antimikrobiální, protirakovinné, antidiabetické, antiobezitní, antioxidantní a kardioaktivní vlastnosti. Kvůli svému vysokému obsahu živin je quinoa často označována jako superpotrava. Pro svůj bohatý nutriční profil je obzvláště hodnotná pro ty, kdo preferují rostlinné zdroje bílkovin, včetně vegetariánů. Navíc je bez obsahu lepku, což ji činí ideální volbou pro osoby trpící celiakií nebo intolerancí na lepek [9- 11, 16].



Obrázek 2: Rostlina merlíku čilského [12].

1.1.2 Klasifikace

Quinou nejčastěji dělíme podle barvy na bílou, červenou a černou (obrázek 3). Tato barevná rozmanitost semen je způsobena přítomností pigmentů, zejména betacyaninů, mezi které patří betanin a jeho izomer izobetanin. Tyto pigmenty se řadí mezi fotochemikálie a dodávají quinoe nejen barvu, ale také poskytují další bioaktivní vlastnosti, jako jsou antioxidační a protizánětlivé účinky. Na rozdíl od antokyanů však neobsahují flavonoidní strukturu. Barva semen quinoe je úzce spjata s obsahem chemických látek, čím tmavší je barva semen, tím vyšší je jejich výživová hodnota [13,14, 35, 36].

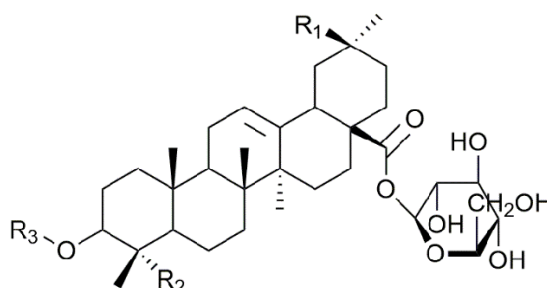


Obrázek 3: Barevná rozmanitost semen quinoe [15].

1.1.3 Saponiny

Quinoa je nejen bohatá na živiny, ale také obsahuje saponiny, hořké látky přítomné zejména ve slupce semen (obrázek 4). Tyto přírodní sloučeniny patří mezi glykosidy a vyskytují se v mnoha rostlinách. Jsou známé svou schopností vytvářet pěnu při kontaktu s vodou, což jim dává surfaktantní vlastnosti, tedy schopnost snižovat povrchové napětí. V přírodě slouží jako ochrana proti škůdcům a mikroorganismům. Před konzumací se quinoa obvykle oplachuje, aby se saponiny odstranily a neměly vliv na výslednou chuť [16-18, 36].

Saponiny se skládají ze dvou hlavních částí: aglykonu, který tvoří jejich základní strukturu, a cukerných složek, které jsou na něj navázány. Podle typu aglykonu se saponiny dělí na triterpenoidní a steroidní [18].



Obrázek 4: Chemická struktura saponinu extrahovaných ze slupek quinoe [19].

1.1.4 Chemické složení

Semena quinoj obsahují širokou škálu bioaktivních sloučenin, včetně proteinů, esenciálních aminokyselin, nenasycených tuků, vlákniny, komplexních sacharidů a různých fytochemikálií, jako jsou polyfenoly a flavonoidy. Mezi nejvýznamnější fenolické látky nalezené v quinoe patří kyselina ferulová, kávová, benzoová a kvercetin. Tyto sloučeniny jsou známé svými antioxidačními vlastnostmi, které mohou přinášet zdravotní výhody, jako je zmírnění zánětlivých procesů a ochrana před oxidativním stresem v těle. Pokud jde o nutriční složení, quinoa je také bohatá na důležité minerály, jako je vápník, hořčík, draslík a fosfor (tabulka 1). Díky této rozmanitosti chemického složení není quinoa pouze výživově bohatá, ale zároveň zdůrazňuje svůj význam pro potravinářské technologie a zdravotní aplikace [11, 20, 21, 25].

Tabulka 1: Chemické složení quinoové celozrnné mouky ve srovnání s amarantovou a pohankovou celozrnnou moukou [21].

živiny [g/100 g]	amarant	quinoa	pohanka
škrob	57,3-65,5	53,6-71,6	67,8-78,3
bílkoviny	15,1-16,4	9,5-16,7	13,9-16,4
tuk	6,47-7,25	2,74-7,34	3,43-3,86
celková vláknina	6,53-11,16	7,15-15,31	3,55-5,86
popel	2,23-2,87	1,92-3,46	1,91-2,30
minerální složení [mg/kg]			
vápník	1818–2060	347–1041	151–254
železo	76,8–96,9	33,7–129,9	18,5–38,4
hořčík	2567–2849	1222–2824	1016–2752
draslík	4389–5218	6181–12453	2130–5768
fosfor	4433–5889	2513–5738	1687–5515
sodík	47,2–91,5	73,1–204,5	36,0–100,4

Stejně jako zrna quinoj jsou i její zelené listy a klíčky bohaté na živiny a přispívají k celkovému zdraví. Mají antimikrobiální, protirakovinné a antioxidační účinky, podporují zdraví kardiovaskulárního systému a mohou pomáhat při prevenci cukrovky a obezity [11].

1.1.4.1 Listy quinoy

Listy pseudocereálií, které byly považovány za bezcenný odpad, jsou naopak jedlé a mohou být přidávány do salátů nebo využity jako hodnotná součást funkčních potravin. Listy quinoy obsahují významné množství popela, vlákniny, bílkovin, dusičnanů, sodíku a vitamínu E a C [11, 22, 23, 24].

1.1.4.2 Klíčky quinoy

Klíčky po klíčení quinoy, zejména po 24 hodinách, mají velkou výživovou hodnotu. Zvyšuje se obsah bioaktivních látek a antioxidantů, například GABA, či esenciálních aminokyselin jako je leucin. Mají vysoký obsah fenolických látek, flavonoidů, karotenoidů (β - karoten a lykopen) a také chlorofylu a, b. Výživový profil klíčků zpravidla převyšuje profil neklíčených semen, což z nich dělá potenciálně cenný doplněk pro zdravou výživu a funkční potraviny (tabulka 2) [11, 25, 26].

Tabulka 2: Nutriční složení listů, klíčků a zrn quinoy [11, 26, 27].

živiny [%]	listy	klíčky	zrna
surový protein	28,2-37	6,1-12,3	9,1-15,7
surový tuk	2,4-4,5	0,1-3,8	4-7,6
surová vláknina	6,9-7,8	4,6-23,5	7-14,1
sacharidy	34	9,6-73	48,5-69,8
popel	2,1-20	0,9-3,4	2-7,7
energie [kcal]	325	69	331-381
minerální složení [mg/100 g]			
vápník	147-1535	21,7	27,5-148,7
hořčík	14-902	219,3	26-502
draslík	474-8769	525,2	696,7-1475
sodík	3-15,1	-	11-31
esenciální aminokyseliny [g/100 g]			
leucin	2,7	2	2,3-9,4
lysin	1,9	1,3	2,4-7,5

1.3 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které chrání buňky před poškozením tím, že neutralizují volné radikály. Tyto molekuly mohou způsobovat oxidativní stres, což přispívá ke stárnutí a rozvoji chronických onemocnění. Mezi volné radikály patří reaktivní formy kyslíku (ROS) a reaktivní formy dusíku (RNS) (tabulka 3). I když mohou ROS a RNS buňky poškozovat, zároveň jsou nezbytné pro regulaci klíčových procesů v organismu, jako je apoptóza, genová exprese nebo transport iontů. Když však hladina ROS výrazně vzroste, může dojít k poškození mnoha typů molekul, včetně proteinů, lipidů, RNA a DNA, protože ROS jsou velmi reaktivní. Produkce volných radikálů není spojená pouze s běžnými metabolickými procesy v lidském těle (endogenní zdroje), ale může být vyvolána i vlivy z okolního prostředí (exogenní zdroje), jako jsou stres, ozónové záření, znečištění, pesticidy a průmyslové chemikálie [28-30].

Tabulka 3: Přehled volných radikálů [30].

ROS (reaktivní formy kyslíku)	
superoxidový radikál	O_2^{\bullet}
hydroxylový radikál	HO^{\bullet}
alkoxylový radikál	RO^{\bullet}
peroxylový radikál	ROO^{\bullet}
RNS (reaktivní formy dusíku)	
oxid dusnatý	NO^{\bullet}
oxid dusičitý	NO_2^{\bullet}

Antioxidanty lze rozdělit na enzymatické a neenzymatické. Enzymatické antioxidanty, jako superoxid dismutáza a kataláza, fungují uvnitř buněk a rozkládají volné radikály. Neenzymatické antioxidanty mohou být přírodní nebo syntetické. Přírodní zahrnují vitamíny (např. C a E), minerály (selen), karotenoidy (karoteny, xantofyly) a rostlinné polyfenoly (flavonoidy, fenolické kyseliny, lignany, taniny a další). Tyto antioxidanty se běžně nacházejí v ovoci, zelenině, obilovinách a některých druzích masa a ryb. Mají různé biologické vlastnosti, například protizánětlivé a protirakovinné účinky, snižují riziko vzniku srdečně-cévních onemocnění a přispívají k udržení rovnováhy střevní mikrobioty, což podporuje zdraví střev. Syntetické antioxidanty jsou chemicky vyrobené látky, které se často používají v potravinářském průmyslu jako konzervační prostředky (BHA, BHT). Jejich hlavním účelem je zpomalit oxidaci a prodloužit trvanlivost potravin [28, 30, 31].

1.3.1 Fenolické látky

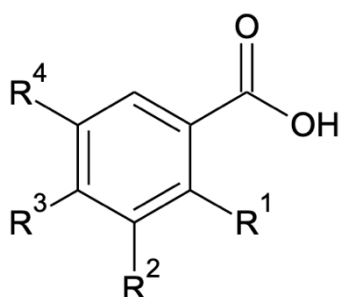
Fenolické látky představují rozmanitou skupinu fytochemikálií, která zahrnuje jednoduché fenoly i komplexní polyfenoly. Mezi fenolické látky se řadí fenolické kyseliny a flavonoidy. Tyto látky jsou charakteristické přítomností jedné nebo více hydroxylových skupin navázaných na aromatické kruhy. Rostliny tyto sloučeniny přirozeně vytvářejí, a proto jsou hojně zastoupeny v potravinách rostlinného původu. V obilovinách a pseudocereáliích se fenolické látky nacházejí hlavně ve vnějších vrstvách zrn. Dostatečný příjem těchto látek ve stravě podporuje zdraví, pomáhá udržovat dobrou kondici a díky svým antioxidačním, protizánětlivým, antimikrobiálním a protirakovinným vlastnostem snižuje riziko vzniku chronických onemocnění [32, 33, 38, 40].

Quinoa obsahuje nejméně 23 fenolických látek jak ve volné, tak ve vázané formě. Mezi volné fenoly patří flavonoidy nebo proanthokyanidiny a jejich glykosidové deriváty, v menší míře pak glykosidy ferulové a vanilové kyseliny. Zatímco frakce vázaných fenolických látek zahrnuje fenolické kyseliny, jako je např. kyselina ferulová, vanilová a deriváty od kyseliny benzoové, které jsou stavebními kameny ligninu jako součást buněčných stěn [32-34, 36, 40].

1.3.1.1 Fenolické kyseliny

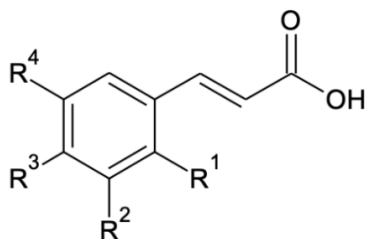
Z chemického hlediska jsou fenolické kyseliny charakterizovány benzenovým jádrem s jednou nebo více hydroxylovými a karboxylovými skupinami. Tuto skupinu látek lze na základě jejich struktury rozdělit na deriváty kyseliny benzoové (obrázek 5) a kyseliny skořicové (obrázek 6) [33, 37, 40].

Z fenolických kyselin obsažených v quinoe jsou nejvíce zastoupené kyseliny ferulová, vanilová a kávová. Dále jsou přítomny i jejich glykosilované deriváty [35, 36].



Kyselina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
gallová	H	OH	OH	OH
vanilová	H	OCH ₃	OH	H
syringová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
salicylová	OH	H	H	H
4-hydroxybenzoová	H	H	OH	H

Obrázek 5: Struktura kyselin odvozených od kyseliny benzoové [36, 40, 45].



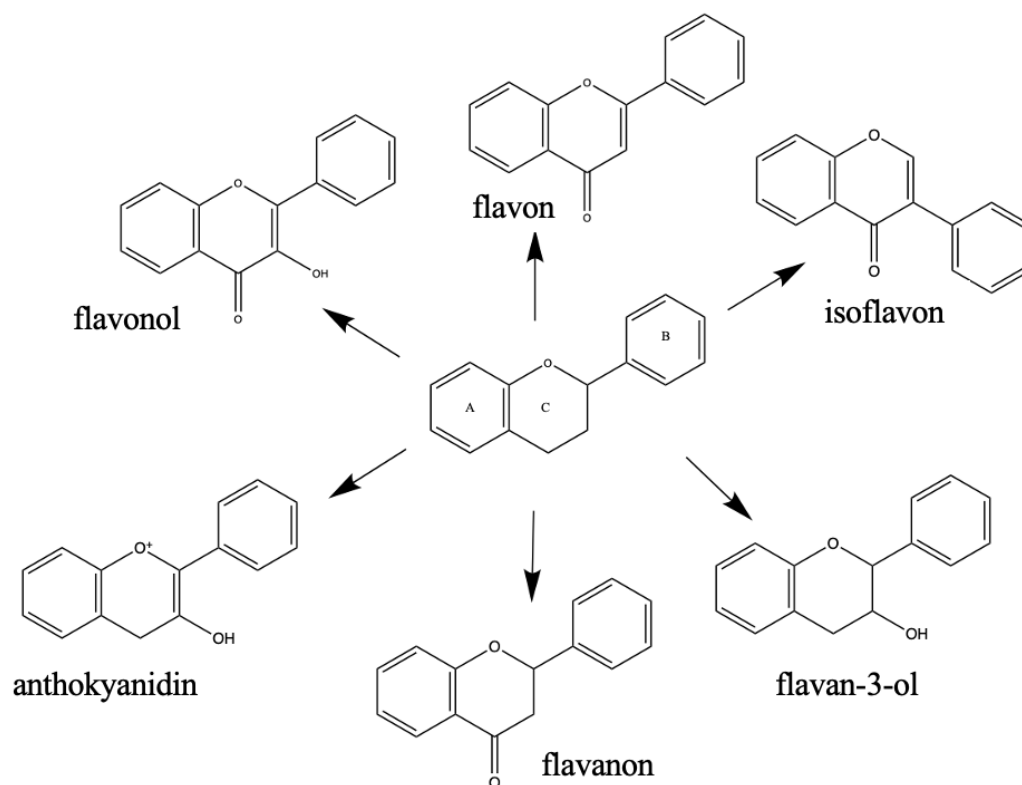
Kyselina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
<i>p</i> -kumarová	OH	H	OH	H
<i>o</i> -kumarová	OH	H	H	H
kávová	H	OH	OH	H
ferulová	H	OCH ₃	OH	H
synapová	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Obrázek 6: Struktura kyselin odvozených od kyseliny skořicové [36, 40, 45].

1.3.1.2 Flavonoidy

Obecná struktura flavonoidů je tvořena dvěma benzenovými kruhy spojenými tříuhlíkovým můstkem, který mezi nimi typicky tvoří heterocyklický kruh (obrázek 7). Tato struktura se může významně měnit prostřednictvím dalších hydroxy či methoxy skupin, které přispívají k rozmanitosti a specifickým zdravotním přínosům flavonoidů. Flavonoidy se mohou vyskytovat jak ve volné formě, tak ve formě glykosylovaných derivátů, kdy je na aglykon flavonoidu navázána molekula sacharidu, nejčastěji glukóza, galaktóza, arabinóza, rhamnóza, nebo rutinóza. Flavonoidy vázané na sacharidy nebo jiné molekuly mají obvykle nižší antioxidační aktivitu než jejich volné formy [32- 38, 40, 45]. Toto snížení aktivity je způsobeno nižším počtem dostupných kyselých vodíků, protože sacharid nebo jiná molekula se váže na hydroxylovou skupinu flavonoidu.

V quinoe jsou přítomny převážně glykosidy odvozené od kvercetinu a kempferolu. Tyto flavonoidy vynikají zejména svými antioxidačními a protizánětlivými vlastnostmi, které napomáhají ke snížení oxidačního stresu a zánětů v těle. Obsah flavonoidů v quinoe souvisí s její barevnou variantou. Černé a červené odrůdy obvykle obsahují více fenolických sloučenin, což zvyšuje jejich antioxidační účinky a biologickou aktivitu ve srovnání s bílou quinoou. [32- 38, 45].



Obrázek 7: Základní struktura flavonoidů [38, 45].

Celkový obsah fenolických látek lze stanovit pomocí spektrofotometrických metod, které se často využívají pro svou jednoduchost a rychlost. Tyto metody jsou založeny na reakci fenolických látek s vhodným činidlem, přičemž dochází ke změně absorbance na specifických vlnových délkách. Velikost změny absorbance odpovídá koncentraci fenolických látek [35, 40].

Často používanou spektrofotometrickou metodou je například reakce s činidlem Folin – Ciocalteuovým, která umožňuje odhadnout celkový obsah fenolických látek na základě monitorování tvorby barevného produktu mezi fenolickými látkami a činidlem, což se projeví zvýšením absorbance [35, 40]. Folin – Ciocalteuovo činidlo je složeno z kyselého fosforečnanového komplexu obsahujícího molybden a wolfram. Po uplynutí inkubační doby proběhne reakce, při níž fenolické látky redukují toto činidlo v zásaditém prostředí, což vede ke vzniku modrého zbarvení. Intenzita této barvy se měří při vlnové délce 765 nm. Výsledky se vyjadřují jako ekvivalentní množství kyseliny gallové, která slouží jako referenční standard [36-40, 45].

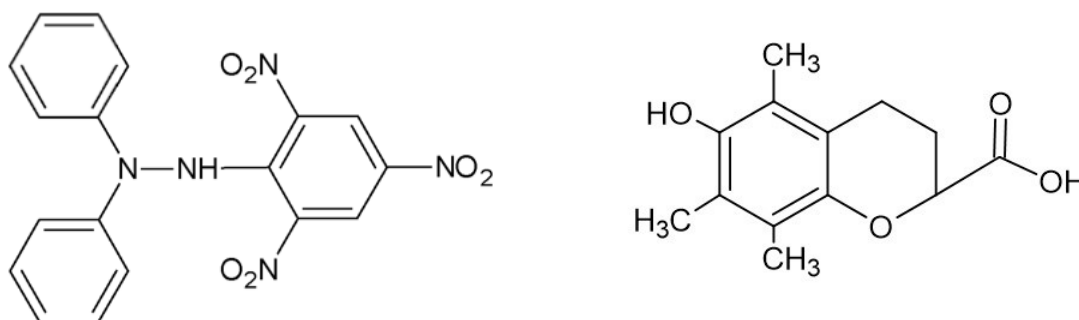
Pro přesnou kvantitativní a kvalitativní analýzu je však vhodnější využití chromatografických technik, jako je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) nebo její spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) [35, 40].

1.4 Stanovení antioxidační kapacity

Pro stanovení antioxidační kapacity se běžně používají různé laboratorní metody, včetně spektrofotometrických a chromatografických technik. Spektrofotometrie poskytuje přehled o celkovém obsahu fenolických látek nebo jiných antioxidantů ve vzorku. Základem těchto technik je reakce antioxidantů s ROS nebo volnými radikály. Tento postup umožňuje stanovit jejich celkovou antioxidační kapacitu [30, 41, 42].

1.4.1 Metoda DPPH

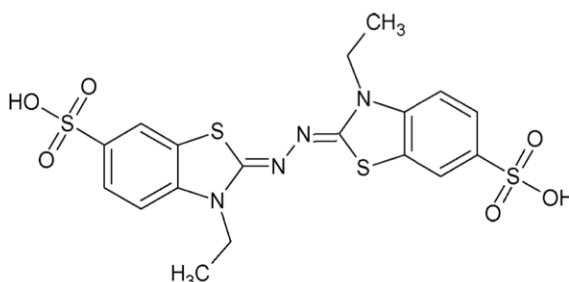
Tato spektrofotometrická metoda se běžně používá k měření antioxidační kapacity potravin rostlinného původu, včetně pseudocereálií, jako je quinoa. Výchozí látkou je sloučenina DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl, obrázek 8), která je rozpustná v methanolu nebo ethanolu a tím vytváří stabilní volný radikál fialové barvy. Působením antioxidantů přítomných ve vzorku se roztok radikálu odbarvuje, což se projeví snížením absorbance při specifické vlnové délce 515-528 nm. Pro vyjádření výsledků se často používá standard Trolox (obrázek 8) a antioxidační kapacita se vyjadřuje jako ekvivalentní množství tohoto standardu (TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity). Alternativně lze hodnoty uvádět jako ekvivalentní množství kyseliny gallové (GAE) [35, 36, 42, 43].



Obrázek 8: Strukturní vzorec DPPH (vlevo) a strukturní vzorec Troloxu (vpravo).

1.4.2 Metoda ABTS

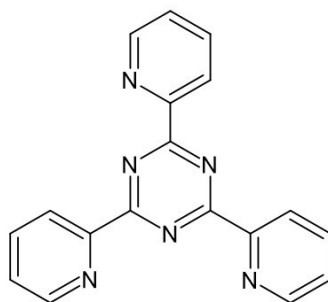
Jde o jednoduchou metodu pro stanovení celkové antioxidační kapacity, která měří schopnost antioxidantů zhaset stabilní radikálový kation 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonové kyseliny) (ABTS⁺). Tento kation lze generovat z ABTS (obrázek 9) za použití silných oxidačních činidel, jako jsou K₂S₂O₈, MnO₂ nebo hemoglobin v přítomnosti H₂O₂. Vzniklý modrozelený chromofor vykazuje maximální absorpci při 734 nm, přičemž jeho intenzita klesá v přítomnosti antioxidantů. Míra odbarvení závisí na délce reakce, vnitřní antioxidační aktivitě a koncentraci vzorku. Procentuální pokles zbarvení je pak vyjádřen jako ekvivalentní množství standardu Troloxu (TEAC) [41, 42].



Obrázek 9: Strukturální vzorec ABTS.

1.4.3 Metoda FRAP

FRAP test je běžná metoda pro měření antioxidační kapacity, která spočívá v redukcí komplexu železitých iontů s 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazinem (TPTZ, obrázek 10) působením antioxidantů v kyselém prostředí. Tento proces vede ke vzniku intenzivně modrého komplexu se železnatými ionty. Antioxidační účinek odpovídá míře nárůstu absorbance monitorované při 593 nm, přičemž výsledky se udávají jako ekvivalentní množství vybraného standardu, jako je trolox či kyselina askorbová [35, 36, 42, 44].



Obrázek 10: Strukturální vzorec TPTZ.

Hlavní nevýhodou této metody je selektivita pouze pro hydrofilní (ve vodě rozpustné) antioxidanty, a není tedy vhodná pro lipofilní sloučeniny (rozpustné v tucích). Navíc některé antioxidanty reagují pomaleji a vyžadují delší inkubační dobu, což může ovlivnit přesnost měření. Z těchto důvodů je doporučováno kombinovat FRAP s dalšími metodami, jako je DPPH, pro získání komplexnějšího hodnocení antioxidační kapacity u rostlinných extraktů, včetně pseudoobilovin [35, 36, 42, 44].

1.5 Úprava vzorku před analýzou

Příprava vzorku je klíčovou částí laboratorního procesu, zvláště u pevných vzorků, jako jsou pseudoobiloviny. Zahrnuje několik kroků, jako je mletí, homogenizace a extrakce, které zajišťují reprezentativnost analyzovaných vzorků, a tedy reprodukovatelné výsledky. U komplexních přírodních matric, jako jsou rostliny, pseudoobiloviny a další potravinové vzorky je před samotnou extrakcí nutné provést hydrolýzu pro uvolnění stanovovaných látek z buněčné stěny [45, 46].

1.5.1 Mletí a homogenizace

Tyto procesy jsou při přípravě pevných vzorků, jako jsou například potraviny, půdy nebo rostlinné materiály, klíčové. Při mletí se pevné vzorky redukuje na jemný prášek, což zvyšuje povrchovou plochu, která je v kontaktu s extrakčními činidly. Homogenizace zajišťuje rovnoměrné rozložení analyzovaných složek v celém objemu vzorku. Tím se zvyšuje výtěžnost extrakce a rychlost chemických reakcí, což je při analýze těchto vzorků zásadní [46].

1.5.2 Hydrolýza fenolických látek

Hydrolýza je klíčovým krokem pro uvolnění a analýzu fenolických látek obsažených v pseudoobilovinách, protože jsou ve velké míře vázány na rostlinnou matici a často tvoří komplexy s jinými molekulami, jako jsou cukry nebo složky buněčné stěny. Proces hydrolýzy narušuje tyto vazby, čímž zvyšuje dostupnost fenolických látek a umožňuje jejich efektivnější extrakci a následnou analýzu. Hydrolýza může probíhat za použití kyselého, alkalického nebo enzymatického prostředí [36, 40, 45].

