

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Katedra analytické chemie

DISERTAČNÍ PRÁCE

2024

Ing. Michal Kašpar

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Ing. Michal Kašpar

**Vývoj metod analýzy fenolických látek v rostlinných produktech pomocí
kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie**

Disertační práce

Pardubice 2024

Studijní program: **Analytická chemie**

Studijní obor: **Analytická chemie**

Autor: **Ing. Michal Kašpar**

Školitel: **doc. Ing. Petr Česla Ph.D.**

Rok obhajoby: 2024

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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 30. 7. 2024

Ing. Michal Kašpar

Rád bych tímto poděkoval všem, kteří mě podpořili a inspirovali při psaní této disertační práce. Největší díky patří mému vedoucímu, doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D., za jeho neocenitelné rady, trpělivost a odborné vedení. Jeho znalosti a zkušenosti byly pro mě nesmírně cenné a umožnily mi dosáhnout tohoto významného milníku.

Dále bych chtěl poděkovat svému konzultantovi doc. Ing. Tomáši Bajerovi, Ph.D., jehož podpora a konstruktivní kritika mě vedly k lepším výsledkům.

Neméně důležitá je pro mě podpora mé rodiny, bez níž by tato práce nebyla možná. Děkuji vám za vaše porozumění a trpělivost během celého mého studia a také za materiální pomoc. Vaše podpora mi dodávala sílu a motivaci pokračovat i v těch nejtěžších chvílích.

Všem vám patří mé upřímné a srdečné díky.

ANOTACE

Tato disertační práce pojednává o využití kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie v oblasti analýzy fenolických sloučenin. V první části práce bylo zjišťováno chování fenolických sloučenin na chromatografických kolonách v systémech obrácených fází. Ve druhé části práce byla optimalizována a validována HPLC-MS/MS metoda pro kvantitativní analýzu vybraných fenolických sloučenin. Tato metoda byla následně využita ve třetí a čtvrté části této práce, které se zabývali stanovením fenolických látek u různých typů octa a sledováním koncentračních změn v průběhu pražení kávových zrn.

KLÍČOVÁ SLOVA

Kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, fenolické sloučeniny, ocet, kávová zrna

TITLE

Development of methods for the analysis of phenolic substances in plant products using liquid chromatography and mass spectrometry

ANNOTATION

This doctoral thesis discusses the use of liquid chromatography and mass spectrometry in the analysis of phenolic compounds. In the first part of the work, the behavior of phenolic compounds on chromatographic columns in reversed-phase systems was investigated. In the second part of the doctoral thesis, the HPLC-MS/MS method for the quantitative analysis of selected phenolic compounds was optimized and validated. This method was subsequently used in the third and fourth parts of this doctoral thesis, which dealt with the determination of phenolic substances in different types of vinegar and the monitoring of concentration changes during the roasting of coffee beans.

KEYWORDS

Liquid chromatography, mass spectrometry, phenolic compounds, vinegar, coffee beans

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	11
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK	14
ÚVOD.....	18
CÍLE PRÁCE.....	19
1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE FENOLICKÝCH SLOUČENIN NA REVERZNÍCH FÁZÍCH.....	20
1.1 FENOLICKÉ SLOUČENINY	20
1.1.1 Klasifikace fenolických sloučenin	20
1.1.2 Biosyntéza fenolických sloučenin	23
1.1.3 Zdravotní benefity fenolických sloučenin	23
1.2 MODERNÍ TRENDY V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII	24
1.2.1 Miniaturizace v kapalinové chromatografii	25
1.2.2 Současné trendy ve vývoji stacionárních fází.....	26
1.2.3 Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie.....	27
1.2.4 Superkritická fluidní chromatografie.....	28
1.2.5 Charakterizace kolon pro separace fenolických sloučenin	28
1.3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	30
1.3.1 Kolony	31
1.3.2 Použité standardy	31
1.3.3 HPLC-DAD analýza	32
1.4 VÝSLEDKY A DISKUZE	32
1.4.1 Porovnání retenčních faktorů.....	32
1.4.2 Porovnání symetrie píků	33
1.4.3 Porovnání selektivity vybraných dvojic látek.....	34