Alkalická hydrolýza se zpravidla provádí za použití hydroxidu sodného, zatímco kyselá hydrolýza využívá silné minerální kyseliny, například kyselinu chlorovodíkovou nebo kyselinu sírovou za velmi vysoké teploty. U těchto druhů hydrolýz lze způsobit i snížení nebo degradaci studovaných látek. Důvodem těchto ztrát jsou drsné podmínky pH a práce za vysoké teploty. Z tohoto důvodu je nezbytné u obou typů hydrolýz správně nastavit pH a teplotu, aby se předešlo rozkladu fenolických látek a tvorbě nežádoucích vedlejších produktů [45, 48, 49]. Lze tomu u alkalické hydrolýzy zamezit pomocí samotné kyseliny askorbové

nebo společně s EDTA (ethylendiamintetraoctové kyseliny) [48, 49]. Enzymatická hydrolýza využívá enzymy, jako jsou pektinázy, celulázy a amylázy. Tento typ hydrolýzy se přirozeně vyskytuje při mikrobiálním rozkladu rostlin nebo během fermentace rostlinných potravin v tlustém střevě. Daný proces je šetrnější, ale méně účinný [47].

1.5.3 Extrakce

Extrakce je klíčovým krokem při izolaci fenolických látek z rostlinných materiálů, včetně quinoy. Výběr vhodné metody ovlivňuje výtěžnost a složení získaných sloučenin, protože fenolické látky se mohou vyskytovat ve volné i vázané formě [40, 50, 51].

1.6 Extrakční metody

1.6.1 Extrakce pevná fáze – kapalina a kapalina-kapalina

Tyto postupy patří mezi nejčastěji využívané metody pro získávání extraktů z rostlinných materiálů, a to díky jejich jednoduchosti, efektivitě a širokému spektru aplikací. Rozpustnost fenolických sloučenin závisí na chemickém složení rostlinného vzorku, polaritě použitých rozpouštědel, teplotě a pH. Rostlinné materiály obsahují širokou škálu různých fenolických látek, od jednoduchých sloučenin, jako jsou fenolické kyseliny a flavonoidy, až po vysoce polymerní látky, například taniny. Proto je zásadní pečlivě vybrat rozpouštědlo, které umožní efektivní izolaci požadovaných sloučenin [45, 46, 51].

Běžně používaná extrakční rozpouštědla zahrnují alkoholy (methanol, ethanol), aceton, diethylether, či ethylacetát. Pro extrakci velmi polárních fenolických kyselin, jako je kyselina benzoová, se často využívá směs alkoholu a vody. Naopak méně polární rozpouštědla, jako chloroform, hexan nebo benzen, jsou vhodná pro extrakci nepolárních složek, například vosků, nebo olejů [45, 51].

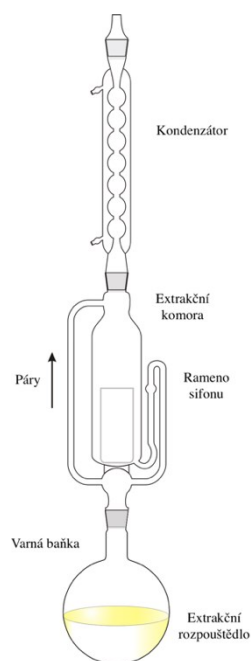
Pro dosažení vysoké výtěžnosti je klíčový důkladný kontakt mezi fázemi, který lze zajistit například třepáním nebo použitím odstředivky. Pro maximalizaci účinnosti extrakce se proces několikrát opakuje [50].

1.6.2 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce je tradiční laboratorní kontinuální metoda používaná k izolaci lipofilních látek z pevných materiálů, jako jsou semena, rostlinné tkáně nebo půdní vzorky. Obzvláště vhodná je v případech, kdy je třeba získat sloučeniny s různou rozpustností v odlišných rozpouštědlech. Tento proces probíhá v Soxhletově extraktoru (obrázek 11).

Probíhá zde cyklická extrakce, při níž rozpouštědlo neustále cirkuluje mezi odpařováním a kondenzací, což umožňuje jeho opakované využití k extrakci. Výběr rozpouštědla hraje klíčovou roli, protože rozpustnost látek závisí na vlastnostech rozpouštědla, jako je jeho polarita a bod varu. Po ukončení extrakce je rozpouštědlo vydestilováno a ve varné baňce zůstávají pouze extrahované látky [50- 52].

Tato metoda je sice velmi účinná, ale vyžaduje více času a větší množství rozpouštědla než jiné metody. Soxhletova extrakce je ceněna pro svou účinnost při izolaci cílových látek, protože opakovaný cyklus extrakce zvyšuje výtěžnost požadovaných sloučenin [52].



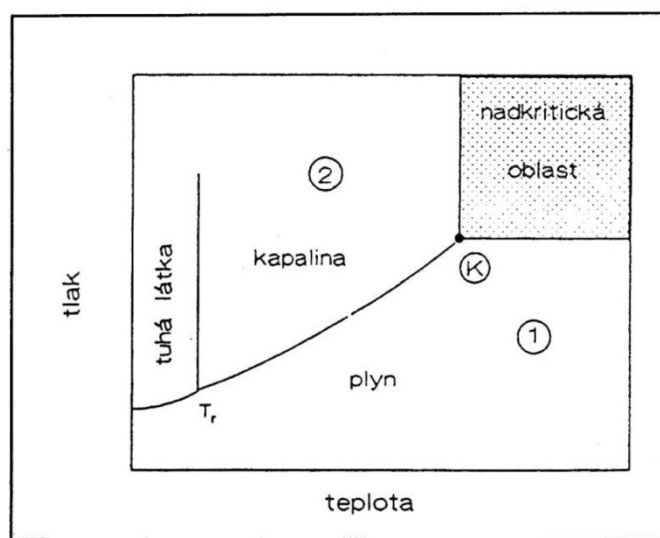
Obrázek 11: Soxhletův extraktor [53].

1.6.3 Extrakce nadkritickou tekutinou

Nadkritická tekutina je mimořádně účinné extrakční činidlo díky své nízké viskozitě, zvýšené difuzivitě a absenci povrchového napětí, což umožňuje rychlejší transportní procesy ve srovnání s tradičními extrakčními kapalinami. Nachází se v podmínkách nad svým kritickým bodem – tedy při teplotě a tlaku vyšším, než jsou kritické hodnoty. V této fázi látka nevykazuje klasické vlastnosti kapalin ani plynů, ale má jedinečnou kombinaci jejich charakteristik [56]. Proto je extrakce tekutinou v nadkritickém stavu (SFE) moderní a ekologická metoda, která je hojně využívána v potravinářském a farmaceutickém průmyslu pro získávání bioaktivních látek. Tento proces probíhá při teplotě a tlaku nad kritickým bodem rozpouštědla, což mu umožňuje mít vlastnosti kapaliny i plynu (obrázek 12). V této fázi je rozpouštědlo schopno difundovat pevnými látkami jako plyn a rozpouštět složky jako kapalina. Nejčastěji

používaným rozpouštědlem je oxid uhličitý (CO₂), protože se jedná o snadno dostupný, nehořlavý, netoxický plyn, který lze snadno převést do nadkritického stavu [45, 54].

SFE je vhodná pro izolaci různých látek, včetně polyfenolů a antioxidantů, které se nacházejí v pseudoobilovinách. Optimalizace parametrů, jako je teplota, tlak, doba extrakce a použití pomocných rozpouštědel (ethanol, methanol nebo voda), umožňuje přizpůsobit metodu konkrétním bioaktivním látkám. Výhodou této techniky je vysoká selektivita a nízký environmentální dopad, i když je technologicky náročnější než tradiční metody [54, 55].



Obrázek 12: Fázový diagram v p - T souřadnicích s vyznačením oblasti nadkritické tekutiny [56].

1.7 Chromatografické metody

Chromatografické techniky se hojně uplatňují při studiu fenolických sloučenin v pseudocereáliích, jako jsou quinoa, amarant či pohanka. Tyto metody umožňují identifikovat a kvantifikovat bioaktivní látky, které jsou klíčové pro pochopení jejich antioxidačních, protizánětlivých a dalších příznivých účinků na zdraví [40].

Principem chromatografie je využití rozdílných fyzikálně-chemických vlastností jednotlivých látek, například polarity, molekulové hmotnosti či interakcí s mobilní a stacionární fází. Stacionární fáze může být pevná nebo kapalná aplikovaná na pevný nosič, zatímco mobilní fáze tvoří kapalina nebo plyn, který přenáší analyzované látky směsí skrze stacionární fázi. Díky rozdílné rychlosti pohybu jednotlivých složek dochází k jejich separaci, což umožňuje jejich detailní analýzu [50].

1.7.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Tato technika patří mezi nejúčinnější chromatografické metody a je využívána k separaci, identifikaci a kvantifikaci složitých směsí, například fenolických sloučenin. Umožňuje velmi rychlou a přesnou analýzu. Mobilní fází je kapalina, která je poháněna vysokotlakým čerpadlem poskytujícím tlak až 40 MPa, což umožňuje rychlejší průtok mobilní fáze a zároveň zlepšuje separaci. Klíčovým faktorem pro dosažení vysoké účinnosti je i typ kolony, která by měla mít malý vnitřní průměr a být naplněna vhodnou stacionární fází. Velikost částic této fáze hraje zásadní roli, menší částice (typicky v rozmezí 1,7–5 μm) zajišťují lepší rozlišení analytů díky snížené difuzi, čímž přispívají k ostřejším separačním píkům. Zároveň však zvyšují odpor toku mobilní fáze, a tím i požadavky na tlak čerpadla. U částic o velikosti pod 2 μm proto potřebujeme speciální instrumentaci odolávající vysokým tlakům (až 150 MPa). Kolona je nejčastěji vyrobena z ocele, u nižších provozních tlaků lze využít i kolony vyrobených ze skla či plastu. Průměr kolony se pohybuje v rozmezí 3–6 mm a délka v rozmezí 5–25 cm [50, 57–59].

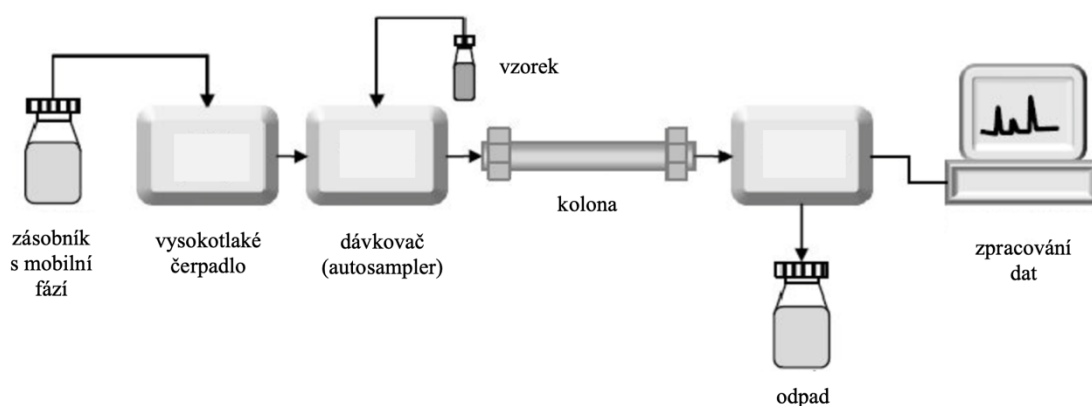
Základní schéma HPLC systému je znázorněno na obrázku 13. Vzorek je dávkován pomocí šesticestného ventilu nebo autosampleru do průtoku mobilní fáze, která je čerpaná vysokotlakým čerpadlem. Následně je vzorek unášen mobilní fází na chromatografickou kolonu, kde dochází k separaci. Po průchodu vzorku separační kolonou jsou analyty v mobilní fázi detekovány v průtokové cele detektoru a dochází ke zpracování signálu ve formě chromatogramu [57, 58].

V HPLC lze dva základní chromatografické systémy rozdělit na základě polarity stacionární a mobilní fáze. Pokud je polárnější stacionární fáze (silikagel/alumina) než mobilní fáze (hexan, chloroform) jedná se o systém s normálními fázemi. Naopak je-li mobilní fáze polárnější (směs polárních rozpouštědel např. voda-acetonitril) než fáze stacionární (chemicky modifikovaný silikagel nepolární skupinou např. oktadecyl, oktyl atd.) jedná se o systém s obrácenými fázemi. Tento fázový systém je běžnější z důvodu širší využitelnosti, stabilnější separace, lepší kompatibility s detektory a jednodušší přípravy vzorků [57, 58].

Retenční chování látek separovaných v systémech s obrácenými fázemi lze efektivně ovlivnit změnou složení mobilní fáze během analýzy. Tento postup, známý jako gradientová eluce, spočívá v postupné nebo náhlé změně poměru jednotlivých složek mobilní fáze v čase, čímž se zvyšuje účinnost separace. Gradientové čerpadlo obvykle míchá dvě nebo více mobilních fází v různých poměrech. Pro úspěšnou aplikaci gradientové eluce je nutné přesně nastavit časový profil, který určuje, jak se poměr použitých rozpouštědel mění. Změna může být lineární, nelineární či skoková.

Směšování jednotlivých složek mobilní fáze je provedeno buď za nízkého nebo vysokého tlaku a podle toho dělíme použitý systém na nízkotlaký nebo vysokotlaký. V případě vysokotlakého systému je každá složka mobilní fáze čerpána vlastním vysokotlakým čerpadlem a ke smísení obou složek dochází za vysokého tlaku. Tento systém umožňuje velmi přesné nastavení poměrů rozpouštědel a lepší kontrolu nad tvorbou gradientu. Druhou variantou je nízkotlaký systém, kde jsou jednotlivé složky mobilní fáze smíchány v nízkotlaké oblasti a výsledná směs je poté čerpána vysokotlakým čerpadlem. Tento systém je jednodušší a cenově dostupnější, protože na všechny složky mobilní fáze potřebujeme pouze jedno vysokotlaké čerpadlo. Oproti vysokotlakému systému však dochází k prodloužení zpoždění gradientu [57, 58].

Klíčovou částí chromatografického systému jsou detektory, které umožňují detekci a kvantifikaci analyzovaných látek, které eluují z kolony. Detektory zaznamenávají určitou fyzikální nebo chemickou vlastnost eluátu, který obsahuje analyzované látky, a tím poskytují informace o jejich přítomnosti a koncentraci. Existuje několik různých typů detektorů, které se používají v HPLC, a každý typ má své výhody a je vhodný pro určité aplikace. Mezi nejběžněji používané detektory patří spektrofotometrický, fluorimetrický, refraktometrický, či elektrochemický detektor, dále detektor rozptylu světla a hmotnostní spektrometr [58, 59].



Obrázek 13: Schéma HPLC [59].

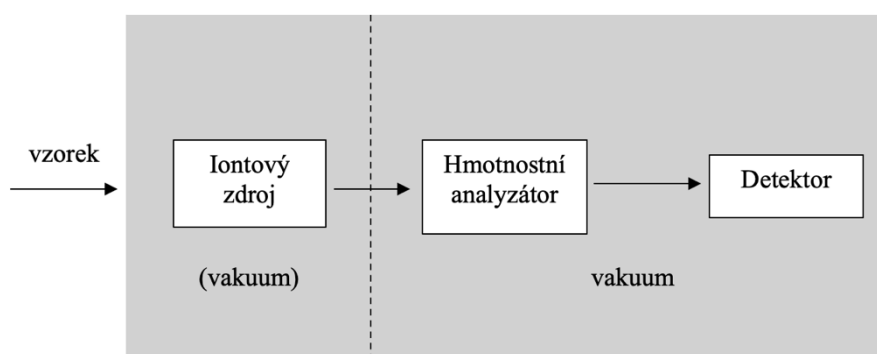
1.8 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která separuje vznikající ionty na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Využívá se k identifikaci a kvantifikaci sledovaných látek v různých maticích. Mezi hlavní přednosti této techniky patří mimořádně vysoká citlivost, která umožňuje detekovat i velmi nízké koncentrace analyzovaných látek. Výhodou je také minimální spotřeba vzorku a možnost přímého spojení s jinými separačními technikami, jako jsou kapalinová nebo plynová chromatografie [60- 62].

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí: iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru (obrázek 14). Každá z těchto částí zásadně ovlivňuje funkčnost, přesnost a citlivost přístroje. Většina částí hmotnostního spektrometru vyžadují vysoké vakuuum. U HPLC/MS systémů iontový zdroj není ve vakuové části přístroje a k ionizaci dochází za atmosférického tlaku. Požadovaná úroveň vakua se liší v závislosti na typu zařízení. Součástí systému je také iontová optika, která slouží k urychlení a fokusaci iontů, což přispívá k jejich efektivnímu přenosu do analyzátoru [60, 62].

1.8.1 Iontový zdroj

Iontový zdroj je klíčovou součástí hmotnostního spektrometru, protože přeměňuje neutrální molekuly vzorku na ionty (nabitě částice). Volba iontového zdroje závisí na vlastnostech analyzovaných látek, jako jsou velikost, polarita nebo těkavost, a také na účelu analýzy. Ionizační techniky se dělí do dvou základních skupin: tvrdé a měkké, což souvisí s množstvím energie, které je analytu během ionizace dodáno [50, 60, 63].



Obrázek 14: Obecné schéma hmotnostního spektrometru.

Tvrde ionizační techniky dodávají molekulám velký přebytek vnitřní energie, což vede k jejich rozsáhlé fragmentaci. Tyto techniky umožňují určit molekulovou hmotnost, ale neposkytují přímé informace o struktuře molekuly. Pro získání těchto údajů je zapotřebí další analýza, například tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), která zkoumá fragmenty vzniklé během ionizace. Spektra z tvrdých ionizačních technik obvykle obsahují pouze záznamy kladných iontů. Naopak měkké ionizační techniky jsou šetrnější, protože molekulám dodávají méně energie, což vede k nižší fragmentaci. Díky tomu mohou poskytnout informace o molekulové hmotnosti sledované molekuly. Ve spektru lze pozorovat záznamy jak kladných, tak záporných iontů v závislosti na polaritě vloženého napětí [50, 60- 63].

Mezi tvrdé ionizační techniky patří elektronová ionizace (EI). Tato metoda se často používá ve spojení s plynovou chromatografií a je podporována rozsáhlými knihovnami referenčních spekter. Pro EI je vhodné analyzovat látky s nízkou polaritou, protože vysoce polární sloučeniny obtížně těkají. Polární látky lze však před analýzou modifikovat pomocí derivatizace. Při EI mají vzniklé ionty lichý počet elektronů, což vede k intenzivní fragmentaci. Tím však může chybět molekulární iont, který je nezbytný pro určení molekulové hmotnosti. V takových případech lze použít šetrnější techniku, jako je chemická ionizace (CI). CI patří mezi měkké ionizační techniky. Ionty vytvořené touto metodou mají sudý počet elektronů, což je činí stabilnějšími a méně náchylnými k fragmentaci. Ionizační techniky, které pracují za atmosférického tlaku, zahrnují ionizaci elektrosprejem (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku a fotoionizaci za atmosférického tlaku. Tyto metody jsou výrazně měkčí než EI nebo CI a dochází ke vzniku iontů se sudým počtem elektronů, protonovaných či deprotonovaných molekul. Pro analýzu molekul s vysokou molekulovou hmotností, například biopolymerů, se využívá ionizace laserem za přítomnosti matrice. Tato technika rovněž patří mezi měkké ionizační metody a je vhodná zejména pro analýzu složitých biomolekul [50, 60- 63, 70].

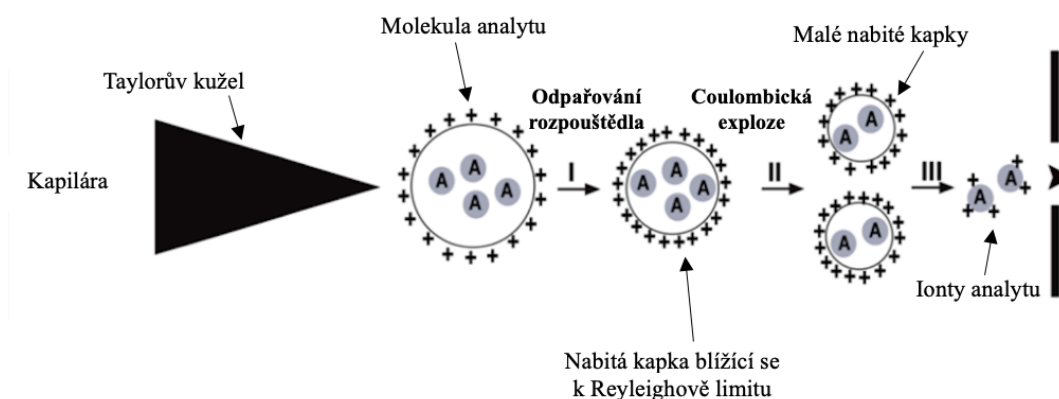
1.8.1.1 Ionizace elektrosprejem

ESI je měkká ionizační technika využívaná v hmotnostní spektrometrii k analýze nízkomolekulárních i vysokomolekulárních látek. Tato technika je obzvláště vhodná pro polární a iontové látky díky své schopnosti generovat vícenásobně nabitě ionty. To výrazně zvyšuje citlivost detekce u biomolekul s vysokou molekulovou hmotností [60, 68- 69].

Hlavní princip ESI spočívá v převodu kapalného vzorku na nabitě částice (ionty) v plynné fázi (obrázek 15). Proces začíná injekcí vzorku rozpuštěného v kapalně fázi, který je veden kapilárou k výstupu. Na kapiláru se aplikuje vysoké elektrické napětí (3–4 kV), což na jejím konci vytváří Taylorův kužel. Z něj se odštěpují drobné kapky tvořící jemný aerosol, k jehož tvorbě přispívá zmlžující plyn (dusík). Sušící plyn (rovněž dusík) poté zajišťuje postupné odpařování rozpouštědla, což zmenšuje kapky a zvyšuje koncentraci nábojů na jejich povrchu. Po dosažení Rayleighova limitu, který popisuje maximální počet nábojů na kapce, dochází ke Coulombické explozi. Ta vede k rozpadu kapek na menší kapky, a nakonec na volné ionty. V závislosti na polaritě napětí vznikají protonované $[M+H]^+$ nebo deprotonované $[M-H]^-$ ionty, případně adukty, jako například $[M+Na]^+$, když se sodíkové ionty naváží na analyzovanou molekulu.

Tyto ionty mají sudý počet elektronů, což přispívá k jejich stabilitě a minimalizuje fragmentaci. Nabité částice jsou poté směřovány pomocí iontové optiky do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány podle m/z . Díky schopnosti generovat ionty jak při snímání kladných, tak při snímání záporných iontů, je ESI univerzální ionizační technikou a umožňuje analýzu širokého spektra látek [60, 64-67].

ESI-MS může poskytnout podrobné informace o molekulárním složení a interakcích fenolických látek, zejména ve spojení s chromatografickými technikami, jako je HPLC. Schopnost ESI pracovat za mírných podmínek zachovává strukturální integritu fenolických látek, takže je velmi vhodná pro takové analýzy [68, 69].



Obrázek 15: Ionizace elektrosprejem, převzato [67] a upraveno.

1.8.2 Hmotnostní analyzátoary

Hmotnostní analyzátoar je klíčovou součástí hmotnostního spektrometru, jehož úkolem je separovat vzniklé ionty na základě jejich poměru m/z . Jeho princip spočívá v řízení trajektorie iontů pomocí elektrického nebo magnetického pole. Pro správnou funkci pracuje za vysokého vakua, jehož hodnota se liší podle typu analyzátoaru (10^{-3} – 10^{-11} Pa). Kvalita analyzátoaru se hodnotí podle několika parametrů, mezi které patří rozlišení, přesnost určení hmoty, hmotnostní a dynamický rozsah a rychlost záznamu spekter [60, 62, 70, 71].

Nejjednodušším typem hmotnostního analyzátoaru je kvadrupólový analyzátoar, který využívá oscilující elektrické pole k selekci iontů s určitou hodnotou m/z . Skládá se ze čtyř paralelně uspořádaných tyčí, mezi nimiž se aplikuje kombinace stejnosměrného a střídavého napětí. Pouze ionty s konkrétním poměrem m/z mají stabilní trajektorii a procházejí analyzátoarem, zatímco ostatní jsou odkloněny a eliminovány. Díky své kompaktnosti, cenové dostupnosti a rychlosti je široce využíván, zejména pro rutinní kvantitativní i kvalitativní

analýzy s nižším rozlišením. V tandemové hmotnostní spektrometrii se pak využívá trojitý kvadrupól, což je hybridní analyzátor složený ze tří kvadrupólů uspořádaných za sebou, přičemž prostřední kvadrupól slouží jako kolizní cela pro fragmentaci iontů [60, 62, 63, 71].

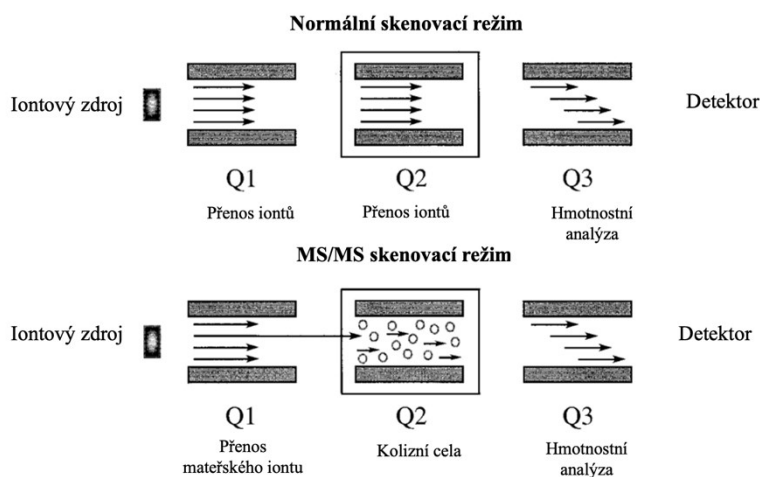
Dalším typem hmotnostního analyzátoru je analyzátor doby letu (TOF), který měří čas, za který ionty po získání energie doputují k detektoru. Tento typ analyzátoru vyniká vysokým rozlišením a schopností analyzovat široký rozsah m/z [60, 70, 71].

Iontová past představuje další typ analyzátoru, který se hojně využívá zejména při zkoumání struktury analyzovaných látek, protože umožňuje měřit tandemová hmotnostní spektra až do n -tého stupně (MS^n). Kromě tradiční 3D iontové pasti existuje i lineární iontová past, jež díky většímu objemu pojme více iontů, což zlepšuje její citlivost a schopnost detekce. Tento analyzátor lze používat samostatně, ale také ho lze integrovat do hybridních systémů, kde funguje společně s dalšími typy analyzátorů [60, 70, 71].

Mezi speciální hmotnostní analyzátory využívající Fourierovu transformaci patří iontová cyklotronová rezonance (FT-ICR) a orbitrap. FT-ICR poskytuje mimořádně vysoké rozlišení a přesnost při určování molekulových hmotností, což jej činí jedním z nejpokročilejších nástrojů hmotnostní spektrometrie. Pracuje na principu pohybu iontů v magnetickém poli, kde jejich frekvence cyklotronového pohybu odpovídá poměru m/z . Pohyb iontů je zaznamenáván jako elektrický signál a následně analyzován Fourierovou transformací. Nevýhodou FT-ICR jsou vysoké pořizovací a provozní náklady a delší doba analýzy oproti TOF analyzátorům. Orbitrap oproti FT-ICR nevyužívá magnetické pole, ale elektrostatické zachycení iontů mezi zakřivenými elektrodami. Ionty oscilují kolem centrální elektrody a jejich úhlová frekvence je úměrná odmocnině z jejich m/z . Tento pohyb je snímán a pomocí Fourierovy transformace převeden na hmotnostní spektrum. Orbitrap nabízí vysoké rozlišení a přesnost při nižších pořizovacích nákladech než FT-ICR, přičemž jeho analýza je pomalejší než u TOF, ale rychlejší než u FT-ICR. [60, 70, 71].

1.8.2.1 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie je technika umožňující detailnější analýzu iontů díky dvěma (nebo více) po sobě jdoucím analýzám, které jsou odděleny krokem fragmentace iontů (obrázek 16). V běžném skenovacím režimu procházejí ionty prvním a druhým kvadrupólem bez selektivní fragmentace a třetí kvadrupól analyzuje jejich poměr hmotnosti k náboji (m/z). Oproti tomu v režimu MS/MS je nejprve selektivně vybraný prekurzorový iont nasměrován do kolizní cely, kde dochází k jeho řízené fragmentaci na menší fragmentační ionty. Ty jsou poté analyzovány ve třetím kvadrupólu, což umožňuje detailní charakterizaci molekulární struktury. Tento přístup se široce využívá například při identifikaci složitých biomolekul, metabolitů nebo kontaminantů, jelikož poskytuje hlubší informace o složení a struktuře látek než běžný skenovací režim. [70, 72, 73].



Obrázek 16: Princip normálního a MS/MS skenovacího režimu u trojitého kvadrupólu, převzato [73] a upraveno.

1.8.3 Detektory

V hmotnostní spektrometrii bývá detektor umístěn za většinou analyzátorů, kde slouží k detekci iontů. Výjimku tvoří FT-ICR a Orbitrap, kde detekce probíhá přímo uvnitř analyzátoru. Mezi nejběžnější detektory patří elektronový násobič, fotonásobič a Faradayova klec. Elektronový násobič je jedním z nejčastěji používaných detektorů díky své vysoké citlivosti a schopnosti detekovat i velmi malé množství iontů. Funguje tak, že ionty z analyzovaného vzorku dopadají na jeho povrch, čímž uvolňují sekundární elektrony. Tyto elektrony jsou poté zesilovány v kaskádovém procesu pomocí dynod (elektrod s postupně rostoucím napětím), což generuje silný elektrický signál odpovídající intenzitě původního iontového toku [60, 70].

1.9 Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, představuje široce používanou analytickou metodu. Díky kombinaci separační schopnosti HPLC, která umožňuje efektivní oddělení jednotlivých sloučenin, a vysoké citlivosti a selektivity MS je možné analyzovat složité směsi s vysokou přesností. Tato metoda umožňuje v jediné analýze nejen separovat, ale i identifikovat složitou směs látek [60, 61].

HPLC/MS je výrazně složitější než spojení plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (GC/MS). HPLC/MS pracuje s kapalnou fází, což umožňuje analýzu netěkavých a polárních látek, jako jsou peptidy, proteiny, lipidy nebo fenoly. Měkké ionizační techniky, jako je ESI nebo APCI, minimalizují fragmentaci, což je užitečné při analýze komplexních biomolekul. Na rozdíl od GC/MS je interpretace spekter u HPLC/MS často manuální a závisí na zkušenostech analytika, protože neexistuje univerzální knihovna spekter pro automatické porovnání. Zatímco GC/MS je ideální pro těkavé látky a nabízí standardizované nástroje pro identifikaci, HPLC/MS vyniká při analýze biologických, farmaceutických a jiných komplexních vzorků [61, 62].

V HPLC/MS se jako mobilní fáze běžně používají směsi polárních rozpouštědel, které podporují kompatibilitu s měkkými ionizačními technikami. Základní složkou bývá voda, často okyselená kyselinou mravenčí nebo octovou pro zlepšení ionizace. Mezi nejčastěji používaná organická rozpouštědla v kapalinové chromatografii patří methanol a acetonitril. Methanol je polárnější rozpouštědlo než acetonitril, a proto silněji solvuje polární analyty. Tím snižuje jejich interakci s nepolární stacionární fází a vede k jejich rychlejší eluci. Naopak acetonitril má nižší viskozitu a vyšší eluční sílu, což zpravidla vede k rychlejší eluci analytů a často i k lepšímu chromatografickému rozlišení díky ostřejším píkům. V některých případech se přidávají těkavé pufrý, například octan amonný nebo mravenčnan amonný, aby se stabilizovalo pH a zlepšila ionizace, přičemž je nutné volit látky kompatibilní s ionizačním zdrojem. Hmotnostním analyzátozem bývá nejčastěji trojitý kvadrupól, TOF nebo Orbitrap. Výběr mobilní fáze i analyzátozem závisí na požadavcích analýzy [61, 62, 74].

V hmotnostní spektrometrii existuje několik režimů pro sledování iontů analytů, které se liší svou selektivitou, citlivostí a aplikací. Mezi základní režimy patří TIC (Total Ion Chromatogram), RIC (Reconstructed Ion Chromatogram), SIM (Selected Ion Monitoring) a SRM (Selected Reaction Monitoring). TIC poskytuje celkový přehled o vzorku tím, že zaznamenává intenzitu všech detekovaných iontů v průběhu času. Naopak RIC se zaměřuje pouze na vybrané ionty nebo úzký rozsah hodnot m/z . SIM umožňuje detekci pouze

specifických iontů s definovanými hodnotami m/z , nezabývá se celým rozsahem m/z , ale pouze zvolenou částí spektra. SRM je technika využívaná v tandemové hmotnostní spektrometrii, která sleduje přechody mezi prekurzorovými ionty a jejich fragmenty. Tento režim nabízí extrémně vysokou selektivitu a je ideální pro potvrzení identity látky a kvantifikaci v komplexních směsích [60].

1.10 Analýza fenolických látek obsažených v quinoe či jiných pseudoobilovinách

1.10.1 Příprava vzorků k analýze

Příprava vzorků je klíčovým krokem před analýzou sledovaných látek, protože správně zvolený postup minimalizuje jejich degradaci. Je nezbytné vybrat vhodnou metodu extrakce a rozpouštědlo, které zajistí účinnou izolaci analyzovaných látek. Semena quinoe se před samotnou extrakcí rozemelou na jemný prášek, který se následně homogenizuje proséváním přes síto a skladuje na suchém, tmavém místě při pokojové teplotě [32, 36, 41, 75]. Lipofilní látky lze odstranit například extrakcí hexanem [32, 41, 45, 69, 75], po níž následuje sušení pod dusíkem, aby se předešlo oxidaci fenolických sloučenin [32, 41, 45, 75].

Extrakce se obvykle provádí pomocí rozpouštědel, jako jsou methanol, ethanol nebo jejich vodné roztoky [32, 36, 45, 46, 69, 77], přičemž přídavek kyseliny zvyšuje její účinnost. Proces extrakce je často podpořen protřepáváním na rotační třepačce, které zajišťuje důkladné promíchání fází a zvyšuje účinnost extrakce. Následně může být vzorek vystaven ultrazvuku, jenž dále usnadňuje uvolňování analytů. Nakonec probíhá centrifugace, která umožňuje oddělení organické fáze od zbytku vzorku. Organická fáze se buď přímo analyzuje, nebo se za použití dusíku odpaří do sucha a získané extrakty se uchovávají v chladu až do další analýzy. K uvolnění vázaných fenolických sloučenin z glykosidických a esterových vazeb se využívají metody založené na hydrolýze [32, 36, 45, 68, 69, 75].

V případě, že jsou analyzovány jak volné, tak vázané fenolické látky obsažené v quinoe, je postup analýzy následovný. Volné fenolické látky z rozemletých semen quinoe se extrahují směsí vody a methanolu [32, 36, 69, 76] s přídavkem kyseliny mravenčí [32, 69, 45, 46]. Po centrifugaci se získaný supernatant odebere a filtruje přes PTFE filtr [32, 36, 46, 69]. Pevný zbytek se vysuší v proudu plynného dusíku a následně použije k extrakci vázaných fenolických sloučenin. K tomu se využívá buď alkalická, nebo kyselá hydrolýza [32, 36, 45, 46, 47], přičemž častěji se uplatňuje alkalická varianta s použitím NaOH v různých koncentracích. Vzniklá suspenze se protřepává při pokojové teplotě po dobu několika hodin.

Po uplynutí reakční doby se směs okyselí (např. HCl) na pH 1–2, což usnadňuje následnou extrakci fenolických látek [32, 36, 69]. Takto uvolněné fenolické látky se nejčastěji extrahují ethylacetátem, diethyletherem nebo jejich kombinací [32, 36, 46, 47, 69]. Spojené organické frakce se odpaří do sucha, obvykle pod proudem dusíku, a získaný odparek se rozpustí v rozpouštědle kompatibilním s daným separačním systémem, např. ve směsi methanolu a vody [32, 47, 69, 77]. Před analýzou se vzorky filtrují přes PTFE filtry [32, 36, 69, 77].

1.10.2 Stanovení fenolických sloučenin pomocí HPLC/MS metody

Stanovení fenolických sloučenin v quinoe a dalších pseudoobilovinách pomocí HPLC/MS se často provádí v systémech s obrácenými fázemi, kde jako stacionární fáze se nejčastěji používá oktadecylsilikagel (C18). S klesající velikostí zrnění náplně roste účinnost separace, a tedy i rozlišení jednotlivých analytů a dochází k separaci širokého spektra fenolických sloučenin [32, 36, 38, 46, 47, 68, 69, 75, 77, 78]. Jako mobilní fáze se nejčastěji používá binární směs rozpouštědel, tvořená vodou s přidávkem kyseliny, například kyseliny mravenčí [32, 36, 47, 68, 75] nebo octové [37, 69, 77, 78], a organickým rozpouštědlem, jako je methanol nebo acetonitril [32, 36, 38, 46, 47, 68, 69, 75, 77, 78]. Tato kombinace poskytuje optimální podmínky pro separaci většiny fenolických látek. Kyselina přidaná do mobilní fáze udržuje pH v rozmezí 2–4, čímž zabraňuje ionizaci fenolických kyselin [51]. Pro separaci se obvykle využívá gradientová eluce, která začíná vyšším podílem vodné fáze a postupně dochází ke zvyšování podílu organického rozpouštědla, což umožňuje efektivní separaci sloučenin s různou polaritou. Vzhledem ke složitosti těchto směsí bývá gradientový profil sestaven z několika postupných kroků s různou strmostí gradientu. V některých případech se také kombinuje s isokratickou elucí, aby byla dosažena co nejefektivnější separace jednotlivých složek [32, 36, 38, 46, 47, 68, 69, 75, 77, 78]. Fenolické látky jsou nejčastěji monitorovány při 280 nm a 360 nm [32, 36, 47, 51, 69, 75] a betalainy při 520 nm a 536 nm [36, 47].

Detekce se nejčastěji provádí hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem, která zajišťuje vysokou citlivost a umožňuje přesnou identifikaci i kvantifikaci fenolických sloučenin [32, 36, 68, 69, 75, 77, 78]. Tato metoda bývá často kombinována se spektrofotometrickou detekcí s využitím detektoru s diodovým polem, který umožňuje simultánní sledování absorpance při několika vlnových délkách [32, 36, 47, 51, 68, 69]. Z hmotnostních analyzátorů se nejčastěji využívá trojitý kvadrupól [32, 36, 75], který je vysoce citlivý a selektivní, což ho činí vhodným jak pro kvantitativní analýzu, tak pro cílenou identifikaci sloučenin.

Dalším běžně využívaným analyzátozem je TOF, který poskytuje vysokou přesnost určení m/z v širokém dynamickém rozsahu a umožňuje měření izotopového zastoupení pro stanovení elementárního složení [69, 75, 77].

Analýzy se provádějí při snímání kladných i záporných iontů, přičemž u fenolických látek je vyšší citlivost při snímání záporných iontů [32, 36, 68, 69, 75].

Jednotlivé fenolické látky v rostlinných extraktech se identifikují porovnáním retenčních časů, UV-VIS spekter nebo hmotnostních profilů s referenčními standardy. Pokud nejsou komerčně dostupné standardy k dispozici, lze identifikaci provést analýzou jejich charakteristických fragmentačních vzorců a srovnáním s databázemi spekter či literárními zdroji k potvrzení struktury analyzovaných látek [32, 36, 47, 69, 75, 77, 78].

Quinoa obsahuje široké spektrum fenolických sloučenin, které se vyskytují jak ve volné, tak vázané (konjugované) formě [32, 36, 47, 69, 75, 78]. Mezi tyto látky patří fenolické kyseliny, jako je kyselina vanilová, ferulová, *p*-hydroxybenzoová (*p*-HBA) a *p*-kumarová, včetně jejich derivátů [32, 35, 36, 47, 69, 75]. Kromě fenolických kyselin jsou v quinoe přítomny také flavonoidy, zejména kvercetin a kaempferol, spolu s jejich glykosidovými deriváty [35, 36, 47, 69, 75]. V semenech quinoe byla identifikována přítomnost rutinu [77, 78], což je právě glykosid kvercetinu. Další významnou skupinou fenolických sloučenin v quinoe tvoří proanthokyanidiny [32, 35, 75, 77, 78] (kondenzované taniny), které se skládají z flavan-3-olových podjednotek, například katechinu a epikatechinu. Tyto látky, společně s jejich glykosidovými deriváty, přispívají k antioxidační aktivitě quinoe a jsou zvláště hojně zastoupeny v červených a černých semenech [32, 36, 47, 75, 77, 78]. Důležitým zjištěním této analýzy je také přítomnost betakyaninů, konkrétně betaninu a isobetaninu, které byly nalezeny výhradně v červené a černé quinoe [13, 14, 35, 36, 47, 75]. Přítomnost těchto pigmentů potvrzuje, že quinoa neobsahuje antokyany, které jsou typické pro jiná rostlinná barviva. K ověření identity betakyaninů byl použit extrakt z červené řepy [36]. Při kyselé hydrolyze quinoe dochází k degradaci sacharidů, což vede ke vzniku sloučenin, jako jsou 5-hydroxymethylfurfural (HMF), furfural a 5-methoxymethylfurfural (MMF). Tyto produkty mohou sloužit jako indikátory rozkladu cukrů a zároveň mohou ovlivnit biologickou aktivitu extraktu. Z tohoto důvodu je vhodné před kyselou hydrolyzou odstranit volné cukry, například extrakcí na pevné fázi (SPE), aby nedocházelo k jejich degradaci během analýzy [36, 47].

1.10.3 Stanovení antioxidační kapacity a celkového množství fenolických látek

Antioxidační účinek quinoj je především výsledkem přítomnosti několika biologicky aktivních látek, mezi něž patří fenolické kyseliny, flavonoidy, saponiny, vitaminy a betalainy. Tyto sloučeniny společně přispívají k její vysoké antioxidační kapacitě [28-31].

Antioxidační kapacita extraktů z quinoj se běžně hodnotí pomocí metod DPPH [41, 47], ABTS [41], FRAP [73, 47] nebo ORAC [47]. Fenolické látky se v potravinách vyskytují buď ve volné (extrahovatelné) formě, nebo vázané na buněčné struktury, odkud se uvolňují například až během trávicího procesu. Pro uvolnění těchto vázaných forem se využívají tři různé postupy: kyselá, alkalická, nebo enzymatická hydrolýza. Uvolněné sloučeniny jsou následně analyzovány jednou z uvedených metod [28-31, 35, 736, 41, 73, 47].

Nejvyšší hodnoty antioxidační kapacity vykazuje zpravidla černá quinoa, a to bez ohledu na použitou metodu hydrolýzy. Naopak bílá quinoa dosahovala nejnižších hodnot. Při porovnání jednotlivých hydrolytických postupů se ukázalo, že fenolické látky uvolněné enzymatickým způsobem měly nižší TEAC ve srovnání s těmi, které byly uvolněny kyselou nebo alkalickou hydrolýzou. Mezi těmito dvěma pak mírně převažovala kyselá hydrolýza, a to i přesto, že výsledné extrakty obsahovaly nižší koncentraci celkových fenolických sloučenin. Tento jev lze pravděpodobně vysvětlit přítomností sloučenin typu HMF a jejich derivátů, které se tvoří během kyselé hydrolýzy a přispívají k celkové antioxidační kapacitě [47].

Dále byla v semenech quinoj, zejména u červených a černých odrůd, detekována přítomnost betalainů – dusíkatých pigmentů s výraznou antioxidační kapacitou. Tyto látky, přestože nespádají mezi fenolické látky, mohou významně přispět k celkovému antioxidačnímu profilu extraktů [35, 736].

Výsledky dále ukázaly, že tmavší odrůdy quinoj obsahují vyšší množství fenolických sloučenin a vykazují zároveň větší antioxidační kapacitu. Z toho vyplývá, že barva semen může sloužit jako užitečný indikátor obsahu bioaktivních látek i celkové schopnosti zhaset volné radikály. Při porovnání s jinými obilovinami či pseudoobilovinami se ukázalo, že quinoa má vyšší antioxidační kapacitu než pohanka, avšak o něco nižší než tvrdá pšenice [35, 736, 41, 42, 43, 73, 47].

Tato zjištění zdůrazňují význam jak volně přítomných, tak i vázaných forem fenolických sloučenin. Jejich antioxidační a potenciálně i protizánětlivé působení může mít zásadní význam zejména v oblasti tlustého střeva, kde dochází k jejich postupnému uvolňování vlivem střevní mikroflóry [35, 736, 41, 42, 43, 73, 47].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Přístroje a zařízení

Pro separaci fenolických látek byl využit kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, USA) spojený s hmotnostním spektrometrem QTRAP 4500 (ABSCIEX, USA). Pro separaci analyzovaných látek byly testovány tři druhy chromatografických kolon:

- Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, velikost částic 2,6 μm, Phenomenex, USA),
- Ascentis Express C18 (150 × 3 mm, velikost částic 2,7 μm, Supelco, USA),
- Kinetex C18 (150 × 3 mm, velikost částic 2,6 μm, Phenomenex, USA).

Stanovení antioxidační kapacity a celkového obsahu fenolických sloučenin bylo realizováno pomocí UV/VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2450 (Kyoto, Japonsko). Pro měření byla použita kyveta S/G10 s optickou délkou 10 mm (Fisher Scientific, Německo). Pro přípravu extraktů vzorků a standardů byly použity:

- Analytické váhy Sartorius (Německo)
- Laboratorní váhy KERN 440-35A (KERN&SOHN, Německo)
- Kulový mlýnek MM 400 (Retsch, Německo)
- Míchačka REAX 2 (Heildolph, Německo)
- Ultrazvuková vana K-12LE (Kraintek, Slovensko)
- Centrifuga Sorvall ST Plus Series (ThermoFisher Scientific, USA)
- Dusíková atmosféra
- pH-metr Methrom 827 (Švýcarsko)
- Automatické pipety (Biohit, Finsko)
- HandyStep (Brand, Německo)
- membránové filtry 0,45 μm hydrofilní PTFE (Chromservis, ČR)
- membránové filtry 0,22 μm PTFE (Labicom, ČR)
- injekční stříkačky 1 ml, 5 ml (Braun, Německo)
- vialky
- běžné odměrné a laboratorní sklo

2.2 Použité chemikálie

- Acetonitril LC-MS čistoty (Sigma Aldrich, USA)
- Acetonitril čistoty pro gradientovou eluci (Honeywell, Německo)
- Methanol čistoty pro gradientovou eluci (Honeywell, Německo)
- n-Hexan 95% (Lab-Scan, Polsko)
- Deionizovaná voda čištěná pomocí Mili-Q (Merck Milipore, Německo)
- Kyselina mravenčí 98% (Penta, ČR) a čistoty pro HPLC/MS (Tokyo Chemical Industry Co., LTD.)
- Hydroxid sodný (Penta, ČR)
- Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Lach-Ner, ČR)
- Diethylether p.a. (Penta, ČR)
- Ethylacetát p.a. (Lach-Ner, ČR)
- ABTS diamonná sůl (Sigma Aldrich, USA)
- Peroxodisíran draselný (Penta, ČR)
- 2M Folin-Ciocalteuovo činidlo (Sigma Aldrich, USA)
- Uhličitan sodný (Chemapol, ČR)

2.3 Standardy

Pro identifikaci fenolických sloučenin přítomných ve vzorcích quinoových zrn byly využity referenční standardy uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4: Referenční standardy fenolických kyselin a flavonoidů (Sigma Aldrich, USA).

Značení	Referenční standardy	Sumární vzorec	Molární hmotnost [g/mol]	[M-H] ⁻
1	<i>p</i> -hydroxybenzoová kyselina	C ₇ H ₆ O ₃	138,12	137,12
2	Vanilin	C ₈ H ₈ O ₃	152,15	151,15
3	3,4-dihydroxybenzoová kyselina	C ₇ H ₆ O ₄	154,12	153,12
4	<i>p</i> -kumarová kyselina	C ₉ H ₈ O ₃	164,05	163,05
5	Vanilová kyselina	C ₈ H ₈ O ₄	168,14	167,14
6	Kávoová kyselina	C ₉ H ₈ O ₄	180,16	179,16
7	Ferulová kyselina	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	193,18
8	Syringová kyselina	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,18	197,18
9	Sinapová kyselina	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,22	223,22
10	Keampferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,23	285,23
11	(-)-Epikatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,27	289,27
12	Kvercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,24	301,24
13	Orientin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,38	447,38
14	Isoquercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₂₀	464,38	463,38
15	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,52	609,52
16	Isorahmnetin 3-rutinosid	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624,54	623,54

2.4 Vzorky

V rámci experimentální části této diplomové práce bylo analyzováno celkem šest vzorků quinoových zrn různé barvy (V1 – V6), které byly zakoupeny v místní maloobchodní síti (tabulka 5, obrázek 17). Všechny vzorky byly uchovávány na suchém a tmavém místě a před analýzou byly vždy čerstvě namlety. Vzorky V1, V2 a V3 byly přibližně rok otevřené, a lišily se tedy délkou skladování. Vzorky V4, V5 a V6 byly zakoupeny v letošním roce.



Obrázek 17: Vzorky quinoových zrn.

Tabulka 5: Přehled vzorků quinooy.