1.4.4	Porovnání členů van Deemterovy rovnice	35
1.5	SHRNUTÍ	41
2	LC-MS/MS STANOVENÍ FENOLICKÝCH SLOUČENIN	42
2.1	SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	42
2.2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
2.2.1	Použité standardy	43
2.2.2	HPLC-MS/MS analýza	44
2.3	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
2.3.1	Optimalizace podmínek MS/MS detekce	45
2.3.2	Optimalizace podmínek HPLC separace	45
2.3.3	Validace HPLC-MS/MS metody	49
2.4	SHRNUTÍ	52
3	FENOLICKÝ PROFIL RŮZNÝCH TYPŮ OCTA	55
3.1	OCET	55
3.1.1	Základní způsoby výroby octa	56
3.1.2	Klasifikace octů	57
3.2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	62
3.2.1	Vzorky octů	62
3.2.2	HPLC-MS/MS analýza	63
3.3	VÝSLEDKY A DISKUZE	64
3.3.1	Octy lihové	66
3.3.2	Octy rýžové	67
3.3.3	Octy jablečné	68
3.3.4	Octy vinné bílé	69
3.3.5	Octy vinné červené	70
3.3.6	Octy balzamikové	72

3.4	SHRNUTÍ	73
4	ZMĚNY FENOLICKÉHO PROFILU V PRŮBĚHU PRAŽENÍ KÁVOVÝCH ZRN ...	74
4.1	KÁVA A KÁVOVÉ ZRNO	74
4.1.1	Produkce a spotřeba	75
4.1.2	Zpracování zelených kávových zrn	75
4.1.3	Pražení kávových zrn	76
4.1.4	Fenolické látky kávových zrn	77
4.2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	79
4.2.1	Vzorky kávových zrn	80
4.2.2	Úprava vzorků	80
4.2.3	HPLC-MS/MS stanovení ostatních fenolických sloučenin	80
4.2.4	HPLC-MS/MS stanovení chlorgenových kyselin	81
4.3	VÝSLEDKY A DISKUZE	81
4.3.1	Volba extrakčních podmínek	81
4.3.2	Úprava a revalidace HPLC-MS/MS metody	81
4.3.3	Změny v profilu fenolických látek v průběhu pražení kávových zrn	83
4.4	SHRNUTÍ	89
	ZÁVĚR	90
	ZDROJE	91
	PŘÍLOHY	101

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Strukturální vzorec fenylobenzopyranu.

Obrázek 2: Obecný strukturální vzorec hydroxybenzoové a hydroxyskořicové kyseliny.

Obrázek 3: Typy píkované symetrie.

Obrázek 4: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze pro syringaldehyd.

Obrázek 5: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze pro epikatechin.

Obrázek 6: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze pro propylbenzen.

Obrázek 7: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze pro propylbenzen na koloně ACE 3 C18-PFP.

Obrázek 8: Chromatogram analýzy 48 fenolických sloučenin za podmínek finálního gradientu 2 při záznamu pouze kvantifikačních MRM přechodů.

Obrázek 9: Obecné schéma výroby octa.

Obrázek 10: Schéma výroby tradičního balzamického octa z Modeny.

Obrázek 11: Vennův diagram shrnující počet charakteristických látek pro jednotlivé skupiny octů.

Obrázek 12: Výsledné chromatogramy analýz jednotlivých vzorků octa.

Obrázek 13: Chromatogramy analýz fenolických látek lihových octů.

Obrázek 14: Chromatogramy analýz fenolických látek rýžových octů.

Obrázek 15: Chromatogramy analýz fenolických látek jablečných octů.

Obrázek 16: Chromatogramy analýz fenolických látek vinných bílých octů.

Obrázek 17: Chromatogramy analýz fenolických látek vinných červených octů.

Obrázek 18: Chromatogramy analýz fenolických látek vinných červených octů.

Obrázek 19: Struktura kávového zrna.