Označení vzorku	Název	Výrobce	Původ	Rok nákupu
V1	Quinoa bílá	Menu gold	Peru	2024
V2	Quinoa červená	Countrylife	Bolívie	2024
V3	Quinoa černá	Zdraví z přírody	Bolívie	2024
V4	Quinoa bílá	Grizly	Indie	2025
V5	Quinoa červená	Grizly	Indie	2025
V6	Quinoa černá	Grizly	Peru	2025

2.5 Pracovní postupy

2.5.1 Příprava vzorků

Zrna quinoy byla nejprve rozemleta a následně homogenizována prosetím přes síto s póry o velikosti 0,5 mm. Na analytických vahách bylo odváženo 2 g mletého vzorku, který byl následně umístěn do plastové centrifugační zkumavky. K tomuto množství bylo přidáno 15 ml hexanu a směs byla po dobu 15 minut třepána na laboratorní třepačce. Následně byla odstraněna kapalná fáze obsahující extrahované lipofilní látky a extrakční proces byl zopakován. Nakonec byly odtučněné vzorky vysušeny pod proudem dusíku. Takto připravené vzorky byly podrobeny různým metodám extrakce.

2.5.1.1 Extrakce volných fenolických látek

Při jednoduché extrakci byly fenolické látky izolovány pomocí 30 ml 70% methanolu okyseleného kyselinou mravenčí (1 %, v/v). Po 15 minutách následovalo odstředění (8000 rpm, 5 minut) a následně byla horní organická vrstva odebrána a přefiltrována. Zbylá pevná fáze byla vysušena pod proudem dusíku a podrobena alkalické a kyselé hydrolyze za účelem extrakce vázaných fenolických látek.

2.5.1.2 Alkalická hydrolyza a extrakce vázaných fenolických látek

K vysušenému pevnému zbytku po extrakci volných fenolických látek bylo přidáno 20 ml 4M NaOH. Po 4 hodinách míchání na laboratorní třepačce byl roztok okyselen HCl na pH 2 a uvolněné fenolické látky byly extrahovány 20 ml extrakční směsí diethylether-ethylacetát v poměru 1:1 (v/v) po dobu 15 minut. Tento extrakční proces byl zopakován. Pro oddělení organické fáze byl vzorek odstředěn a následně odpařen. Získaný odparek byl uchováván v lednici až do samotné analýzy.

2.5.1.3 Kyselé hydrolyza a extrakce vázaných fenolických látek

K vysušenému pevnému zbytku po extrakci volných fenolických látek bylo přidáno 20 ml 1M HCl a roztok byl zahříván ve vodní lázni při teplotě 90 °C po dobu 45 minut, čímž byla provedena kyselé hydrolyza. Poté byl vzorek ochlazen na laboratorní teplotu a extrahován 20 ml směsí diethylether-ethylacetát v poměru 1:1 (v/v) po dobu 15 minut. Tento extrakční proces byl zopakován. Horní organická fáze byla opět odpařena a získaný odparek byl uchováván v lednici až do samotné analýzy.

2.5.2 Spektrofotometrické metody

2.5.2.1 Metoda ABTS

V 10 ml odměrné baňce bylo rozpuštěno 20 mg ABTS a poté bylo do roztoku přidáno 200 μ l $K_2S_2O_8$. Směs byla uchovávána v lednici přibližně 16 hodin, chráněná před světlem. Tmavě zelené zbarvení směsi indikovalo vznik ABTS radikálu. Vzniklá směs byla vhodně naředěna, aby absorbance roztoku měla hodnotu v rozmezí 0,8-0,9. Poté byly pipetovány 3 ml tohoto roztoku, ke kterým bylo přidáno 50 μ l testovaného vzorku a směs byla důkladně promíchána. Po 60 minutách byl změřen úbytek absorbance [81] při vlnové délce 734 nm. Pro každou sérii měření byl paralelně proveden i kontrolní (slepý) pokus, kde byl vzorek nahrazen samotným extrakčním činidlem. Výsledná antioxidační kapacita extraktu byla vyjádřena jako procentuální inhibice roztoku (rovnice 1). Pomocí kalibrační křivky [81] byla následně tato hodnota převedena na množství standardu Trolox a přepočtena na 1 gram analyzovaného vzorku.

$$inhibice (\%) = \frac{A_{blk} - A_{vz}}{A_{blk}} \cdot 100 \quad (1)$$

2.5.2.3 Stanovení celkového množství fenolických látek

Pro stanovení celkového obsahu fenolických sloučenin byl pracovní roztok připraven zředěním 2M Folin-Ciocalteuova činidla destilovanou vodou v poměru 1:20. Do 2 ml takto připraveného činidla bylo přidáno 50 μ l analyzovaného vzorku [81]. Směs byla promíchána a po uplynutí 5 minut byl přidán 1 ml 7,5% roztoku Na_2CO_3 . Po dalších 30 minutách inkubace byla u všech vzorků změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Paralelně byl proveden také slepý pokus, ve kterém byl místo extraktu použit samotný extrakční roztok. Nárůst absorbance byl pomocí kalibrační křivky přepočítán na množství kyseliny galové jako standardu [81]. Výsledný obsah fenolických látek byl vyjádřen jako množství kyseliny galové v 1 gramu vzorku.

2.5.3 HPLC/MS/MS analýza

2.5.3.1 Příprava vzorků

Předem připravené odparky vzorků po alkalické a kyselé hydrolyze byly rozpuštěny v 10 ml 50% acetonitrilu s přídavkem kyseliny mravenčí za použití ultrazvukové lázně, aby byla zajištěna úplná homogenizace extraktu a rozpouštědla. Acetonitrilový extrakt byl následně odstředěn a kapalná fáze zfiltrována pomocí stříkačkových PTFE filtrů s velikostí pórů 0,45 nebo 0,22 μm . Na závěr byl extrakt naředěn tak, aby koncentrace analytů spadala do rozsahu kalibrační křivky. Vzorky obsahující pouze volné fenolické látky byly po filtraci rovněž naředěny do rozsahu kalibrační křivky.

2.5.3.2 Příprava standardů

Standardy pro identifikaci byly připraveny rozpuštěním přesně navážených referenčních látek v methanolu na koncentraci 1 g/l. Z těchto roztoků byl následně připraven směsný zásobní roztok o koncentraci 10 mg/l, z něhož byla připravena kalibrační řada v rozmezí koncentrací 0,01–1,8 mg/l. Dále byly připraveny roztoky pro ověření návratnosti metody o koncentracích 0,03; 0,5 a 1,5 mg/l. Kalibrační roztoky byly doplněny 50% acetonitrem s přídavkem kyseliny mravenčí.

2.5.3.3 Příprava mobilní fáze

Pro vodnou mobilní fázi (MF-A) byl použit 0,1% roztok kyseliny mravenčí, připravený rozpuštěním 98% kyseliny mravenčí v deionizované vodě. Jako organická mobilní fáze (MF-B) byl použit 100% acetonitril vhodný pro HPLC/MS analýzu. Mobilní fáze protékala systémem rychlostí 0,4 ml/min při teplotě kolony 30 °C. Objem nástřiku vzorku činil 2 μl .

2.5.3.4 Optimalizované podmínky analýzy

Pro separaci byla zvolena kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, velikost částic 2,6 μm) z důvodu její nejvyšší účinnosti při separaci analyzovaných látek. Výběr byl založen na její vhodné selektivitě, účinnějším rozlišení analytů a lepší reprodukovatelnosti výsledků ve srovnání s jinými dostupnými kolonami. Dalším faktorem byla kompatibilita s použitou mobilní fází, což vedlo k vyšší přesnosti a citlivosti analýzy. Pro zajištění lepší separace a kratších retenčních časů byla využita gradientová eluce, která umožnila efektivnější rozdělení složek vzorku a zlepšila detekovatelnost analytů. Použitý gradient je uveden v tabulce 6.

Tabulka 6: Optimalizovaný gradient.

Čas [min]	MF-B [%]
0	10
0,1	22
5	24
7	50
8	100
10	10

K identifikaci byl využit hmotnostní spektrometr Q-TRAP, který pracoval v režimu detekce záporných iontů. Jako iontový zdroj byl použit elektrosprej a jako analyzátor trojitý kvadrupól (QqQ). Pro kvantifikaci jednotlivých fenolických sloučenin v připravených extraktech byly optimalizovány specifické parametry potřebné pro analýzu v režimu MRM (multiple reaction monitoring). Optimalizace MRM přechodů pro látky, u nichž byly k dispozici referenční standardy, byla provedena pomocí přímé infuze do hmotnostního spektrometru. U látek, pro něž komerčně dostupné standardy nebyly k dispozici, byly jednotlivé parametry optimalizovány postupně pomocí HPLC/MS/MS analýzy. Mezi optimalizované parametry MRM přechodů patří deklasterační potenciál (DP), kolizní energie (CE) a výstupní potenciál kolizní cely (CXP).

Hmotnostní spektrometr při přímé infúzi pracoval za následujících podmínek: průtok: 5-10 $\mu\text{l}/\text{min}$; ESI-; „curtain gas“: 10 psi; kolizní plyn: medium; napětí na kapiláře iontového zdroje: - 4 500 V; teplota zmlžujícího plynu: 0 °C; tlak zmlžujícího plynu: 20 psi; tlak sušícího plynu: 0 psi; vstupní potenciál: - 10 V; deklasterační potenciál byl v rozmezí -20 V až -200 V v závislosti na sloučenině.

Měření HPLC/MS probíhalo za následujících podmínek: průtok 0,4 ml/min, ESI-; „curtain gas“: 20 psi, „ion source“; kolizní plyn: medium; napětí na kapiláře iontového zdroje: - 4 000 V; teplota zmlžujícího plynu: 500 °C; tlak zmlžujícího plynu: 50 psi; tlak sušícího plynu: 50 psi; vstupní potenciál: - 10 V. Při těchto podmínkách byly optimalizovány parametry MRM přechodů, jejichž hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7 ve výsledkové a diskusní části. Jako sušící a zmlžující plyn byl použit dusík.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Optimalizace HPLC/MS

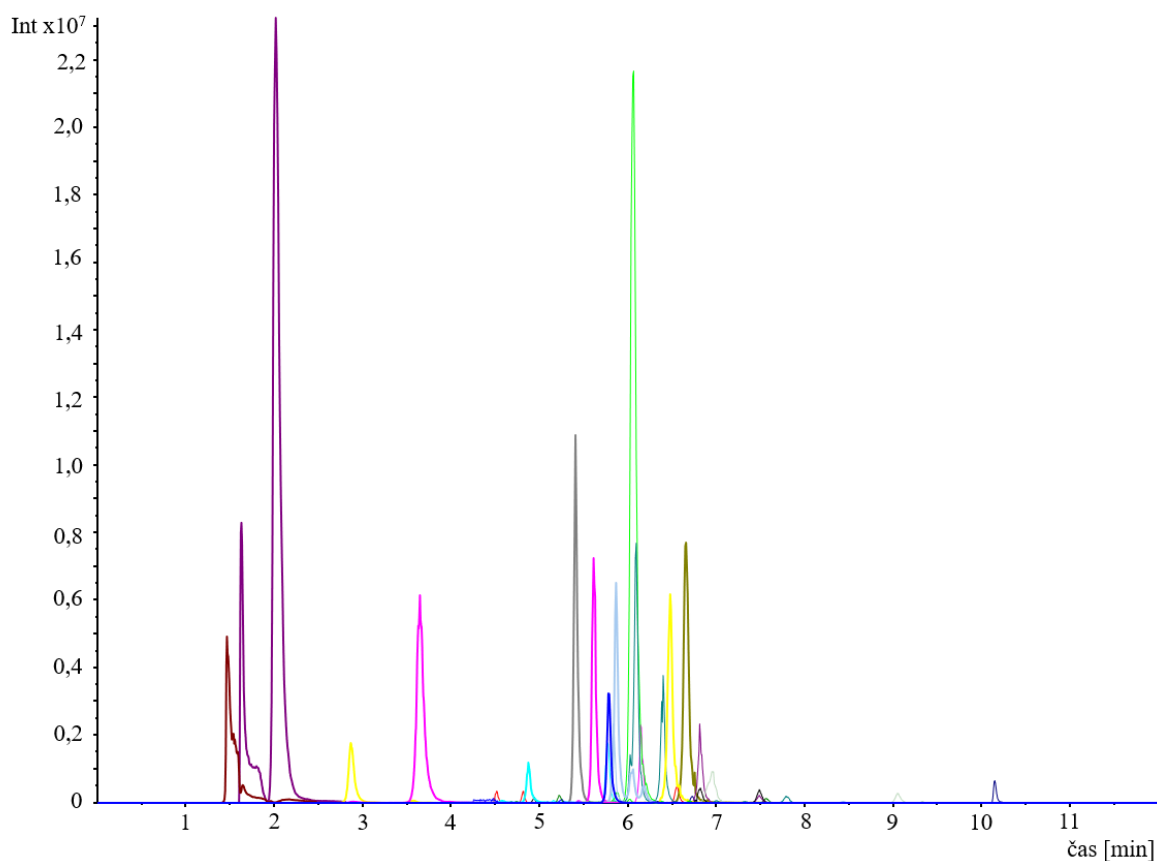
Optimalizace separačních podmínek byla provedena na extraktu z červených zrn quinoj, protože dle literatury i našich úvodních experimentů tato odrůda obsahuje největší množství fenolických látek. Pro tento účel byly testovány tři různé chromatografické kolony. Nejprve byly vyzkoušeny klasické oktadecylsilikagelové stacionární fáze – Kinetex C18 a Ascentis Express C18. Následně byla testována kolona Kinetex Polar C18 s polárně modifikovaným povrchem, která je vhodná pro separaci polárnějších sloučenin.

Kolony Kinetex C18 a Ascentis Express C18, naplněné klasickou nepolární stacionární fází, poskytovaly dostatečnou separaci u méně polárních fenolických sloučenin. Nicméně u polárnějších analytů, zejména glykosidovaných forem, docházelo k nedostatečné retenci a koeluci. Naproti tomu Kinetex Polar C18, která kombinuje nepolární C18 řetězce s polárními funkčními skupinami, umožnila lepší interakci s polárními sloučeninami. Díky tomu byla dosažena výrazně lepší retence a chromatografické rozlišení napříč celým spektrem studovaných fenolických látek.

Kromě výběru vhodné chromatografické kolony byla optimalizována i organická složka mobilní fáze. V rámci optimalizačních experimentů byla testována vhodnost methanolu a acetonitrilu jako organických složek mobilní fáze. Protože při použití methanolu byly pozorovány asymetrické píky (docházelo ke chvostování) a rozlišení jednotlivých separovaných látek bylo nízké, byl pro separaci vybrán acetonitril. Acetonitril jako aprotické rozpouštědlo, na rozdíl od methanolu, neinteraguje se vzorkem prostřednictvím vodíkových vazeb, což vede k lepší opakovatelnosti a ostřejším píkům. Výhodou acetonitrilu je také jeho nižší viskozita, což snižuje odpor toku mobilní fáze, a tím i tlak v systému. Navíc vykazuje téměř lineární závislost viskozity na koncentraci ve vodě, což usnadňuje predikci systémového tlaku při změnách složení mobilní fáze. Během optimalizace zůstaly parametry, jako je průtok mobilní fáze, teplota kolony a objem nástřiku, konstantní.

Po výběru organického rozpouštědla následovala optimalizace gradientového profilu pro separaci studovaných fenolických látek. Hlavním cílem bylo dosáhnout co nejefektivnější separace co největšího počtu fenolických látek v co nejkratším čase, a to při zachování vysokého rozlišení. Optimalizaci komplikovalo velké zpoždění gradientu, proto byla do gradientu zařazena skoková změna, která vedla k rychlejšímu posunu podmínek a umožnila lepší rozlišení všech studovaných fenolických látek bez nutnosti prodlužovat čas analýzy. Protože bylo analyzováno velké množství flavonoidních glykosidů, které mají velice

blízkou strukturu, a tedy i retenční chování, nebylo možné při použití standardního lineárního gradientu dosáhnout minimálně jednotkového rozlišení a musel být do programu zařazen izokratický krok. Další úpravou strmosti gradientu byla snaha optimalizovat především separaci flavonoidních glykosidů, které eluují velmi blízko u sebe. Výsledná chromatografická separace volných fenolických látek obsažených v extraktu z červené quinoy je zobrazena na obrázku 18. Z obrázku je patrné, že zvolený separační systém umožňuje účinné rozdělení jednotlivých fenolických látek do 11 minut. Částečná koeluce některých flavonoidních glykosidů nekomplikovala analýzu, protože tyto látky se lišily fragmentačním chováním, a tedy byly rozlišeny hmotnostním spektrometrem. Optimalizované podmínky byly následně využity pro identifikaci sloučenin obsažených v různých vzorcích quinoy pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie.



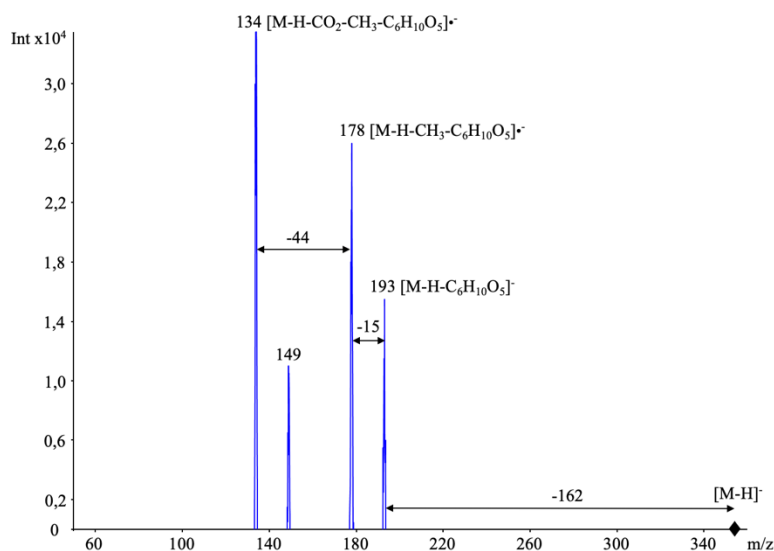
Obrázek 18: Optimalizovaná separace studovaných fenolických látek.

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze ACN/voda + HCOOH (0,1 %), gradient: 0 min – 10% ACN, 0,1 min – 22% ACN, 5 min – 24% ACN, 5 min – 24% ACN, 7 min – 50% ACN, 8 min – 100% ACN, 10 min – 10% ACN, průtok: 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM.

3.2 Identifikace fenolických látek ve vzorcích quinoových zrn

K identifikaci fenolických látek v extraktech připravených z quinooy byla využita kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (RP-HPLC) spojená s hmotnostním spektrometrem vybaveným ESI a QqQ. V první fázi analýzy byly vzorky měřeny v režimu úplného skenování, což umožnilo detekci všech iontů v daném rozsahu hmotností jak při snímání záporných (ESI^-), tak při snímání kladných (ESI^+) iontů. Pro získání detailnějších informací o struktuře analyzovaných látek byla následně provedena tandemová hmotnostní spektrometrie. V MS spektru byly identifikovány signály odpovídající deprotonovaným $[\text{M}-\text{H}]^-$ a protonovaným $[\text{M}+\text{H}]^+$ molekulám. Z MS/MS spekter byly vyhodnoceny charakteristické ztráty a fragmenty odpovídající struktuře jednotlivých fenolických látek. Na základě těchto neutrálních ztrát a fragmentů a rovněž s ohledem na poznatky z literatury byly identifikovány fenolické látky obsažené v jednotlivých extraktech připravených ze zrn quinooy. U fenolických látek, pro které byly k dispozici referenční standardy (tabulka 4), byla přítomnost potvrzena také porovnáním retenčních časů.

Ve vzorcích byla detekována významná přítomnost glykosidovaných forem fenolických kyselin a flavonoidů, u nichž nebyly k dispozici odpovídající standardy, ale v jejichž MS/MS spektrech byly pozorovány charakteristické neutrální ztráty odpovídající navázaným sacharidovým jednotkám (obrázek 19). U glukosidů, galaktosidů a dalších hexosidů byla pozorována charakteristická ztráta m/z 162, u pentosidů (ribóza, arabinóza, xylóza atd.) to byla ztráta m/z 132, a u rutinoidů ztráta m/z 308. Dále byly pozorovány ztráty odpovídající více sacharidovým jednotkám a jejich kombinacím. Pro identifikaci byl důležitý i vznikající fragmentový iont, který zpravidla odpovídal aglykonu dané fenolické látky.

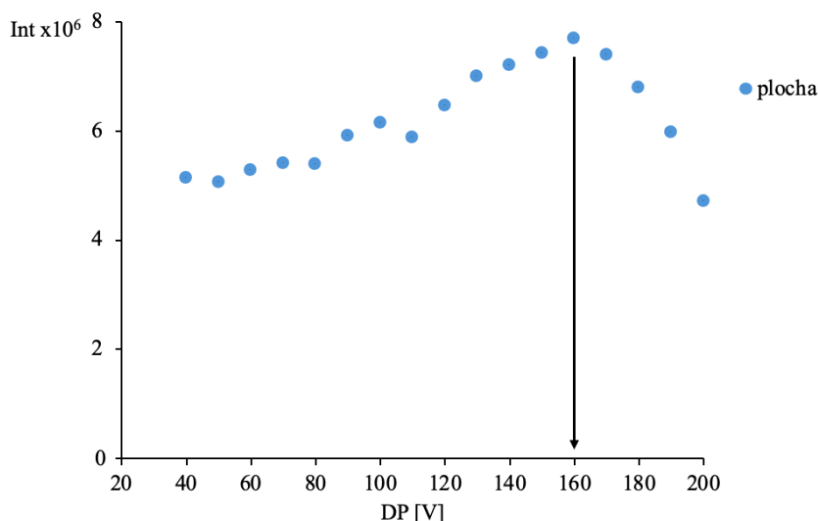


Obrázek 19: MS/MS spektrum glykosidu kyseliny ferulové ($m/z = 355$, ESI^-).

3.3 Optimalizace MRM přechodů

Optimalizace MRM přechodů s využitím hmotnostního spektrometru Q-TRAP byla klíčová pro dosažení co nejvyšší citlivosti, selektivity a přesnosti při kvantifikaci cílových sloučenin.

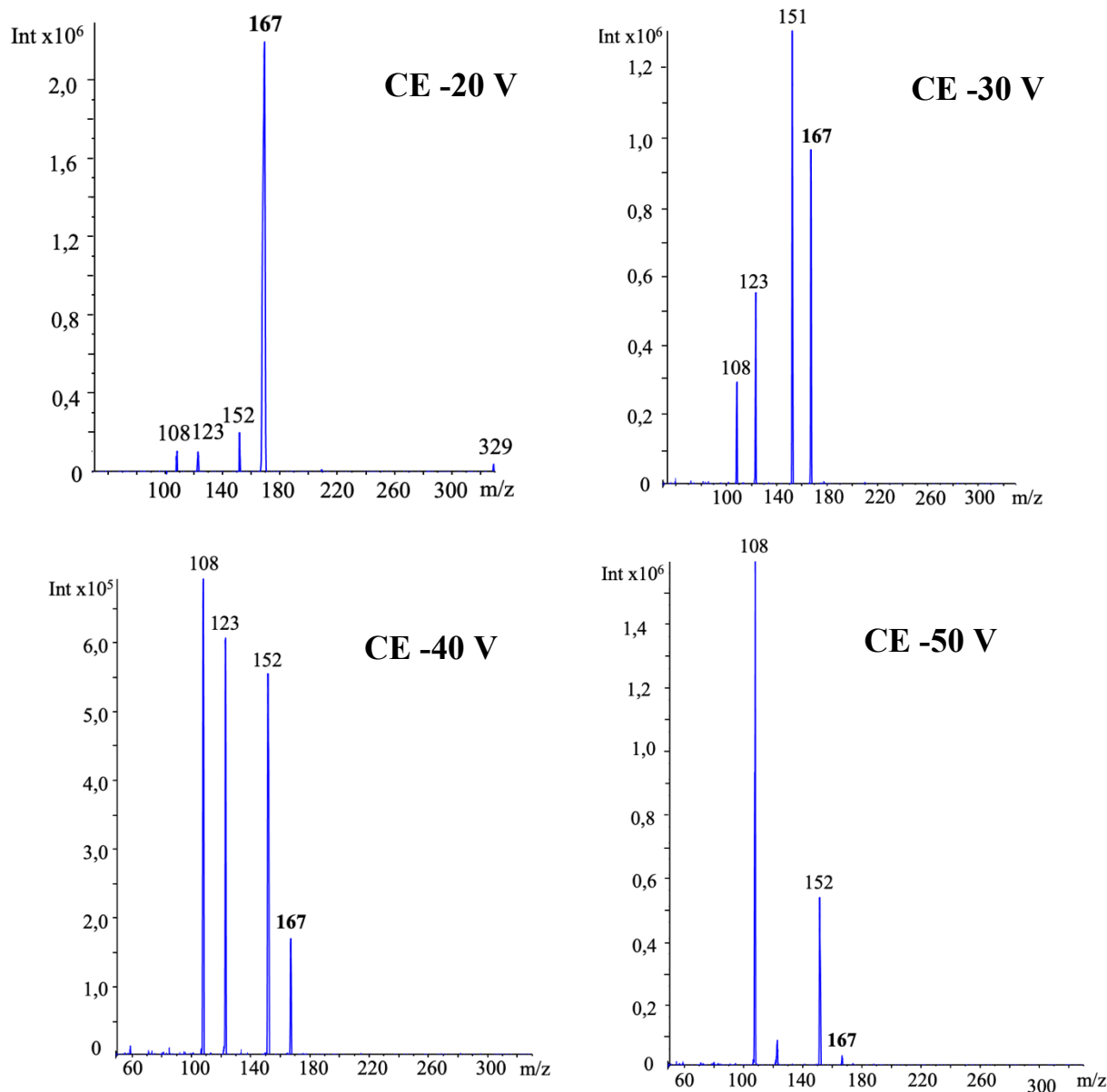
Quinoa obsahuje značné množství glykosylovaných fenolických sloučenin, pro které nejsou běžně dostupné komerční standardy, proto byla pro tyto látky provedena individuální optimalizace jednotlivých parametrů MRM přechodů. Prvním optimalizovaným parametrem byl deklasterační potenciál, který je klíčový pro efektivní přenos molekulárních iontů do hmotnostního analyzátoru, protože usnadňuje odstranění solvatačních obalů a slabě vázaných aduktů, které vznikají během ionizace. DP byl testován v rozsahu od -20 do -200 V. Na základě měření byla sestavena závislost intenzity signálu na hodnotě DP (obrázek 20). Pro každý analyt byla vybrána hodnota DP, kde byla intenzita signálu maximální (obrázek 20).