Obrázek 20: Obecná křivka pražení kávových zrn.

Obrázek 21: Změny obsahu, resp. koncentrace kyseliny chlorgenové v průběhu pražení kávových zrn.

Obrázek 22: Změny obsahu, resp. koncentrace kyseliny neochlorogenové a kyseliny kryptochlorogenové v průběhu pražení kávových zrn.

Obrázek 23: Změny obsahu, resp. koncentrace kyseliny kávové a kyseliny ferulové v průběhu pražení kávových zrn.

Obrázek 24: Změny obsahu, resp. koncentrace kyseliny *p*-hydroxybenzoové a kyseliny protokatechové v průběhu pražení kávových zrn.

Obrázek 25: Změny obsahu, resp. koncentrace protokatechového aldehydu.

a *p*-hydroxybenzaldehydu v průběhu pražení kávových zrn.

Obrázek 26: Změny obsahu, resp. koncentrace 4-vinylfenolu a 4-ethylcatecholu v průběhu pražení kávových zrn.

Obrázek 27: Změny obsahu, resp. koncentrace pyrogallolu v průběhu pražení kávových zrn.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Klasifikace LC kolon z pohledu vnitřního průměru kolony.

Tabulka 2: Seznam testovaných kolon a jejich vnitřní průměry a velikosti částic.

Tabulka 3: Hodnoty retenčních faktorů vybraných fenolických sloučenin na různých kolonách v módu reverzních fází (n = 3).

Tabulka 4: Hodnoty symetrií píků vybraných fenolických sloučenin na různých kolonách v módu reverzních fází (n = 3).

Tabulka 5: Hodnoty selektivit pro vybrané dvojice fenolických látek na různých kolonách v módu reverzních fází (n = 3).

Tabulka 6: Hodnoty vířivé difúze (člen A) alkylbenzenů pro jednotlivé kolony. Kolony s povrchově porézními částicemi jsou zvýrazněny modře.

Tabulka 7: Hodnoty molekulární difúze (člen B) alkylbenzenů pro jednotlivé kolony. Kolony s povrchově porézními částicemi jsou zvýrazněny modře.

Tabulka 8: Hodnoty odporu proti převodu hmoty (člen C) alkylbenzenů pro jednotlivé kolony. Kolony s povrchově porézními částicemi jsou zvýrazněny modře.

Tabulka 9: Hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra (H) a dalších členů van Deemterovy rovnice přepočítané na konkrétní hodnotu průtoku 0,5 ml/min pro propylbenzen.

Tabulka 10: Rozlišení R vybraných kritických dvojic fenolických látek získané analýzami při třech různých profílech gradientové eluce (n = 3).

Tabulka 11: Výsledky validace metody HPLC-MS/MS pro stanovení 48 fenolických sloučenin.

Tabulka 12: Studie využívající techniku LC pro charakterizaci fenolického profilu různých typů octa.

Tabulka 13: Vybrané studie, využívající techniku LC pro charakterizaci změn fenolického profilu v průběhu pražení kávových zrn.

Tabulka 14: Porovnání návratnosti identifikovaných látek v kávových zrnech za využití metody externí a interní kalibrace a velikost matricových efektů.

SEZNAM ZKRATEK

LC-MS	spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie
LC	kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UHPLC	(ultra)vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV/Vis	detektor ultrafialovo-viditelné spektroskopie
RPLC	kapalinová chromatografie na reverzních fázích
IEC	iontově výměnná chromatografie
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
2DLC	dvoudimenzionální kapalinová chromatografie
SFC	superkritická fluidní chromatografie
RP	obrácené fáze
HPLC-DAD	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a detektoru diodového pole
DAD	detektor diodového pole
CA	Kalifornie
USA	Spojené státy americké
MO	Missouri
LC-MS/MS	Spojení kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie
Q	kvadrupólový analyzátor
IT	iontová past

TOF	analyzátor doby letu
ICR	iontová cyklotronová rezonance
Q-q-Q	tři za sebou seřazené kvadrupólové analyzátoři
Q-q-TOF	kombinace dvou kvadrupólových analyzátorů a jednoho analyzátoru doby letu
HPLC-MS/MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a tandemového hmotnostního spektrometru
GC	plynová chromatografie
AS	analytický standard
MA	Massachusetts
MRM	sledování mnoha reakcí
DP	deklastrační potenciál
CE	kolizní energie
CXP	výstupní potenciál kolizní cely
<i>QT</i>	kvantifikátor (MRM určený pro kvantitativní analýzu)
<i>QL</i>	kvalifikátor (MRM určený pro ověření správné identifikace)
QuEChERS	rychlá, jednoduchá, nízkonákladová, efektivní, robustní a bezpečná extrakce
SPE	extrakce pevnou fází
<i>RSD</i>	relativní směrodatná odchylka
<i>LOD</i>	limit detekce
<i>LOQ</i>	limit kvantifikace
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
AIVC	<i>angl.</i> The European Cider and Fruit Wine Association
PTFE	polytetrafluorethylen

L	lihový ocet
R	rýžový ocet
J	jablečný ocet
B	balzamikový ocet
VČ	vinný červený ocet
VB	vinný bílý ocet
T	tyrosol
<i>p</i> -HB	<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd
V	vanilin
HPLC-DAD-MS/MS	spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie, detektoru diodového pole a tandemového hmotnostního spektrometru
KP	kyselina protokatechová
K4-HB	kyselina 4-hydroxybezoová
3-CQA	kyselina chlorgenová
E	epikatechin
4-EK	4-ethylkatechol
KG	kyselina galová
KK	kyselina kávová
KV	kyselina vanilová
KS	kyselina syringová
EG	ethyl galát
K _p -C	kyselina <i>p</i> -kumarová
ICO	Mezinárodní kávová organizace
ČSÚ	Český statistický úřad
CGA	chlorgenové kyseliny

CQA	caffeoylchinové kyseliny
FQA	feruoylchinové kyseliny
<i>p</i> CoQA	<i>p</i> -coumaroylchinové kyseliny
diCQA	dicaffeoylchinové kyseliny
4-CQA	kyselina kryptochlorgenová
5-CQA	kyselina neochlorgenová

ÚVOD

Fenolické sloučeniny představují rozsáhlou skupinu sekundárních metabolitů, které se přirozeně vyskytují v rostlinných produktech. Tyto sloučeniny hrají klíčovou roli v obraně rostlin proti patogenům a škůdcům, přičemž mají také významný vliv na organoleptické vlastnosti potravin, jako jsou chuť, barva a aroma. V posledních desetiletích se zvýšil zájem o fenolické sloučeniny nejen kvůli jejich antioxidačním vlastnostem, ale také díky jejich potenciálnímu přínosu pro lidské zdraví, včetně protizánětlivých, antikarcinogenních a antimikrobiálních účinků.

Analýza fenolických sloučenin je nezbytná pro pochopení jejich biologických funkcí a pro hodnocení kvality a bezpečnosti potravinových produktů. Stanovení těchto látek v rostlinných matricích je však komplikované kvůli jejich chemické rozmanitosti a nízkým koncentracím. Mezi nejúčinnější metody pro jejich analýzu patří kapalinová chromatografie spojená s detekcí hmotnostní spektrometrie (LC-MS).

Kapalinová chromatografie (LC) je technika, která umožňuje oddělení jednotlivých složek směsi na základě jejich interakce s mobilní a stacionární fází. V kontextu analýzy fenolických sloučenin kapalinová chromatografie poskytuje vysokou selektivitu a účinnost při separaci jednotlivých fenolických složek z komplexních rostlinných extraktů. Nicméně samotná chromatografie není schopna jednoznačně identifikovat všechny analyty, což činí kombinaci s hmotnostní spektrometrií nezbytnou.

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika, která měří poměr hmotnosti k náboji iontů a umožňuje přesnou identifikaci a kvantifikaci sloučenin na základě jejich hmotnostních spekter. Spojení LC-MS představuje robustní a vysoce citlivou techniku, která umožňuje nejen rozdělení jednotlivých látek, ale také poskytuje informace o struktuře fenolických sloučenin v jednom analytickém kroku.