Obrázek 20: Optimalizace deklasteračního potenciálu pro sloučeninu o m/z 755.

Dalším optimalizovaným parametrem byla kolizní energie, jejíž nastavení je zásadní pro vznik nejintenzivnějšího a zároveň stabilního produktového iontu. CE ovlivňuje míru fragmentace prekurzorového iontu v kolizní cele, kde dochází ke srážkám s neutrálním plynem (např. dusíkem). Správně zvolená kolizní energie umožňuje řízený rozpad molekuly a generování charakteristických fragmentů, které jsou následně detekovány jako produktové ionty v režimu MRM.

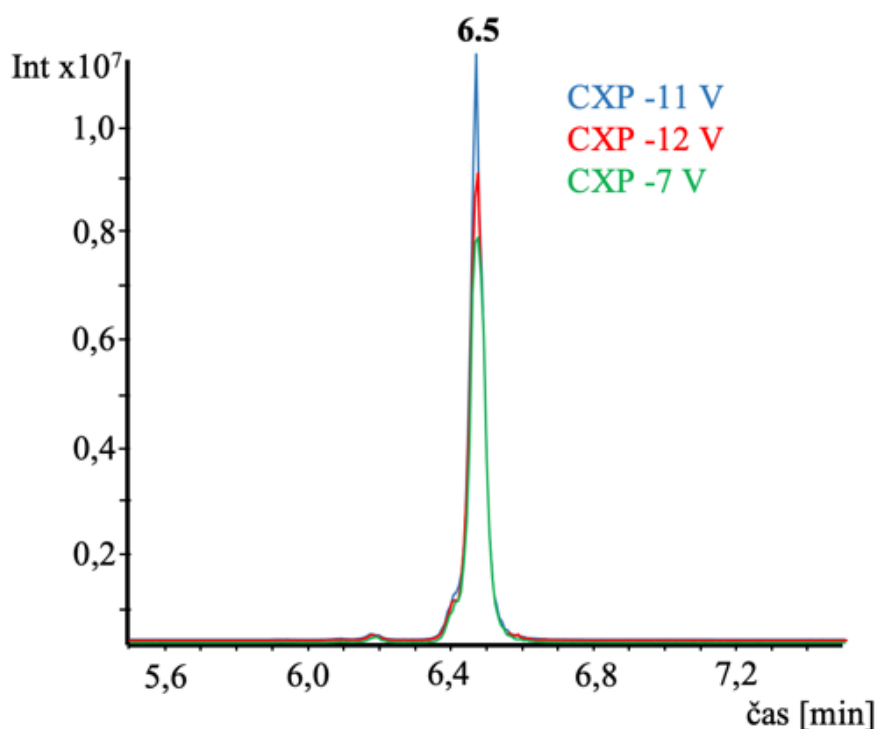
CE byla testována v rozsahu -50 až -20 V. Při každé testované hodnotě CE byla zaznamenána fragmentační spektra a sledována intenzita signálu hlavních produktových iontů (obrázek 21). Jak je z jednotlivých spekter patrné, s rostoucí hodnotou CE se zvyšuje míra fragmentace a dochází ke změně poměru mezi původním a fragmentovanými ionty. Optimální hodnota CE byla stanovena jako ta, při níž byla intenzita cílového produktového iontu nejvyšší.



Obrázek 21: Optimalizace kolizní energie pro m/z 329 (glykosid kyseliny vanilové).

Posledním parametrem, který byl optimalizován, byl výstupní potenciál kolizní cely. Tento parametr ovlivňuje přenos produktových iontů z kolizní cely do detekční části hmotnostního spektrometru. Jeho správné nastavení je důležité pro minimalizaci ztrát fragmentů a dosažení stabilního a intenzivního signálu.

Hodnoty CXP byly testovány v rozsahu -14 až -5 V. Pro jednotlivé analyty byla na základě naměřených dat stanovena optimální hodnota, při níž bylo dosaženo maximální intenzity (obrázek 22).



Obrázek 22: Optimalizace CXP pro m/z 595 (derivát kvercetinu).

U látek, pro které byly dostupné standardy, byla optimalizace MRM přechodů provedena pomocí přímé infuze standardních roztoků do hmotnostního spektrometru. Tento postup umožnil přesně stanovit optimální hodnoty výše zmíněných parametrů. Na základě získaných dat byly vybrány nejintenzivnější a nejstabilnější přechody, které byly následně využity pro kvantitativní analýzu. Optimalizované parametry všech analyzovaných látek jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7: Optimalizované MRM přechody pro HPLC/MS/MS analýzu fenolických sloučenin.

Značení	Látka	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	t _R [min]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
1	glykosid k. kávové	341	179	1,47	-90	-18	-7
2	glykosid k. 4-methoxybenzoové	283	151	1,80	-90	-24	-12
3	glykosid k. vanilové	329	167	2,88	-90	-20	-11
4	k. 3,4- dihydroxybenzoová	153	109	3,66	-70	-20	-7
5	derivát kvercetinu	771	301	4,41	-140	-54	-9
6	glykosid k. ferulové	355	193	4,50	-70	-44	-5
7	glykosid k. <i>p</i> -kumarové	325	119	4,55	-70	-18	-11
8	glykosid k. ferulové	355	193	4,80	-70	-18	-11
9	k. <i>p</i> -hydroxybenzoová	137	93	4,88	-50	-20	-3
10	prokyanidin	577	289	4,93	-90	-28	-9
11	glykosid rutinu	771	609	5,04	-140	-48	-8
12	epikatechin	289	245	5,15	-105	-20	-7
13	k. vanilová	167	152	5,21	-65	-20	-5
14	k. kávová	179	135	5,25	-70	-20	-7
15	k. syringová	197	123	5,36	-70	-30	-7
16	kvercetin-3-O-rutinosid-rhamnosid	755	300	5,37	-160	-52	-12
17	orientin	447	357	5,52	-135	-30	-9
18	kvercetin-3-O-rutinosid-pentosid	741	300	5,59	-140	-54	-11
19	derivát kaempferolu	739	284	5,73	-150	-52	-8
20	glykosid kvercetinu	623	301	5,76	-130	-38	-9
21	isorhamnetin-rutinosid-rhamnosid	769	314	5,79	-160	-54	-8
22	rutin	609	300	5,89	-100	-28	-10
23	glykosid kvercetinu	463	301	5,99	-140	-46	-9
24	glykosid kvercetinu	609	301	6,03	-120	-38	-5
25	kvercetin-O-pentosid-hexosid	595	300	6,06	-130	-46	-11
26	vanilin	151	92	6,25	-60	-28	-7
27	prokyanidin	577	289	6,34	-90	-28	-9
28	diosmetin-7-O-rutinosid	607	285	6,37	-90	-36	-11
29	k. <i>p</i> -kumarová	163	119	6,49	-70	-20	-5
30	glykosid isorhamnetinu	623	314	6,52	-80	-30	-9
31	derivát kvercetinu	477	301	6,65	-140	-36	-5
32	isoquercitrin	463	300	6,68	-140	-48	-8
33	derivát kvercetinu	579	300	6,71	-120	-30	-9
34	derivát kaempferolu	593	285	6,80	-130	-48	-10
35	k. ferulová	193	134	6,98	-45	-22	-11
36	k. sinapová	223	164	6,98	-80	-20	-5
37	isorhamnetin-3-O-rutinosid	623	315	7,33	-175	-42	-11
38	glykosid kvercetinu	463	301	9,05	-100	-28	-10
39	kaempferol-3,7-dirhamnosid	577	284	9,30	-90	-42	-6
40	kvercetin	301	151	10,13	-110	-28	-5
41	kaempferol	285	184,5	10,35	-125	-38	-7

3.4 Porovnání fenolických látek v jednotlivých extraktech

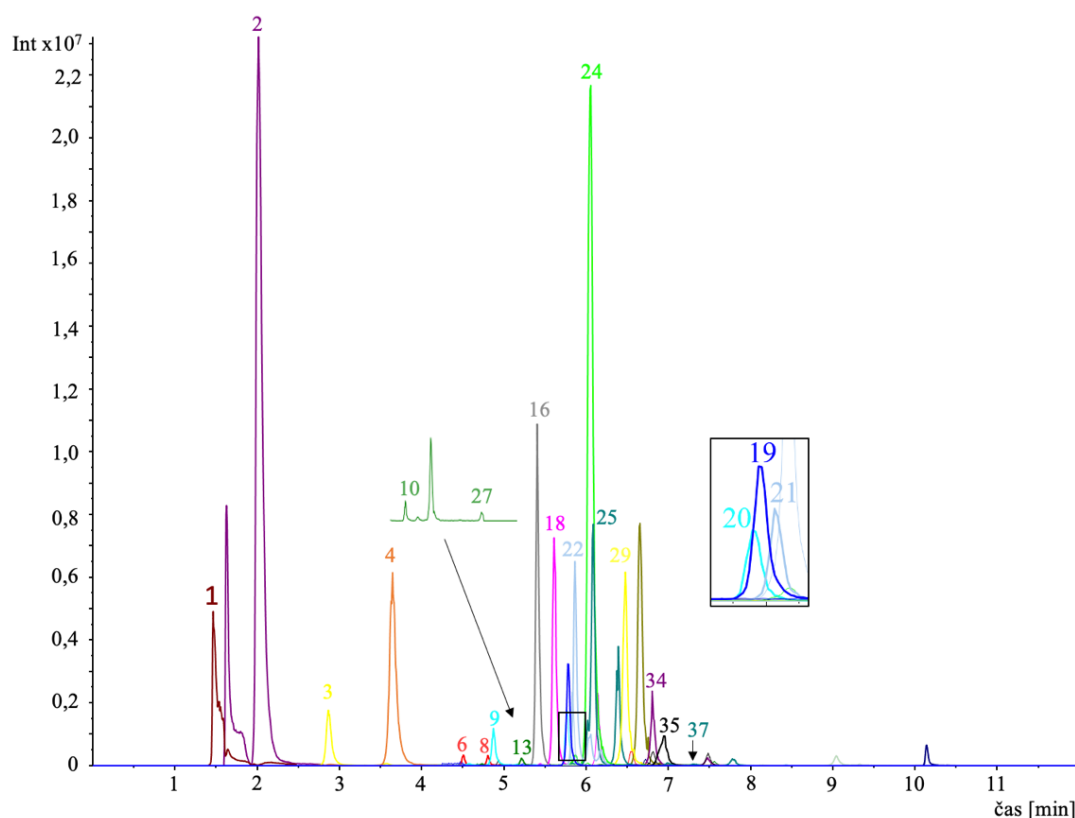
Pro stanovení profilu fenolických látek byly ze semen tří odrůd quinoj – bílé, červené a černé – připraveny extrakty volných sloučenin pomocí 70% methanolu s přidavkem kyseliny mravenčí. Dále byly u všech vzorků provedeny hydrolýzy, jak alkalická, tak kyselá s cílem uvolnit fenolické látky vázané esterovými a glykosidickými vazbami. U každého typu extrakce a každé odrůdy byla připravena dvě nezávislá opakování, přičemž každý extrakt byl dvakrát analyzován optimalizovanou metodou HPLC/MS/MS v režimu MRM. Tento přístup umožnil citlivou a selektivní detekci širokého spektra cílených sloučenin a zároveň poskytl kvalitativní přehled o rozdílech mezi jednotlivými vzorky a extrakčními přístupy, především z hlediska jejich relativní intenzity.

Nejbohatší profil volných fenolických látek byl pozorován v extraktu připraveného z červené quinoj (obrázek 23). Jednotlivé píky jsou v obrázku očíslovány dle tabulky detekovaných látek (tabulka 7). Tento vzorek byl zvolen pro ilustraci vzhledem k nejvyšší rozmanitosti a intenzitě detekovaných sloučenin. Pro srovnání jsou separace volných fenolických látek v bílé a černé odrůdě uvedeny v příloze 1 – 2.

Jak je z uvedených separací patrné, u extraktu z červené quinoj bylo pozorováno široké zastoupení identifikovaných fenolických kyselin i flavonoidních derivátů, z nichž mnohé z nich vykazovaly vysokou intenzitu signálu. U extraktů z černé quinoj bylo rovněž pozorováno pestré zastoupení studovaných látek, avšak některé sloučeniny byly přítomny ve znatelně nižší míře. Naproti tomu extrakt připravený z bílé quinoj obsahoval výrazně méně fenolických látek, protože řada z nich byla přítomna v koncentracích pod limitem kvantifikace či nebyla detekována vůbec (příloha 1).

Napříč všemi vzorky byly nejčastěji detekovány glykosidované deriváty fenolických kyselin. Velmi výrazný pík byl zaznamenán pro glykosid kyseliny 4-methoxybenzoové (č. 2), který se objevil ve všech odrůdách, s nejvyšší intenzitou v červené quinoe. K dalším hojně zastoupeným patří glykosid kyseliny kávové (č. 1) a glykosid kyseliny vanilové (č. 3). Významnou intenzitu v červené quinoe vykazovala také kyselina 3,4-dihydroxybenzoová (DHB, č. 4), která však v černé odrůdě byla detekována jen slabě a v bílé prakticky chyběla. Glykosidy kyseliny ferulové (č. 6 a č. 8) byly relativně dobře detekovatelné ve všech barevných odrůdách quinoj. Jedná se o dva různé izomery nebo různé konjugáty. Fenolické kyseliny byly detekovány také v neesterifikované formě, například kyselina vanilová (č. 13), *p*-kumarová (č. 29) nebo ferulová (č. 35). Jejich výskyt byl zpravidla méně výrazný, některé byly přítomny jen v jedné z odrůd.

Největší zastoupení identifikovaných látek bylo pozorováno mezi 5. a 7. minutou, kde eluovaly především glykosilované flavonoidy, které mají velmi podobnou strukturu, a tedy i blízké retenční časy. Často se liší pouze typem cukerné jednotky nebo se jedná o izomerní sloučeniny. Jejich fragmentační chování je však rozdílné, a proto mohly být rozlišeny na základě rozdílných MRM přechodů. Mezi nejčastěji detekovanými sloučeninami této skupiny byly deriváty kvercetinu (např. č. 16, 18, 20, 24, 25) a deriváty kaempferolu (např. č. 19 a 34). Jejich výskyt byl opět nejintenzivnější v červené quinoe, zatímco u bílé odrůdy byly tyto flavonoidy přítomné ve výrazně nižší koncentraci. Dále byly také identifikovány glykosidy isorhamnetinu (č. 21 a 37). Kromě výše uvedených flavonolů byly ve vzorcích rovněž detekovány prokyanidiny (č. 10 a 27), které patří mezi oligomery flavan-3-olů, jako je katechin a epikatechin. Tyto látky se vyskytují ve více formách a strukturních variantách, jejichž přesná identifikace však nebyla na základě dostupných dat možná.

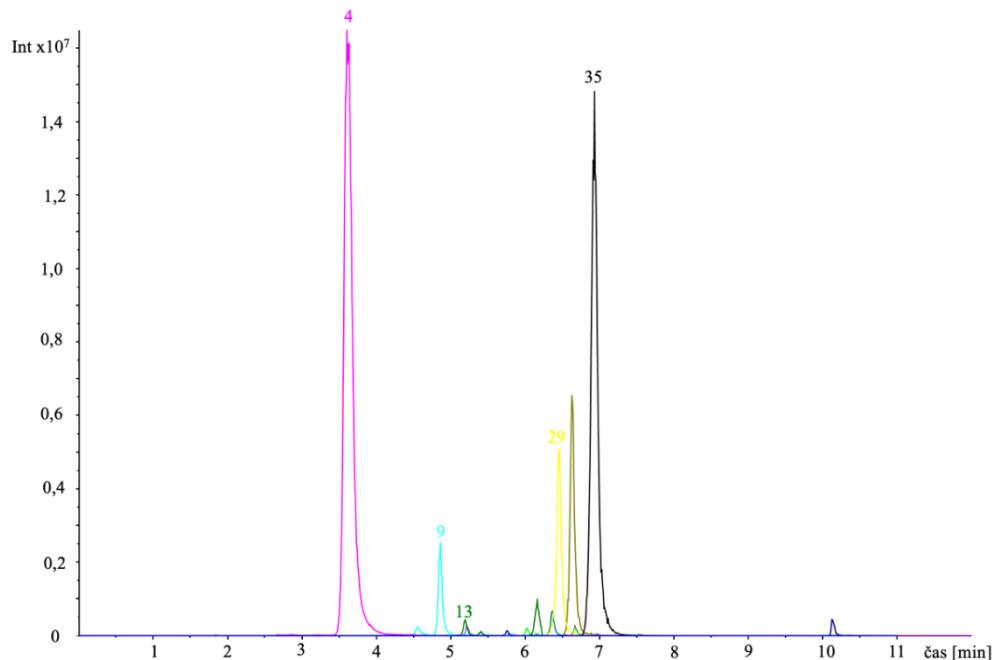


Obrázek 23: Separace volných fenolických látek ve vzorku červené quinoe.

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze ACN/voda + HCOOH (0,1 %), gradient: 0 min – 10% ACN, 0,1 min – 22% ACN, 5 min – 24% ACN, 5 min – 24% ACN, 7 min – 50% ACN, 8 min – 100% ACN, 10 min – 10% ACN, průtok: 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM.

Fenolické látky se v rostlinných matricích, včetně quinoy, běžně vyskytují ve vázané formě, buď jako estery navázané na buněčné struktury, nebo jako glykosidy. Aby bylo možné tyto látky uvolnit a analyzovat, byly vzorky podrobeny alkalické a kyselé hydrolyze. Každý typ hydrolyzy cílí na jiné chemické vazby a tím odhaluje odlišné zastoupení fenolických látek v rámci analyzovaného vzorku. Proto byla v rámci této práce provedena jak kyselá, tak alkalická hydrolyza a získané extrakty byly proměřeny optimalizovanou HPLC/MS/MS metodou. Výsledné chromatografické separace u vybraných vzorků červené, černé a bílé odrůdy jsou uvedeny na obrázku 24 a 25 a v příloze 3 – 6.

Z uvedených obrázků je patrné, že alkalická hydrolyza vedla k uvolnění širokého spektra fenolických látek napříč všemi třemi odrůdami quinoy (obrázek 24, příloha 3 – 4). Největší rozmanitost a nejvyšší intenzity detekovaných látek byly opět pozorovány u extraktu z červené quinoy (obrázek 24). Pro srovnání jsou chromatogramy bílé a černé odrůdy uvedeny v příloze 3 – 4. Nejintenzivnějším signálem v alkalických hydrolyzátech červené a černé quinoy byla kyselina DHB (č. 4), jejíž signál nebyl v bílé quinoe detekován (příloha 3). Dále byly pozorovány velmi intenzivní kyseliny *p*-HBA (č. 9), vanilová (č. 13), *p*-kumarová (č. 29) a ferulová (č. 35), přičemž všechny vykazovaly opět vyšší intenzitu v červené a černé odrůdě, zatímco u bílé byly jejich signály zpravidla nižší, nebo pod mezí detekce.



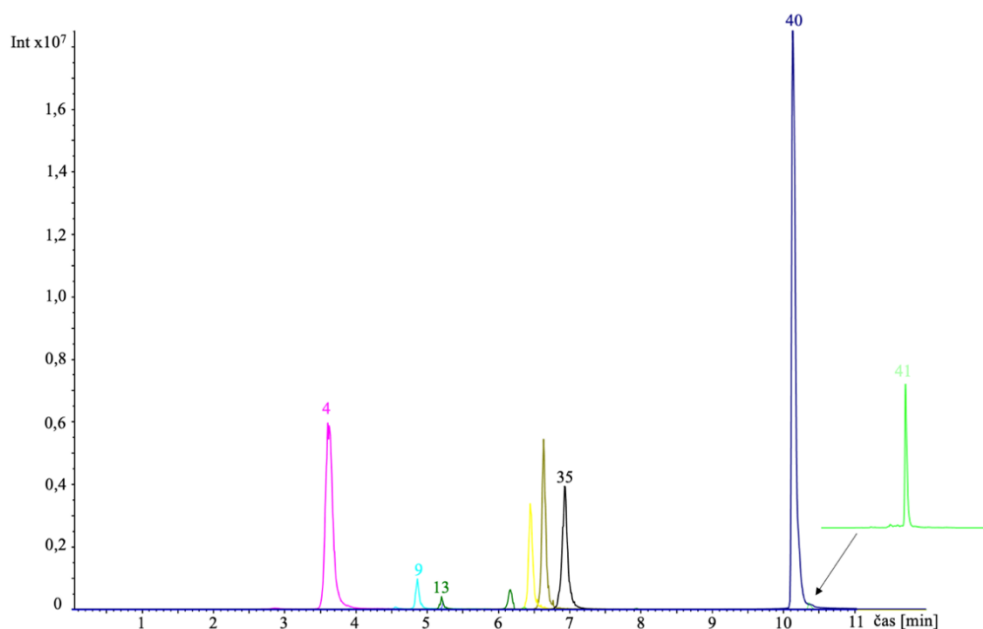
Obrázek 24: Separace látek po alkalické hydrolyze ve vzorku červené quinoy.

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze ACN/voda + HCOOH (0,1 %), gradient: 0 min – 10% ACN, 0,1 min – 22% ACN, 5 min – 24% ACN, 5 min – 24% ACN, 7 min – 50% ACN, 8 min – 100% ACN, 10 min – 10% ACN, průtok: 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM).

Profil fenolických sloučenin po kyselé hydrolyze (obrázek 25, příloha 5 – 6) se lišil od výsledků získaných po hydrolyze alkalické, což souvisí s tím, že při kyselé hydrolyze dochází především ke štěpení glykosidických vazeb. Nejvyšší intenzitu studovaných látek opět vykazovala červená quinoa (obrázek 25). Pro srovnání jsou chromatogramy bílé a černé odrůdy uvedeny v příloze 5 – 6. Nejčastěji byly pozorovány kyseliny DHB (č. 4), *p*-HBA (č. 9), vanilová (č. 13) a ferulová (č. 35), přičemž jejich signály byly opět nejvýraznější u červené a černé odrůdy. U bílé quinoxy byly intenzity těchto kyselin výrazně nižší (příloha 5).

Flavonoidní glykosidy byly po hydrolyze pod limitem detekce a kvantifikace, což souvisí s rozštěpením glykosidických vazeb. Oproti tomu se zvýšila koncentrace volných aglykonů, především kvercetin a kaempferol (č. 40 a 41). Jejich výskyt odpovídá flavonoidnímu profilu volných forem a potvrzuje, že quinoa obsahuje především deriváty kvercetin a kaempferolu.

Obdobná souvislost byla pozorována i u fenolických kyselin, např. *p*-HBA, vanilová a ferulová kyselina, které byly dříve identifikovány jako glykosidy, se po hydrolyze vyskytovaly ve volné formě. Tento vývoj je v souladu s literaturou [32, 36, 47, 69, 75, 78], která uvádí, že kyselá hydrolyza efektivně uvolňuje fenolické látky vázané glykosidicky, přičemž barevné odrůdy quinoxy vykazují obecně vyšší obsah těchto forem než odrůda bílá.



Obrázek 25: Separace látek po kyselé hydrolyze ve vzorku červené quinoxy.

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze ACN/voda + HCOOH (0,1 %), gradient: 0 min – 10% ACN, 0,1 min – 22% ACN, 5 min – 24% ACN, 5 min – 24% ACN, 7 min – 50% ACN, 8 min – 100% ACN, 10 min – 10% ACN, průtok: 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM).

Výsledky kvalitativní analýzy potvrzují, že alkalická a kyselá hydrolýza poskytují komplementární informace o složení fenolických kyselin vázaných na buněčné stěny. Alkalická hydrolýza účinně uvolňuje sloučeniny navázané esterovou vazbou, zatímco kyselá hydrolýza umožňuje štěpení éterových (např. glykosidických) vazeb. Největší rozdíly mezi odrůdami byly zaznamenány mezi bílou quinoou a barevnými odrůdami (červenou a černou), které celkově obsahovaly více fenolických sloučenin. Ze všech odrůd pak nejvyšší intenzity i počet detekovaných látek vykazovala červená quinoa.

3.5 Kvantifikace fenolických látek

Pro kvantitativní stanovení jednotlivých fenolických látek byly nejprve připraveny kalibrační roztoky o koncentracích v rozmezí 0,01 – 1,8 mg/l. Kalibrační roztoky byly proměřeny třikrát a získaná naměřená data byla následně vyhodnocena v programu QC Expert 2.9 (TriloByte, ČR), kde byly pomocí grafických diagnostik (McCulloh-Meterův, Williamsův, Pregibonův a L-R graf) identifikovány a odstraněny vlivné body, které mohly ovlivnit přesnost kalibračních modelů. Dále byla testována statistická významnost absolutního členu kalibrační závislosti na hladině významnosti $p = 0,05$. U většiny kalibračních křivek byl absolutní člen významný, s výjimkou závislosti u kyseliny *p*-kumarové, sinapové, syringové, vanilinu a epikatechinu, kde byl absolutní člen statisticky nevýznamný. Regresní parametry, včetně koeficientu determinace (R^2), jsou uvedeny v tabulce 8, kde jsou rovněž zahrnuty hodnoty limitů detekce (LOD) a limitů kvantifikace (LOQ). LOD byl stanoven jako trojnásobek poměru signálu k šumu, zatímco LOQ odpovídal desetinásobku tohoto poměru.

Tabulka 8: Regresní parametry kalibračních křivek, limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) pro vybrané referenční standardy fenolických látek.

LÁTKA	LOD [ug/l]	LOQ [ug/l]	Směrnice [$\cdot 10^3$]	Úsek [$\cdot 10^3$]	R^2
k. <i>p</i> -HBA	19,94	66,48	1800±10	250±10	0,9993
k. DHB	3,0	10,0	7400±20	100±20	0,9998
k. <i>p</i> -kumarová	13,58	45,27	3200±20	N	0,9993
k. ferulová	1,69	5,64	5640±20	110±20	0,9998
k. vanilová	12,27	40,9	448±2	6±2	0,9996
k. kávová	6,0	20,0	9010±90	-160±70	0,9984
k. sinapová	5,3	17,65	638±3	N	0,9996
k. syringová	4,5	15,0	936±9	N	0,9970
kvercetin	0,087	0,29	8360±80	1200±100	0,9992
rutin	0,21	0,7	5410±30	130±30	0,9994
vanilin	15,74	52,46	260±3	N	0,9977
epikatechin	12,35	41,18	700±4	N	0,9992
kaempferol	1,0	3,34	628±7	19±6	0,9976

V rámci validace metody byla na třech koncentračních úrovních (0,03; 0,5 a 1,5 mg/l) proměřena návratnost, přičemž na všech hladinách u všech sledovaných sloučenin byla výsledná koncentrace v akceptovatelném rozmezí 80 – 110 % dle metodiky AOAC International (Association of Official Analytical Collaboration) a potvrzuje správnost použité metody [82].

Kvantitativní analýza extraktů z jednotlivých vzorků quinoi byla provedena podle postupu popsaného v experimentální části (kapitola 2.5.1). Od každého ze šesti vzorků quinoi (V1–V6), které se lišily barevnou variantou, rokem nákupu i výrobcem (tabulka 5), byly připraveny dva nezávislé extrakty, které byly následně dvakrát proměřeny optimalizovanou HPLC/MS/MS metodou. Integrované plochy píků byly s využitím kalibračních závislostí přepočítány na koncentrace jednotlivých sledovaných látek. U látek, pro které byly dostupné komerční standardy byly využity odpovídající standardy, u látek, pro které standardy nejsou k dispozici, byly koncentrace vypočteny na základě strukturně podobných sloučenin, např. deriváty kvercetinu byly kvantifikovány s využitím standardu kvercetinu nebo rutinu. V případě, že koncentrace některých analytů přesáhla rozmezí kalibrační křivky, byly vzorky ředěny. Aby plocha intenzivních píků spadala do rozsahu použité kalibrace, bylo nutné extrakty volných fenolických látek ředit 100×, zatímco u extraktů po kyselé a alkalické hydrolýze bylo nutné ředění 10×.

Přehled koncentrací jednotlivých fenolických látek ve vzorcích quinoi po extrakci volných fenolických látek je uveden v tabulce 9. Koncentrace fenolických látek po kyselé a alkalické hydrolýze jsou uvedeny v příloze 7 – 8.

V extraktech volných fenolických látek dominovala skupina glykosidovaných fenolických kyselin, především glykosidy kyseliny kávové, 4-methoxybenzoové, vanilové, a dále deriváty flavonoidů, jako je kaempferol a kvercetin. Koncentrace těchto látek se pohybovaly přibližně mezi 0,15 – 3 mg/g. Nejvyšší obsah byl zaznamenán u bílé quinoi (V1, V4), následované červenou quinoou (V2, V5). Naopak u černé quinoi (V3, V6) byl obsah těchto látek nižší. U všech vzorků byla rovněž potvrzena dobrá opakovatelnost měření, kdy relativní směrodatná odchylka nepřesáhla 5 %.

Po alkalické hydrolýze již byly glykosidické formy fenolických látek přítomné pouze ve stopovém množství a převažovaly jednoduché fenolické kyseliny. Nejčastěji se vyskytovala kyselina ferulová, *p*-HBA, vanilová a *p*-kumarová, s koncentracemi v rozmezí přibližně 20 – 90 µg/g. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány u červené quinoi (V2, V5), následované vzorkem černé odrůdy (V3). U druhé černé odrůdy (V6) byla hodnota výrazně nižší, což může

souviset s rozdíly mezi výrobci, zejména pokud jde o původ odrůdy, způsob pěstování, sklizňové podmínky či zpracování suroviny.

V extraktech po kyselé hydrolýze byl profil odlišný. Nejvýraznějšími sloučeninami zde byly flavonoidní aglykony, zejména kvercetin a kaempferol, které byly detekovány napříč všemi barevnými odrůdami. Nejvyšší koncentrace těchto látek byly zaznamenány u červené quinoi, což potvrzuje, že tato odrůda nejen vykazuje nejširší spektrum fenolických sloučenin, ale také nejvyšší podíl flavonoidů uvolněných po kyselé hydrolýze. Tento výsledek potvrzuje, že kyselá hydrolýza je pro štěpení glykosidické vazby účinná a umožňuje detekci flavonoidů ve formě aglykonů.

Celkové výsledky kvantitativní analýzy potvrzují rozdíly mezi jednotlivými vzorky nejen v závislosti na typu extrakce, ale také v závislosti na barevné odrůdě a dodavateli. Nejvyšší celkové koncentrace volných fenolických látek byly zjištěny u bílé quinoi, zejména u vzorku značky Grizly (V4), zatímco červená quinoa (V2 a V5) vykazovala nejvyšší hodnoty po kyselé a alkalické hydrolýze. Přehledné souhrnné koncentrace pro všechny vzorky a typy extrakce jsou uvedeny v tabulce 10.

Naše výsledky jsou ve velké míře v souladu s literaturou [32, 36, 47, 75, 77, 78], kde je často prezentován vyšší celkový obsah fenolických látek u červené quinoi. Červená odrůda vykazovala nejvyšší zastoupení fenolických látek po hydrolýze i nejpestřejší spektrum napříč všemi typy extrakcí. Výjimku představují pouze volné fenolické látky, u nichž byly nejvyšší koncentrace fenolických látek zaznamenány u bílé quinoi. Tento výsledek je způsoben výrazně vyšším zastoupením dvou konkrétních látek, derivátu kaempferolu (č. 19), jehož koncentrace dosáhla u bílé quinoi 2688,94 $\mu\text{g/g}$ (V1) a 751,21 $\mu\text{g/g}$ u vzorku V4, zatímco u červené quinoi (V2 a V5) to bylo pouze 48,52 $\mu\text{g/g}$, či 167,20 $\mu\text{g/g}$. Významný rozdíl byl rovněž zaznamenán u glykosidu kyseliny vanilové (č. 3), který byl u vzorku V4 přítomen v koncentraci 1056,2 $\mu\text{g/g}$, zatímco u červené quinoi (V5) dosahoval pouze 314,18 $\mu\text{g/g}$. Tyto výrazné rozdíly v koncentracích ovlivnily celkový součet volných fenolických látek a jsou zřetelně patrné i v chromatografických záznamech (obrázek 23 a příloha 1 – 2). Rozdíly mezi vzorky mohou být kromě odrůdových vlastností a podmínkami pěstování ovlivněny i rokem sklizně.

Tabulka 9: Koncentrace jednotlivých fenolických látek ($\mu\text{g/g}$) ve vzorcích quinoy (V1–V6) po extrakci volných fenolických sloučenin.

Značení	Látka	V1	V2	V3	V4	V5	V6
1	glykosid k. kávové	26,24	1804,31	25,21	1319,14	1392,68	1203,08
2	glykosid k. 4-methoxybenzoové	3084,98	3275,41	2200,4	3608,88	3762,82	1910,62
3	glykosid k. vanilové	693,89	399,21	435,98	1056,2	314,18	494,08
4	k. 3,4- dihydroxybenzoová	0,31	19,38	28,80	0,21	47,74	5,85
5	derivát kvercetinu	0,33	0,39	0,37	0,35	0,41	0,40
6	glykosid k. ferulové	1,95	3,19	1,25	4,79	2,03	3,16
7	glykosid k. <i>p</i> -kumarové	2,84	2,25	0,76	1,64	1,90	1,6
8	glykosid k. ferulové	5,69	2,37	0,24	6,27	2,21	1,87
9	k. <i>p</i> -hydroxybenzoová	34,06	16,86	24,14	24,76	29,96	20,85
10	prokyanidin	<LOD	12,03	3,19	<LOD	10,21	0,65
11	glykosid rutinu	0,34	0,43	0,35	0,38	0,54	0,44
12	epikatechin	<LOD	5,02	0,94	<LOD	4,53	<LOQ
13	k. vanilová	40,56	14,47	24,63	33,45	28,29	15,49
14	k. kávová	0,52	1,29	0,94	<LOQ	<LOQ	<LOQ
15	k. syringová	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
16	kvercetin-3-O-rutinosid-rhamnosid	79,24	91,1	79,24	121,67	89,28	100,67
17	orientin	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
18	kvercetin-3-O-rutinosid-pentóza	66,18	55,05	94,78	96,61	63,81	68,93
19	derivát kaempferolu	2688,94	48,52	711,29	751,21	167,2	340,26
20	glykosid kvercetinu	0,67	15,74	0,52	0,65	14,87	9,06
21	isorhamnetin-rutinosid-rhamnosid	1,91	8,50	32,69	2,89	10,01	4,34
22	rutin	22,59	78,77	18,47	9,74	66,61	33,62
23	glykosid kvercetinu	0,63	1,26	0,61	1,17	1,44	0,68
24	glykosid kvercetinu	52	184,5	59,05	69,51	194,68	112,31
25	kvercetin-O-pentosid-hexóza	54,8	71,15	56,3	69,44	71,91	60,93
26	vanilin	0,67	<LOD	<LOQ	<LOQ	3,4	3,91
27	prokyanidin	<LOD	5,00	1,47	<LOD	3,48	0,33
28	diosmetin-7-O-rutinosid	9,44	5,81	0,39	0,72	0,10	28,83
29	k. <i>p</i> -kumarová	24,26	66,44	27,24	9,52	129,37	17,82
30	glykosid isorhamnetinu	0,66	2,21	0,42	0,66	2,91	1,24
31	derivát kvercetinu	4,49	65,08	2,36	8,11	71,91	19,05
32	isoquercitrin	0,64	0,71	0,59	1,20	0,67	0,54
33	derivát kvercetinu	0,85	1,08	1,03	1,14	1,61	1,04
34	derivát kaempferolu	184,55	129,36	16,4	29,38	153,11	100,97
35	k. ferulová	11,24	9,86	8,46	18,19	15,73	20,83
36	k. sinapová	0,22	0,35	<LOQ	0,99	0,60	0,56
37	isorhamnetin-3-O-rutinosid	1,25	1,54	0,07	0,63	0,48	0,76
38	glykosid kvercetinu	0,40	2,53	0,47	0,42	2,5	0,82
39	kaempferol-3,7-dirhamnosid	6,34	4,32	1,65	2,65	4,18	3,57
40	kvercetin	0,85	1,05	1,36	0,50	2,67	0,74
41	kaempferol	0,65	<LOD	<LOD	<LOQ	0,34	<LOQ

Tabulka 10: Souhrnný obsah fenolických látek ($\mu\text{g/g}$) ve vzorcích quinoy.

Σ [$\mu\text{g/g}$]	V1	V2	V3	V4	V5	V6
volné fenolické látky	7105,19	6406,54	3862,06	7253,07	6670,37	4589,9
alkalická hydrolýza	192,39	316,77	243,88	188,65	266,75	162,47
kyselá hydrolýza	131,01	180,77	127,51	86,83	185	100,53

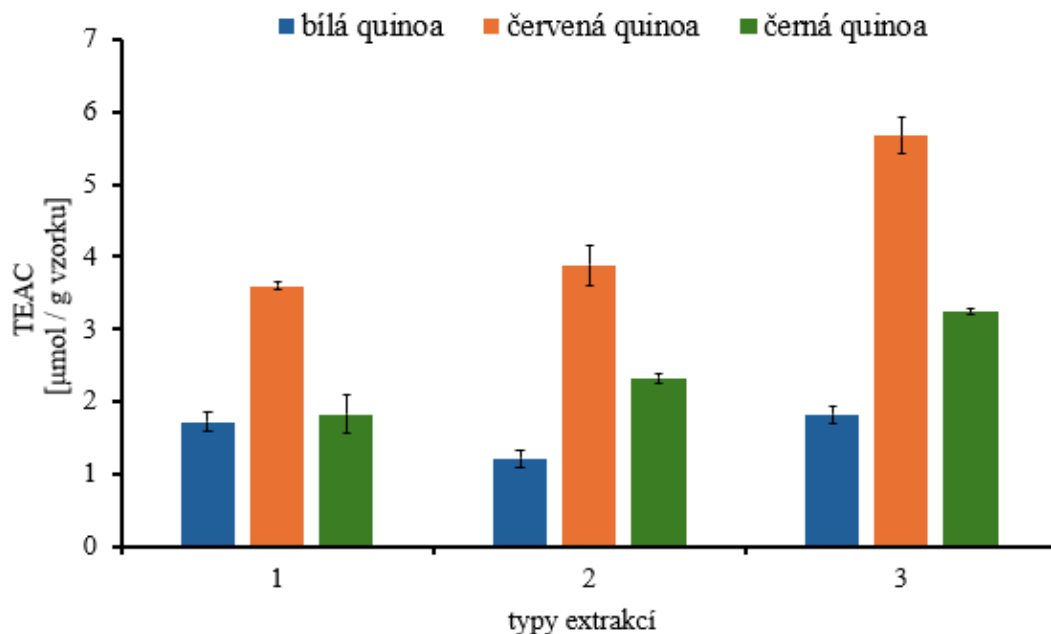
3.6 Stanovení antioxidační kapacity

Pro stanovení antioxidační kapacity ve vzorcích quinoy byla zvolena metoda ABTS, jejíž podmínky byly optimalizovány již v rámci mé bakalářské práce [81]. Během této optimalizace byly porovnány metody ABTS, DPPH a FRAP. Metoda ABTS vykazovala nejvyšší hodnoty antioxidační kapacity, a proto byla vybrána pro sledování antioxidační kapacity připravených extraktů v rámci této diplomové práce.

Z celkem šesti původně připravených vzorků quinoy byly pro následné testování antioxidační kapacity vybrány tři vzorky pocházející od značky Grizly – bílá, červená a černá quinoa (tabulka 5). Výběr byl proveden na základě výsledků kvantitativní analýzy HPLC/MS/MS, při níž tyto vzorky vykazovaly vyšší obsah fenolických látek ve srovnání s ostatními analyzovanými variantami. U těchto tří vzorků byla sledována antioxidační kapacita extraktů volných i vázaných fenolických látek po alkalické a kyselá hydrolýze.

Extrakty byly připraveny podle postupu uvedeného v experimentální části (kapitola 2.5.1). U každého typu extraktu bylo provedeno pět opakovaných měření, jejichž výsledky byly vyjádřeny jako μmol Troloxu na 1 g hmotnosti vzorku (TEAC).

Výsledky měření antioxidační kapacity byly zpracovány a graficky znázorněny ve formě sloupcového grafu (obrázek 26), který ukazuje rozdíly mezi jednotlivými typy quinoy a různými způsoby extrakce fenolických látek. Číselné hodnoty TEAC včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v příloze 9.



Obrázek 26: Antioxidační kapacita jednotlivých extraktů měřená metodou ABTS. 1 – volné fenolické látky, 2 – kyselá hydrolýza, 3 – alkalická hydrolýza

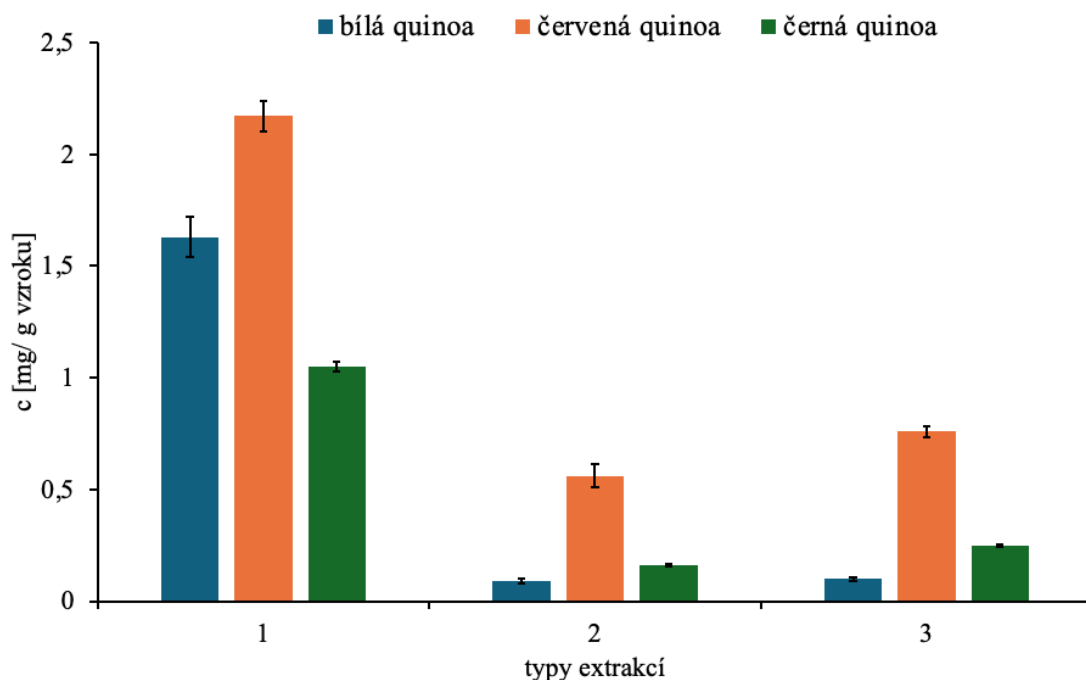
Z obrázku 26 vyplývá, že nejvyšší antioxidační kapacitu vykazuje červená quinoa, a to ve všech typech extraktů. Hodnoty se v jejím případě pohybovaly od 3,59 $\mu\text{mol/g}$ u volných fenolických látek až po 5,67 $\mu\text{mol/g}$ po alkalické hydrolýze. Černá quinoa dosáhla hodnot 1,82 – 3,24 $\mu\text{mol/g}$, zatímco bílá quinoa vykazovala nejnižší hodnoty TEAC 1,21 – 1,82 $\mu\text{mol/g}$. U všech vzorků byl pozorován nárůst antioxidační kapacity po hydrolýze, přičemž účinnější se ukázala být hydrolýza alkalická. Tento nárůst antioxidační kapacity je způsoben uvolněním fenolických látek, které jsou v rostlinné matici často vázány esterovými, glykosidickými nebo jinými kovalentními vazbami na polysacharidové složky buněčné stěny. K rozštěpení těchto vazeb a následnému uvolnění sloučenin dochází právě působením kyselá nebo alkalické hydrolýzy. Výrazně vyšší antioxidační kapacita červené quinoxy může souviset nejen s vyšším obsahem vázaných fenolických látek, ale také s přítomností přírodních pigmentů, zejména betacyaninů, které mají silné antioxidační účinky. Tyto látky však nebyly mezi sledovanými sloučeninami v HPLC/MS/MS analýze, a proto se jejich přínos v kvantitativním hodnocení neprojevil. Naproti tomu bílá quinoa, která výrazné pigmenty neobsahuje, měla nižší antioxidační kapacitu v testu ABTS, ale vykazovala nejvyšší koncentrace sledovaných fenolických látek, především kvůli derivátu kaempferolu (č. 19) a glykosidu kyseliny vanilové (č. 3). To ukazuje, že metoda ABTS zachycuje širší spektrum antioxidantů přítomných ve vzorku a může tak lépe odrážet celkovou antioxidační kapacitu vzorku. Tyto výsledky zároveň potvrzují význam hydrolýz pro hodnocení

celkové antioxidační kapacity rostlinných matric a zdůrazňují roli odrůdové variability v obsahu bioaktivních sloučenin.

3.7 Stanovení celkového množství fenolických látek

Ke stanovení celkového obsahu fenolických látek byla použita metoda optimalizovaná v rámci mé předchozí bakalářské práce [81].

Stanovení bylo provedeno u stejných vzorků jako měření antioxidační kapacity (různé barevné varianty značky Grizly, extrakty volných i vázaných fenolických látek). Postup přípravy extraktů odpovídá metodice uvedené v kapitole 2.5.1. U každého vzorku bylo provedeno pět paralelních měření a výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalenty kyseliny gallové (mg GAE/g sušiny). Naměřené hodnoty byly zpracovány a graficky znázorněny ve formě sloupcového grafu (obrázek 27), který ukazuje rozdíly v celkovém obsahu fenolických látek mezi jednotlivými typy extraktů. Průměrné číselné hodnoty včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v tabulce v příloze 10.



Obrázek 27: Stanovení celkového množství fenolických látek.
1 – volné fenolické látky, 2 – kyselá hydrolyza, 3 – alkalická hydrolyza

Na obrázku 27 jsou znázorněny výsledky stanovení celkového množství fenolických látek ve vzorcích bílé, červené a černé quinoy po třech typech extrakce. Nejvyšší koncentrace byly zjištěny u červené quinoy, a to napříč všemi typy extrakce. Bílá quinoa vykazovala nejvyšší hodnoty pouze ve volné frakci, zatímco černá quinoa měla celkově nejnižší obsah fenolických látek.

Dále je z grafu patrné, že nejvyšší obsah fenolických látek byl stanoven u volných forem oproti, přičemž po provedení hydrolýzy koncentrace klesly. Z vázaných fenolických látek se vyšší množství uvolnilo po alkalické hydrolýze, což naznačuje, že jsou v rostlinné matrici vázány převážně formou esterů.

Výsledky jednotlivých metod ukazují, že hodnocení fenolických látek závisí na jejich chemické povaze i principu použité metody. Metoda Folin-Ciocalteu, která stanovuje celkové množství fenolických látek bez ohledu na jejich strukturu či biologickou aktivitu, ukázala nejvyšší obsah ve volných formách u červené quinoy. Naopak metoda ABTS, zaměřená na antioxidační účinnost, vykazovala nejvyšší hodnoty až po alkalické hydrolýze. Pravděpodobným důvodem je, že volné extrakty obsahují převážně glykosidy s nižší antioxidační kapacitou, zatímco po hydrolýze se uvolňují antioxidačně účinnější aglykony.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovit a porovnat obsah volných a vázaných fenolických látek v různých vzorcích merlíku čilského (quinoa) a zhodnotit jejich antioxidační kapacitu. V první části byla optimalizována HPLC/MS/MS metoda pro analýzu vybraných fenolických sloučenin. Nejlepších separačních výsledků bylo dosaženo použitím kolony Kinetex Polar C18 a gradientové eluce s acetonitrem a vodou okyselenou kyselinou mravenčí (0,1 %, v/v).

Identifikace fenolických látek byla provedena pomocí HPLC/MS analýzy při snímání kladných i záporných iontů a s využitím následné tandemové hmotnostní spektrometrie pro získání strukturních informací. Pro identifikované látky byly optimalizovány parametry MRM přechodů, aby byla při kvantifikaci dosažena co nejvyšší citlivost, selektivita a přesnost.

Kvalitativní analýza ukázala, že quinoa obsahuje široké spektrum fenolických kyselin a flavonoidů, které se liší v závislosti na barvě odrůdy i typu extrakce. U volných fenolických látek dominovaly glykosidy flavonoidů a fenolických kyselin. Po provedení alkalické hydrolýzy došlo k uvolnění jednoduchých fenolických kyselin jako kyselina ferulová, *p*-HBA, vanilová a *p*-kumarová. Kyselá hydrolýza naopak vedla k uvolnění flavonoidních aglykonů, především kvercetinů a kaempferolu. Napříč všemi typy extrakcí vykazovala červená quinoa nejpestřejší profil fenolických látek, jak z hlediska počtu identifikovaných sloučenin, tak i intenzity jejich signálů.

Kvantitativní stanovení ukázalo, že nejvyšší koncentrace volných fenolických látek byly zaznamenány u bílé quinoj, zejména u vzorku značky Grizly (V4). Tento výsledek byl ovlivněn výrazným zastoupením dvou konkrétních sloučenin derivátu kaempferolu a glykosidu kyseliny vanilové. Naopak červená quinoa vykazovala vyšší obsah po obou typech hydrolýzy, což poukazuje na větší zastoupení vázaných forem a potvrzuje její celkově bohatší fenolický profil.

V závěru této práce byla rovněž provedena spektrofotometrická analýza celkového obsahu fenolických látek a antioxidační kapacity. Obě metody potvrdily rozdíly mezi jednotlivými odrůdami i typy extrakce. Nejvyšší antioxidační kapacitu i obsah fenolických látek vykazovaly extrakty červené quinoj. Rozdíl oproti výsledkům z HPLC/MS/MS, kde byly u volných forem nejvyšší hodnoty zaznamenány u bílé quinoj, souvisí se zaměřením HPLC/MS/MS metody pouze na limitovaný počet fenolických látek. U spektrofotometrických metod se oproti tomu hodnotil celkový obsah fenolických látek obsažených ve vzorku, které reagují s Folin-Ciocalteuovým činidlem a celková antioxidační kapacita vzorku, tedy souhrnný účinek všech přítomných antioxidantů.

POUŽITÁ LITERATURA

1. JANCUROVÁ, Michala; MINAROVÍČOVÁ, Lucia a DANDÁR, Alexander. Quinoa – a Review. Online. *Czech J. Food Sci.* 2009, article Vol. 27, s. 71-79. Dostupné z: <https://cjfs.agriculturejournals.cz/pdfs/cjf/2009/02/01.pdf>. [cit. 2024-12-27].
2. NANDAN, Alisha; KOIRALA, Pankaj; TRIPATHI, Abhishek Dutt; VIKRANTA, Urvashi; SHAH, Kartik et al. Nutritional and functional perspectives of pseudocereals. Online. *Food Chemistry*. 2024, article Volume 448, s. 139072. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139072>. [cit. 2024-12-27].
3. ALVAREZ-JUBETE, L., E. K. ARENDT a E. GALLAGHER. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. Online. *Trends in Food Science & Technology*. 2010, 21(2), 106-113, ISSN 0924-2244. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.014>. [cit. 2024-12-27].
4. 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 afekte by sprouting and baking. *Food Chemistry*. 2010, 119(2), 770-778, ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.032>. [cit. 2024-12-27].
5. Bender, D., & Schönlechner, R. Recent developments and knowledge in pseudocereals including technological aspects. *Acta Alimentaria*. 2021, 50(4), 583-609. <https://doi.org/10.1556/066.2021.00136>. [cit. 2024-12-27].
6. *IStock by Getty Images*. Online. In: . Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs>. [cit. 2024-12-29].
7. YAMANI, Beatriz Valcárcel a LANNES, 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. Online. *Scientific & Academic Publishing*. 2012, 2 (6), 265-275. ISSN 2162-9412. Dostupné z: <https://doi: 10.5923/j.fph.20120206.12>. [cit. 2024-12-29].
8. ZHU, Nanqun Zhu; KIKUZAKI, Hiroe; VASTANO, Bret C.; NAKATANI, Nobuji; V. KARWE, Mukund et al. Ecdysteroids of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49 (5), 2576-2578. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jf0014462>. [cit. 2024-12-29].
9. HUSSAIN, M.I.; FAROOQ, M.; SYED, Q.A.; ISHAQ, A.; AL-GHAMDI, A.A.; HATAMLEH, A.A. Botany, Nutritional Value, Phytochemical Composition and Biological Activities of Quinoa. *Plants*. 2021, 10 (11), 2258. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/plants10112258>. [cit. 2024-12-29].
10. PATHAN, S.; NDUNGURU, G.; AYELE, A.G. Comparison of the Nutritional Composition of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Inflorescences, Green Leaves, and Grains. *Crops*. 2024, 4 (1), 72-81. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/crops4010006>. [cit. 2024-12-29].
11. PATHAN, S.; SIDDIQUI, R.A. Nutritional Composition and Bioactive Components in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Greens: A Review. *Nutrients*. 2022, 14 (3), 558. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu14030558>. [cit. 2024-12-29].
12. *Quinoa závod zblízka* [online]. In: [cit. 2024-12-29]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs/fotografie/quinoa-závod-zbl%C3%ADzka-gm1337268140-418221553>
13. XI, X.; FAN, G.; XUE, H.; PENG, S.; HUANG, W.; ZHAN, J. Harnessing the Potential of Quinoa: Nutritional Profiling, Bioactive Components, and Implications for Health Promotion. *Antioxidants*. 2024, 13 (7), 829. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/antiox13070829>. [cit. 2025-01-03].

14. ESCRIBANO, Josefa; CABANES, Juana; ATIÉNZAR, Mercedes J.; TREMOLADA, Martha I.; RAYDA, Luz Rayda et al. Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. Online. *Food Chemistry*. 2017, 234, 285-294. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.187>. [cit. 2025-01-03].
15. Červená, černá a bílá quinoa semena [online]. In: [cit. 2024-12-29]. Dostupné z: <https://www.istockphoto.com/cs/fotografie/červená-černá-a-b%C3%ADlá-quinoa-semena-gm478769254-67573673?phrase=quinoa%20seed>
16. CHEN, Xuan; ZHANG, Yueyue; CAO, Beier; WEI, Xiaonan; RAYDA, Luz Rayda et al. Assessment and comparison of nutritional qualities of thirty quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seed varieties. Online. *Food Chemistry: X*. 2023, 19, 100808. ISSN 2590-1575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100808>. [cit. 2025-01-05].
17. EL HAZZAM, K.; HAFSA, J.; SOBEH, M.; MHADA, M.; TAOURIRTE, M.; EL KACIMI, K.; YASRI, A. An Insight into Saponins from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd): A Review. *Molecules*. 2020, 25 (5), 1059. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25051059>. [cit. 2025-01-05].
18. KILINC, Ozgur Kivilcim; OZGEN, Senay a SELAMOGLU, Zeliha. Bioactivity of Triterpene Saponins from Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.). Online. *Research Journal of Biology*. 2016, 4 (4), 25-27. Dostupné z: <https://www.rroij.com/open-access/bioactivity-of-triterpene-saponins-from-quinoa-chenopodium-quinoa-willd-.pdf>. [cit. 2025-01-08].
19. *Schematic structure of the saponin molecules extracted from the quinoa husk*. Online. In: . 2020. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-structure-of-the-saponin-molecules-extracted-from-the-quinoa-husk-All-the_fig2_340557692. [cit. 2025-01-10].
20. INMACULADA, Martín; GUILLERMO, Moncada; FISCHER, Susana a ESCUREDO, Olga. Chemical characteristics and mineral composition of quinoa by near-infrared spectroscopy. Online. *Journal of The Science of Food and Agriculture*. 2014, 94 (5). Dostupné z: [DOI:10.1002/jsfa.6325](https://doi.org/10.1002/jsfa.6325). [cit. 2025-01-10].
21. De Bock, P.; Daelemans, L.; Selis, L.; Raes, K.; Vermeir, P.; Eeckhout, M.; Van Bockstaele, F. Comparison of the Chemical and Technological Characteristics of Wholemeal Flours Obtained from Amaranth (*Amaranthus* sp.), Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Buckwheat (*Fagopyrum* sp.) Seeds. *Foods*. 2021, 10 (3), 651. <https://doi.org/10.3390/foods10030651>. [cit. 2025-01-10].
22. GAWLIK-DZIKI, Urszula; DZIKI, Dariusz; BARANIAK, Barbara a LIN, Rufa. The effect of simulated digestion in vitro on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition. Online. *LWT – Food Science and Technology*. 2009, 42 (1), 137-143. ISSN 0023-6438. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.06.009>. [cit. 2025-01-15].
23. BHARGAVA, Atul; SHUKLA, Sudhir a OHRI, Deepak. *Chenopodium quinoa*—An Indian perspective. Online. *Industrial Crops and Products*. 2006, 23 (1), 73-87. ISSN 0926-6690. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.04.002>. [cit. 2025-01-15].
24. GAWLIK-DZIKI, Urszula; ŚWIECA, Michał; SUŁKOWSKI, Maciej; DZIKI, Dariusz; BARANIAK, Barbara et al. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts – In vitro study. Online. *Food and Chemical Toxicology*. 2013, 57, 154-160. ISSN 0278-6915. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.023>. [cit. 2025-01-15].

25. CAO, B.; BAO, C.; ZHU, Z.; GONG, Y.; WEI, J.; SHEN, Z.; SU, N. Comparative Evaluation of Chemical Composition and Nutritional Characteristics in Various Quinoa Sprout Varieties: The Superiority of 24 – Hour Germination. Online. *Foods*. 2024, 13 (16), 2513. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods13162513>. [cit. 2025-01-15].
26. LE, Liqing; GONG, Xuxiao; AN, Qi; XIANG, Dabing; ZOU, Liang et al. Quinoa sprouts as potential vegetable source: Nutrient composition and functional contents of different quinoa sprout varieties. Online. *Food Chemistry*. 2021, 357, 129752. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129752>. [cit. 2025-01-15].
27. NOWAK, Verena; DU, Juan a CHARRONDIÈRE, Qi U. Ruth. Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Online. *Food Chemistry*. 2016, 193, 47-54. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.111>. [cit. 2025-01-15].
28. LOURENCO, Sofia C.; MOLDAO-MARTINS, Margarida.; ALVES, Vítor D. Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules*. 2019, 24 (22), 4132. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules24224132>. [cit. 2025-01-17].
29. LOBO, V; PATIL, A a CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Online. *Pharmacognosy Review*. 2010, 4 (8), 118–126. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>. [cit. 2025-01-17].
30. MARTEMUCCI, Giovanni; COSTAGLIOLA, Ciro; MARIANO, Michele; D'ANDREA, Luca; NAPOLITANO, Pasquale et al. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. Online. *Oxygen*. 2022, 2 (2), 48-78. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>. [cit. 2025-01-17].
31. OROIAN, Mircea a ESCRICHE, Isabel. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. Online. *Food Research International*. 2015, 74, 10-36. ISSN 0963-9969. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>. [cit. 2025-01-17].
32. PANDYA, Archis; THIELE, Björn; KÖPPCHEN, Stephan; ZURITA-SILVA, Andres; USADEL, Björn et al. Characterization of Bioactive Phenolic Compounds in Seeds of Chilean Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Germplasm. Online. *Agronomy*. 2023, 13 (8), 2170. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/agronomy13082170>. [cit. 2025-01-19].
33. MELINI, Francesca a MELINI, Valentina. Impact of Fermentation on Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Quinoa. Online. *Fermentation*. 2021, 7 (1), 20. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/fermentation7010020>. [cit. 2025-01-19].
34. MURPHY, Kevin S. a MATANGUIHAN, Janet. *Quinoa: Improvement and Sustainable Production*. Online. Ilustrované vydání. John Wiley, 2015. ISBN 1118628055, 9781118628058. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=KwmeCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&ots=MGLg_OFqz7&sig=2iDIlxVibpL2tTFONEtU09inEKk&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false. [cit. 2025-01-19].
35. ZHANG, Ling; DANG, Bin; LAN, Yongli; ZHENG, Wancai; KUANG, Jiwei et al. Metabolomics Characterization of Phenolic Compounds in Colored Quinoa and Their Relationship with In Vitro Antioxidant and Hypoglycemic Activities. Online. *Molecules*. 2024, 29 (7), 1509. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules29071509>. [cit. 2025-01-20].

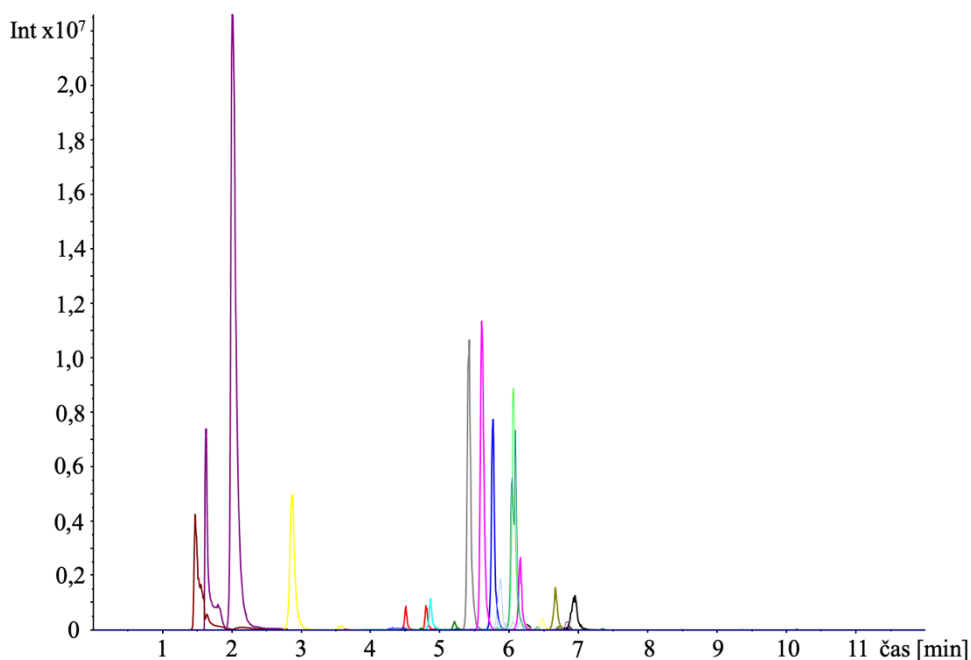
36. TANG, Yao; LI, Xihong; ZHANG, Bing; CHEN, Peter X.; LIU, Ronghua et al. Characterisation of phenolics, betanins and antioxidant activities in seeds of three *Chenopodium quinoa* Willd. genotypes. Online. *Food Chemistry*. 2015, 166, 380-388. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.018>. [cit. 2025-01-20].
37. ALU'DATT, Muhammad H.; RABABAH, Taha; ALHAMAD, Mohammad N.; AL-MAHASNEH, Majdi A.; ALMAJWAL, Ali et al. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. Online. *Food Chemistry*. 2017, 218, 99-106. ISSN 0308-8146. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.057>. [cit. 2025-01-20].
38. DŽAFIĆ, Amela Džafić a ŽULJEVIĆ, Sanja Oručević Žuljević. The Importance of Buckwheat as a Pseudocereal: Content and Stability of Its Main Bioactive Components. Online. *IntechOpen*. 2022, 1-27. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.5772/intechopen.102570>. [cit. 2025-01-20].
39. *Basic structure of flavonoids*. [online]. In: [cit. 2025-01-22]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Basic-structure-of-flavonoids_fig1_51174448
40. PAUCAR-MENACHO, Luz María; CASTILLO-MARTÍNEZ, Williams Esteward; SIMPALO-LOPEZ, Wilson Daniel; RUIZ, Anggie Verona; CRUZ, Alicia Lavado et al. Performance of Thermoplastic Extrusion, Germination, Fermentation, and Hydrolysis Techniques on Phenolic Compounds in Cereals and Pseudocereals. Online. *Foods*. 2022, 11 (13), 1957. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods11131957>. [cit. 2025-01-22].
41. GORINSTEIN, Shela, VARGAS, Oscar J. Medina, O. JARAMILLO, Nicolas et al. The total polyphenols and the antioxidant potentials of some selected cereals and pseudocereals. Online. *European Food Research and Technology*. 2007, 225 (2-4), 321-328, Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/226531923_The_total_polyphenols_and_the_antioxidant_potentials_of_some_selected_cereals_and_pseudocereals
42. MUNTEANU, Irina Georgiana Munteanu a APETREI, Constantin. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. Online. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22 (7), 3380. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms22073380>. [cit. 2025-01-22].
43. MUÑOZ-PABON, Karen Sofia; ROA-ACOSTA, Diego Fernando; HOYOS-CONCHA, José Luis; BRAVO-GÓMEZ, Jesús Eduardo a ORTIZ-GÓMEZ, Vicente. Quinoa Snack Production at an Industrial Level: Effect of Extrusion and Baking on Digestibility, Bioactive, Rheological, and Physical Properties. Online. *Foods*. 2022, 11 (21), 3383. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods11213383>. [cit. 2025-01-22].
44. GREENSKY BIOLOGICAL TECH. *Balancing the Scale: Advantages and Limitations of the FRAP Assay in Antioxidant Studies*. Online. 2024. Dostupné z: <https://www.plantextractwholesale.com/blog2/balancing-the-scale-advantages-and-limitations-of-the-frap-assay-in-antioxidant-studies.html>. [cit. 2025-01-22].
45. STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. Online. *Journal of separation science*. 2007, 30 (18), 3268-3295. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>. [cit. 2025-01-22]
46. DAI, Jin a MUMPER, Russell J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. Online. *Molecules*. 2010, 15 (10), 7313-7352. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules15107313>. [cit. 2025-01-22].

47. TANG, Yao, LI, Xihong, ZHANG, Bing, CHEN, Peter X., LIU, Ronghua, TSAO, Rong. Bound Phenolics of Quinoa Seeds Released by Acid, Alkaline, and Enzymatic Treatments and Their Antioxidant and α -Glucosidase and Pancreatic Lipase Inhibitory Effects, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, 64 (8), 1712-1719, Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05761>. [cit. 2025-01-22].
48. NARDINI, M., CIRILLO, E., NATELLA, F., MENCARELLI, D. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. Online. *Food Chemistry*. 2002, 79 (1), 119-124. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00213-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00213-3). [cit. 2025-01-22].
49. 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. Online. *Food Chemistry*. 2009, 113 (1), 336-344. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.064>. [cit. 2025-01-22].
50. ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 2004. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
51. GHARAATI JAHROMI, Shadab. Extraction Techniques of Phenolic Compounds from Plants. Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds. Online. *IntechOpen*. 2019, 2019-9-4. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.5772/intechopen.84705>. [cit. 2025-01-22].
52. LUQUE DE CASTRO, M.D. a PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. Online. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217 (16), 2383-2389. ISSN 0021-9673. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>. [cit. 2025-01-22].
53. Soxhlet extractor. In: Chemistry glossary [online]. b.r. Dostupné z: https://www.periodni.com/gallery/soxhlet_extractor.png. [cit. 2025-01-22].
54. FRAGUELA-MEISSIMILLY, Horacio Fraguela-Meissimilly; BASTÍAS-MONTE, José Miguel; VERGARA, Claudia; ORTIZ-VIEDMA, Jaime; LEMUS-MONDACA, Roberto et al. New Trends in Supercritical Fluid Technology and Pressurized Liquids for the Extraction and Recovery of Bioactive Compounds from Agro-Industrial and Marine Food Waste. Online. *Molecules*. 2023, 28 (11), 4421. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules28114421>. [cit. 2025-01-22].
55. PEREZ-VAZQUEZ, Ana; BARCIELA, Paula; CARPENA, Maria; DONN, Pauline; SEYYEDI-MANSOUR, Sepidar et al. Supercritical Fluid Extraction as a Potential Extraction Technique for the Food Industry †. Online. *Engineering Proceedings*. 2023, 37 (1), 115. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ECP2023-14674>. [cit. 2025-01-24].
56. EXTRAKCE silic kminu pomocí superkritické fluidní extrakce (SFE) [online]. Brno: Mendelova univerzita v Brně. Dostupné z: [https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/23/23-extrakce_silic_kminu_pomoci_superkriticke_fluidni_extrakce_\(sfe\).pdf](https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty/files/23/23-extrakce_silic_kminu_pomoci_superkriticke_fluidni_extrakce_(sfe).pdf). [cit. 2025-01-24].
57. NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. 1. vydání. Praha: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
58. ČESLA, Petr. Přednášky ze Separčních analytických metod. 2024.
59. LABORATORYINFO. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications*. Online. 2022. Dostupné z: https://laboratoryinfo.com/hplc/?utm_content=cmp-true. [cit. 2025-01-24].
60. HOLČAPEK, Michal. Hmotnostní spektrometrie [online]. Mass spektrometry group, Univerzita Pardubice. 2024 [cit. 2025-01-24].

61. HOLČAPEK, Michal, ed. Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). B.m.: Univerzita Pardubice, 2001. ISBN 80-7194-390-8.
62. FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, 20(41), 152–157.
63. CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0010-0.
64. Electrospray Ionization (ESI) Mass Spectrometry. In: *LibreTexts Physics* [online]. 2022. Dostupné z: [https://phys.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/Biophysics_241%3A_Membrane_Biology/06%3A_Experimental_Characterization_-_Mass_Spectrometry_and_Atomic_Force_Microscopy/6.03%3A_Electrospray_Ionization_\(ESI\)_Mass_Spectrometry](https://phys.libretexts.org/Courses/University_of_California_Davis/Biophysics_241%3A_Membrane_Biology/06%3A_Experimental_Characterization_-_Mass_Spectrometry_and_Atomic_Force_Microscopy/6.03%3A_Electrospray_Ionization_(ESI)_Mass_Spectrometry). [cit. 2025-01-26].
65. KIONTKE, Andreas; BIRKMEIER, Ariana Oliveira; OPITZ, Andreas a BIRKEMEYER, Claudia. Electrospray Ionization Efficiency Is Dependent on Different Molecular Descriptors with Respect to Solvent pH and Instrumental Configuration. Online. *PLOS.One*. 2016. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167502>. [cit. 2025-01-26].
66. ROVELLI, Grazia; JACOBS, Michael I.; WILLIS, Megan D.; RAPF, Rebecca J.; PROPHET, Alexander M. et al. A critical analysis of electrospray techniques for the determination of accelerated rates and mechanisms of chemical reactions in droplets. Online. *Chemical Science*. 2020, 48 (11), 13026-13043. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/D0SC04611F>. [cit. 2025-01-26].
67. KOCAK, Erman. *A schematic diagram of ESI and a q-TOF mass spectrometer*. Online. In: ResearchGate. 2019. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/A-schematic-diagram-of-ESI-and-a-q-TOF-mass-spectrometer-A-Ion-formation-in_fig2_360259876. [cit. 2025-01-26].
68. BUITRAGO, Dayana; BUITRAGO-VILLANUEVA, Ivon; BARBOSA-CORNELIO, Ricardo a COY-BARRERA, Ericsson. Comparative Examination of Antioxidant Capacity and Fingerprinting of Unfractionated Extracts from Different Plant Parts of Quinoa (*Chenopodium quinoa*) Grown under Greenhouse Conditions. Online. *Antioxidants*. 2019, 8 (8), 238. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antiox8080238>. [cit. 2025-01-26].
69. GÓMEZ-CARAVACA, Ana María; SEGURA-CARRETERO, Antonio; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Alberto a FIORENZA CABONI, Maria. Simultaneous Determination of Phenolic Compounds and Saponins in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) by a Liquid Chromatography–Diode Array Detection–Electrospray Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry Methodology. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59 (20), 10815-10825. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf202224j>. [cit. 2025-01-26].
70. VADAKEDATH, Sabitha; KANDI, Venkataramana; GODISHALA, Vikram; PINNELLI, Venkata Bharat Kumar; ALKAFAS, Samar Sami et al. The Principle, Types, and Applications of Mass Spectrometry: A Comprehensive Review. Online. *Biomedicine and Biotechnology*. 2022, 7 (1), 6-22. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.12691/bb-7-1-2>. [cit. 2025-01-30].
71. AGARWAL, Princy a GOYAL, Anju. A REVIEW ON ANALYZERS FOR MASS SPECTROMETRY. Online. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2017, 8 (4), 140-152. ISSN 0975-6299. Dostupné z: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.22376/ijpbs.2017.8.4.p140-152>. [cit. 2025-01-30].

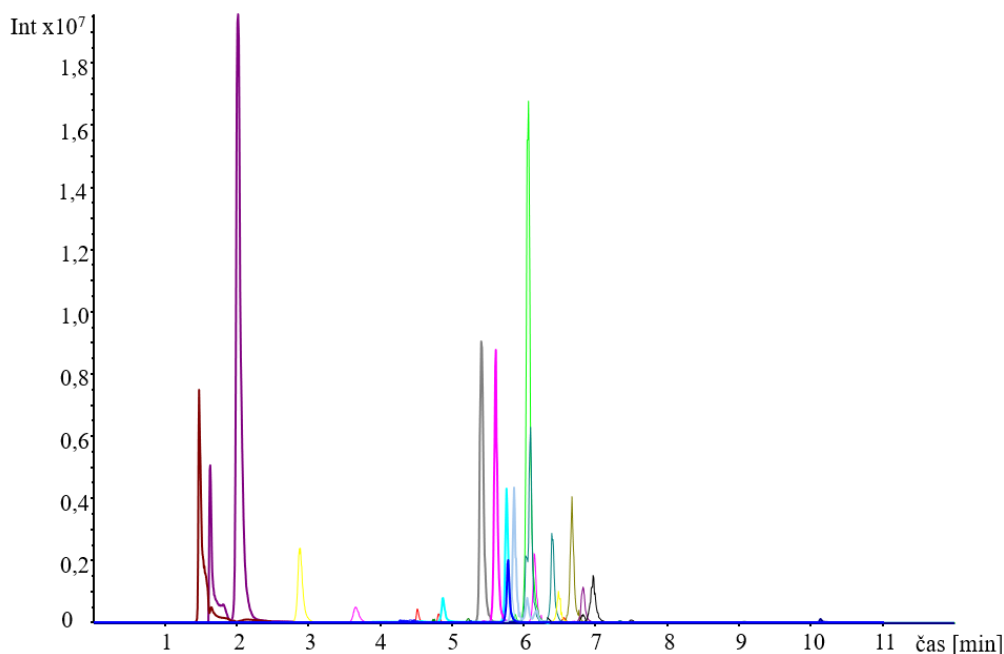
72. SADÍLEK, Martin. Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chemické Listy*. 2020, (114), 133–144.
73. HAYSTEAD, Timothy A J. *MS/MS. Conventional and MS/MS modes of analysis in a triple-quadrupole mass spectrometer are shown*. Online. In: RESEARCHGATE. 2002. Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/MS-MS-Conventional-and-MS-MS-modes-of-analysis-in-a-triple-quadrupole-mass-spectrometer_fig5_11487776. [cit. 2025-01-31].
74. 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.
75. QIAN, Guangtao; LI, Xiangyu; ZHANG, Heng; ZHANG, Hailong; ZHOU, Jingwen et al. Metabolomics analysis reveals the accumulation patterns of flavonoids and phenolic acids in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) grains of different colors. Online. *Food Chemistry: X*. 2023, 17, 100594. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100594>. [cit. 2025-01-31].
76. ÖLSCHLÄGER, Carolin; REGOS, Ionela; ZELLER, Friedrich J. a TREUTTER, Dieter. Identification of galloylated propylchalcones and procyanidins in buckwheat grain and quantification of rutin and flavanols from homostylous hybrids originating from *F. esculentum* × *F. homotropicum*. Online. *Phytochemistry*. 2008, 69 (6), 1389-1397. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.01.001>. [cit. 2025-01-31].
77. VERARDO, Vito; ARRÁEZ-ROMÁN, David; SEGURA-CARRETERO, Antonio; MARCONI, Emanuele; GUTIÉRREZ, Alberto Fernández et al. Identification of buckwheat phenolic compounds by reverse phase high performance liquid chromatography–electrospray ionization–time of flight–mass spectrometry (RP-HPLC–ESI-TOF-MS). Online. *Journal of Cereal Science*. 2010, 52 (2), 170-176. ISSN 0733-5210. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.04.009>. [cit. 2025-01-31].
78. MARTÍN-GARCÍA, Beatriz; PASINI, Federica; VERARDO, Vito; GÓMEZ-CARAVACA, Ana María; MARCONI, Emanuele et al. Distribution of Free and Bound Phenolic Compounds in Buckwheat Milling Fractions. Online. *Foods*. 2019, 8 (12), 670. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods8120670>. [cit. 2025-01-31].
79. FERNANDES, Luana; CASAL, Susana; PEREIRA, José Alberto; SARAIVA, Jorge A. a RAMALHOSA, Elsa. Edible flowers: A review of the nutritional, antioxidant, antimicrobial properties and effects on human health. Online. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2017, č. 60, s. 38-50. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.017>. [cit. 2025-01-31].
80. MEDINA, Marjorie B. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59 (5), 1565-71. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf103711c>. [cit. 2025-01-31].
81. KROCOVÁ, Michaela. Stanovení biologicky aktivních látek obsažených v merlíku čilském. Pardubice, 2023. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce prof. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.
82. AOAC INTERNATIONAL. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In: *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. 2016. Rockville (MD): AOAC INTERNATIONAL. [cit. 2025-05-01].

PŘÍLOHY



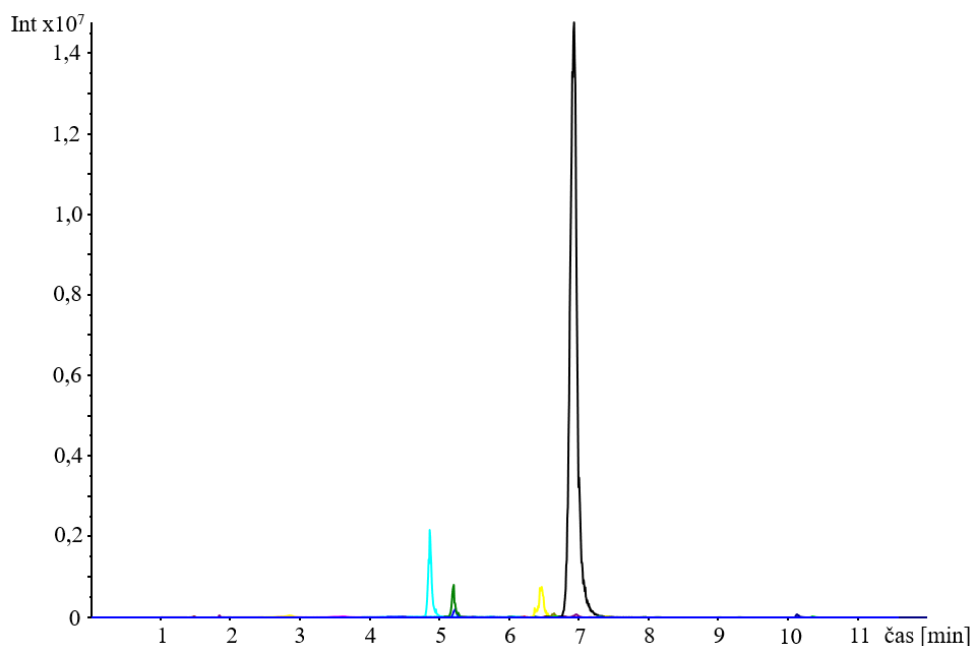
Příloha 1: Separace volných fenolických látek ve vzorku bílé quinoy (V4).

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze ACN/voda + HCOOH (0,1 %), gradient: 0 min – 10% ACN, 0,1 min – 22% ACN, 5 min – 24% ACN, 5 min – 24% ACN, 7 min – 50% ACN, 8 min – 100% ACN, 10 min – 10% ACN, průtok: 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM.



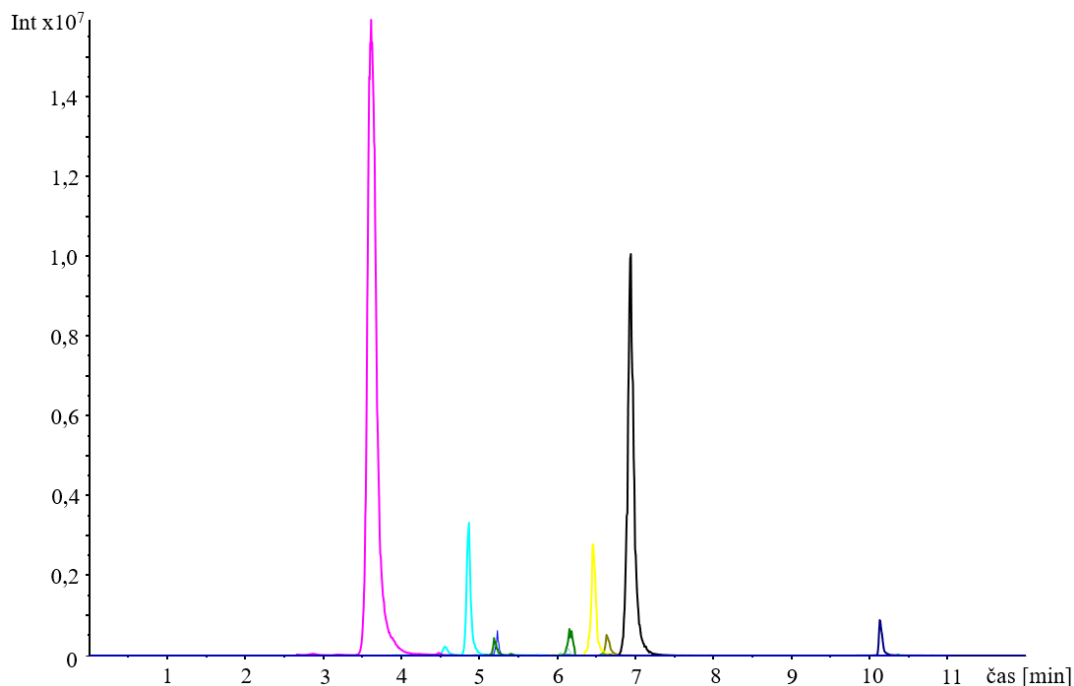
Příloha 2: Separace volných fenolických látek ve vzorku černé quinoy (V6).

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze ACN/voda + HCOOH (0,1 %), gradient: 0 min – 10% ACN, 0,1 min – 22% ACN, 5 min – 24% ACN, 5 min – 24% ACN, 7 min – 50% ACN, 8 min – 100% ACN, 10 min – 10% ACN, průtok: 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM).



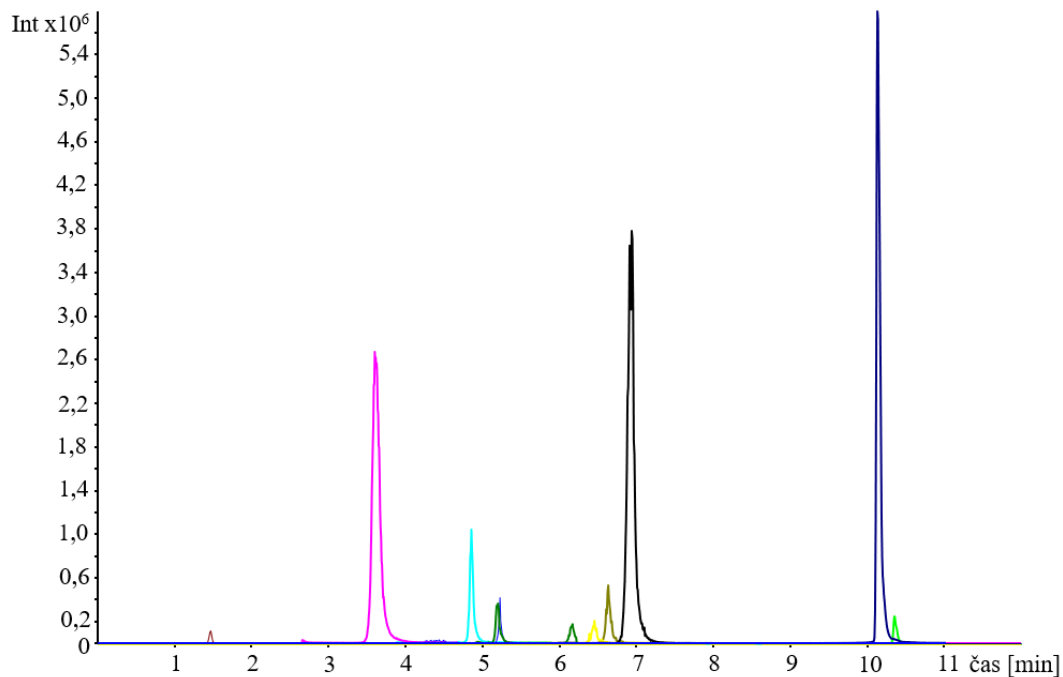
Příloha 3: Separace látek po alkalické hydrolyze ve vzorku bílé quinoy (V4).

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze ACN/voda + HCOOH (0,1 %), gradient: 0 min – 10% ACN, 0,1 min – 22% ACN, 5 min – 24% ACN, 5 min – 24% ACN, 7 min – 50% ACN, 8 min – 100% ACN, 10 min – 10% ACN, průtok: 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM).



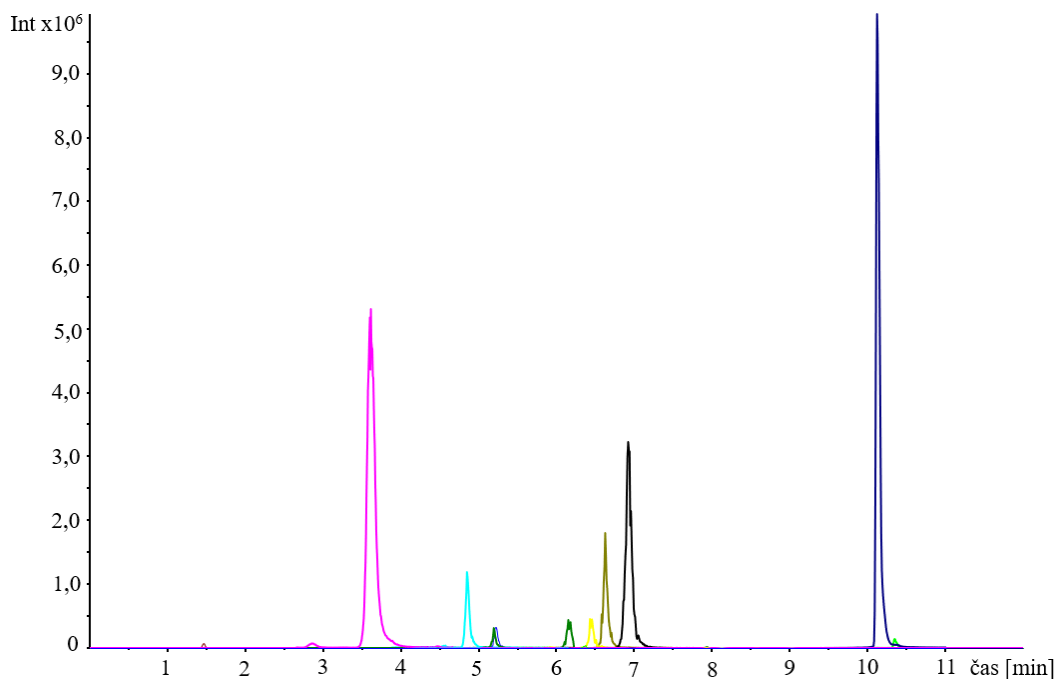
Příloha 4: Separace látek po alkalické hydrolyze ve vzorku černé quinoy (V6).

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze ACN/voda + HCOOH (0,1 %), gradient: 0 min – 10% ACN, 0,1 min – 22% ACN, 5 min – 24% ACN, 5 min – 24% ACN, 7 min – 50% ACN, 8 min – 100% ACN, 10 min – 10% ACN, průtok: 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM).



Příloha 1: Separace látek po kyselé hydrolyze ve vzorku bílé quinoy (V4).

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze ACN/voda + HCOOH (0,1 %), gradient: 0 min – 10% ACN, 0,1 min – 22% ACN, 5 min – 24% ACN, 5 min – 24% ACN, 7 min – 50% ACN, 8 min – 100% ACN, 10 min – 10% ACN, průtok: 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM).



Příloha 2: Separace látek po kyselé hydrolyze ve vzorku černé quinoy (V6).

Kolona Kinetex Polar C18 (150 × 3 mm, 2,6 μm), mobilní fáze ACN/voda + HCOOH (0,1 %), gradient: 0 min – 10% ACN, 0,1 min – 22% ACN, 5 min – 24% ACN, 5 min – 24% ACN, 7 min – 50% ACN, 8 min – 100% ACN, 10 min – 10% ACN, průtok: 0,4 ml/min, teplota kolony 30°C, dávkování: 2 μl, detekce: ESI/SIM).

Příloha 3: Množství jednotlivých fenolických látek ($\mu\text{g/g}$) ve vzorcích quinoy po alkalické hydrolyze.

Značení	Látka	Čas [min]	V1	V2	V3	V4	V5	V6
1	glykosid k. kávové	1,47	0,12	0,11	0,11	<LOQ	<LOQ	<LOQ
2	glykosid k. 4-methoxybenzoové	1,80	0,11	0,13	0,07	0,12	0,07	0,07
3	glykosid k. vanilové	2,88	7,4	5,68	2,13	3,36	3,46	2,43
4	k. 3,4- dihydroxybenzoová	3,66	<LOQ	112,67	96,08	<LOQ	70,77	12,50
5	derivát kvercetinu	4,41	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
6	glykosid k. ferulové	4,50	0,06	0,05	0,01	0,04	0,03	0,03
7	glykosid k. <i>p</i> -kumarové	4,55	0,05	0,05	<LOQ	0,01	0,02	<LOQ
8	glykosid k. ferulové	4,80	0,07	0,04	0,01	0,04	0,02	0,01
9	k. <i>p</i> -hydroxybenzoová	4,88	31,43	25,21	32,41	19,51	29,51	26,72
10	prokyanidin	4,93	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
11	glykosid rutinu	5,04	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
12	epikatechin	5,15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
13	k. vanilová	5,21	44,29	17,58	14,62	27,83	17,08	13,25
14	k. kávová	5,25	<LOQ	0,56	0,91	0,44	0,47	0,72
15	k. syringová	5,36	0,34	<LOQ	<LOQ	0,41	0,33	<LOQ
16	kvercetin-3-O-rutinosid-rhamnosid	5,37	<LOQ	0,11	0,11	<LOQ	0,11	<LOQ
17	orientin	5,52	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
18	kvercetin-3-O-rutinosid-pentóza	5,59	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
19	derivát kaempferolu	5,73	1,84	<LOQ	0,25	0,33	0,05	0,07
20	glykosid kvercetinu	5,76	<LOD	0,29	<LOD	<LOD	0,21	<LOQ
21	isorhamnetin-rutinosid-rhamnosid	5,79	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD
22	rutin	5,89	0,07	0,58	0,54	0,10	0,31	0,04
23	glykosid kvercetinu	5,99	0,13	0,49	0,23	0,14	0,33	0,12
24	glykosid kvercetinu	6,03	0,11	0,39	0,25	0,12	0,27	0,13
25	kvercetin-O-pentosid-hexóza	6,06	<LOD	0,11	0,12	<LOQ	0,11	<LOD
26	vanilin	6,25	2,02	<LOQ	<LOQ	0,93	<LOQ	<LOQ
27	prokyanidin	6,34	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
28	diosmetin-7-O-rutinosid	6,37	0,46	2,12	0,02	0,05	1,36	0,85
29	k. <i>p</i> -kumarová	6,49	31,43	25,21	32,41	19,51	29,51	26,72
30	glykosid isorhamnetinu	6,52	0,11	0,14	<LOD	<LOQ	0,12	0,11
31	derivát kvercetinu	6,65	0,24	13,45	1,07	0,3	10,88	0,58
32	isoquercitrin	6,68	0,14	0,53	0,28	0,15	0,36	0,13
33	derivát kvercetinu	6,71	<LOD	0,11	0,11	<LOD	0,11	<LOD
34	derivát kaempferolu	6,80	2,61	0,83	0,28	0,47	0,71	0,98
35	k. ferulová	6,98	64,04	106,52	58,8	111,67	96,71	75,16
36	k. sinapová	6,98	0,74	1,96	0,54	2,21	1,92	0,77
37	isorhamnetin-3-O-rutinosid	7,33	0,04	0,06	<LOD	<LOQ	0,04	0,02
38	glykosid kvercetinu	9,05	<LOQ	0,11	0,11	<LOQ	0,11	0,11
39	kaempferol-3,7-dirhamnosid	9,30	0,34	0,22	0,05	0,13	0,12	0,09
40	kvercetin	10,13	0,19	0,75	1,61	0,20	0,79	0,2
41	kaempferol	10,35	4,01	0,71	0,75	0,58	0,86	0,66

Příloha 4: Množství jednotlivých fenolických látek ($\mu\text{g/g}$) ve vzorcích quinoy po kyselé hydrolyze.

Značení	Látka	Čas [min]	V1	V2	V3	V4	V5	V6
1	glykosid k. kávové	1,47	0,69	0,38	0,34	0,19	0,16	0,10
2	glykosid k. 4-methoxybenzoové	1,80	2,84	1,64	0,49	0,01	0,01	0,01
3	glykosid k. vanilové	2,88	0,51	0,06	<LOQ	0,01	0,03	0,01
4	k. 3,4- dihydroxybenzoová	3,66	4,8	37,62	45,42	10,73	28,71	24,97
5	derivát kvercetinu	4,41	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
6	glykosid k. ferulové	4,50	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
7	glykosid k. <i>p</i> -kumarové	4,55	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
8	glykosid k. ferulové	4,80	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
9	k. <i>p</i> -hydroxybenzoová	4,88	17,22	9,17	13,16	9,58	10,32	11,16
10	prokyanidin	4,93	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
11	glykosid rutinu	5,04	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
12	epikatechin	5,15	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
13	k. vanilová	5,21	19,02	16,63	13,01	17,60	16,93	10,48
14	k. kávová	5,25	0,35	0,48	1,11	0,60	0,37	0,8
15	k. syringová	5,36	0,21	0,27	0,12	0,28	0,31	0,17
16	kvercetin-3-O-rutinosid-rhamnosid	5,37	0,15	0,12	0,11	<LOD	<LOD	<LOD
17	orientin	5,52	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
18	kvercetin-3-O-rutinosid-pentóza	5,59	<LOD	0,11	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
19	derivát kaempferolu	5,73	0,37	0,04	0,06	<LOD	<LOD	<LOD
20	glykosid kvercetinu	5,76	<LOD	0,11	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD
21	isorhamnetin-rutinosid-rhamnosid	5,79	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
22	rutin	5,89	0,02	0,04	0,01	0,01	0,03	0,01
23	glykosid kvercetinu	5,99	0,12	0,21	0,12	0,12	0,25	0,16
24	glykosid kvercetinu	6,03	0,13	0,17	0,12	<LOD	<LOD	<LOD
25	kvercetin-O-pentosid-hexóza	6,06	0,13	0,12	0,11	<LOD	<LOD	<LOD
26	vanilin	6,25	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
27	prokyanidin	6,34	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
28	diosmetin-7-O-rutinosid	6,37	<LOQ	0,02	<LOQ	<LOD	0,01	<LOQ
29	k. <i>p</i> -kumarová	6,49	3,29	9,75	3,91	1,48	21,65	2,61
30	glykosid isorhamnetinu	6,52	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
31	derivát kvercetinu	6,65	0,75	6,88	0,43	1,24	7,87	2,93
32	isoquercitrin	6,68	0,12	0,21	0,12	0,12	0,25	0,16
33	derivát kvercetinu	6,71	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
34	derivát kaempferolu	6,80	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
35	k. ferulová	6,98	14,85	22,69	12,71	22,93	19,29	15,92
36	k. sinapová	6,98	0,24	0,61	0,13	0,41	0,62	0,31
37	isorhamnetin-3-O-rutinosid	7,33	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD	0,01	<LOQ
38	glykosid kvercetinu	9,05	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
39	kaempferol-3,7-dirhamnosid	9,30	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
40	kvercetin	10,13	40,55	70,42	31,31	14,77	73,57	27,44
41	kaempferol	10,35	24,65	3,02	4,72	6,75	4,61	3,29

Příloha 5: Průměrné hodnoty TEAC u metody ABTS.

Typ extrakce	Odrůda	TEAC ± SD (μmol/g)
Volné fenolické látky	Bílá quinoa	1,72 ± 0,133
Kyselá hydrolýza	Bílá quinoa	1,21 ± 0,109
Alkalická hydrolýza	Bílá quinoa	1,82 ± 0,119
Volné fenolické látky	Červená quinoa	3,59 ± 0,050
Kyselá hydrolýza	Červená quinoa	3,89 ± 0,278
Alkalická hydrolýza	Červená quinoa	5,67 ± 0,247
Volné fenolické látky	Černá quinoa	1,82 ± 0,264
Kyselá hydrolýza	Černá quinoa	2,32 ± 0,072
Alkalická hydrolýza	Černá quinoa	3,24 ± 0,035

Příloha 6: Průměrné hodnoty GAE u stanovení celkového množství fenolických látek.

Typ extrakce	Odrůda	Hodnota ± SD (mg GAE/g)
Volné fenolické látky	Bílá quinoa	1,63 ± 0,092
Kyselá hydrolýza	Bílá quinoa	0,09 ± 0,010
Alkalická hydrolýza	Bílá quinoa	0,10 ± 0,009
Volné fenolické látky	Červená quinoa	2,17 ± 0,069
Kyselá hydrolýza	Červená quinoa	0,56 ± 0,052
Alkalická hydrolýza	Červená quinoa	0,76 ± 0,024
Volné fenolické látky	Černá quinoa	1,05 ± 0,024
Kyselá hydrolýza	Černá quinoa	0,16 ± 0,007
Alkalická hydrolýza	Černá quinoa	0,25 ± 0,006