Cílem této disertační práce je optimalizace a aplikace metody LC-MS pro stanovení fenolických sloučenin v různých rostlinných produktech. Výsledky této práce přispějí k hlubšímu porozumění přítomnosti a role fenolických sloučenin v potravinách, stejně jako k vývoji spolehlivějších analytických postupů pro kontrolu kvality potravinářských produktů.

CÍLE PRÁCE

Cílem první části této práce bylo zhodnotit základní retenční charakteristiky vybraných fenolických sloučenin v chromatografickém systému s reverzními fázemi. Toto mělo sloužit k lepšímu pochopení chování fenolických látek v takovém systému a na základě dosažených výsledků měly být vybrány kolony, které by vykazovaly vysokou účinnost a přijatelné hodnoty ostatních retenčních charakteristik vybraných zástupců fenolických sloučenin.

Jedna z takových kolon byla následně využita ve druhé části této práce, jejímž cílem byl vývoj univerzální, rychlé a spolehlivé LC-MS/MS metody pro kvalitativní a kvantitativní stanovení fenolických sloučenin. Takovou metodu bylo potřeba optimalizovat pro dosažení co nejlepších výkonových charakteristik a následně validovat, aby byla ověřena její správnost, opakovatelnost a další běžně validované parametry v oblasti kapalinové chromatografie.

Univerzálnost metody měla být ověřena ve třetí a čtvrté části této práce, které se zabývali porovnáním fenolického profilu různých typů octa, resp. sledováním změn v množství fenolických látek během pražení kávových zrn. Zde bylo potřeba vybrat vhodnou úpravu vzorku a také zvolit správný přístup pro kvantifikaci fenolických sloučenin tak, aby byly minimalizovány matricové efekty.

Naplnění těchto cílů bylo mimo jiné umožněno díky hned dvěma grantovým projektům Grantové agentury České republiky 18-14893S a 22-09556S.

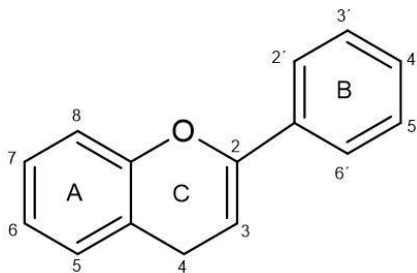
1 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE FENOLICKÝCH SLOUČENIN NA REVERZNÍCH FÁZÍCH

1.1 FENOLICKÉ SLOUČENINY

Látky obsahující ve své struktuře aromatické jádro s přímo navázanou alespoň jednou hydroxylovou skupinou jsou obecně označovány jako fenolické sloučeniny, přičemž v přírodě existuje více jak 8000 takových struktur [1]. V literatuře se lze často shledat s pojmem „polyfenolické sloučeniny“, který označuje látky, obsahující dvě a více hydroxylových skupin přímo navázané na aromatické jádro. V obou případech se jedná o sekundární rostlinné metabolity, které rostliny využívají převážně na ochranu před vnějšími vlivy [2][3]. Konzumací rostlinné stravy jsou pak přijímány zvířaty a lidmi, kterým přináší celou řadu zdravotních benefitů. Dietním příjmem produktů rostlinného původu jsou fenolické látky získávány ve třech základních formách, a to jako volné (například fenolické kyseliny a flavonoidy), konjugované (chemicky vázané k cukrům a dalším nízkomolekulárním látkám) nebo vázané ke strukturním prvkům buněčných stěn. Vázané fenolické látky mohou být z této vazby vysvobozeny, a to v průběhu trávení (pomocí mikroorganismů a enzymů) nebo v důsledku průmyslového zpracování potravin (tepelnou úpravou, fermentací nebo hydrolýzou) [4][5].

1.1.1 Klasifikace fenolických sloučenin

Fenolické sloučeniny lze dále dělit na základě jejich struktury, přičemž lze rozlišit dvě hlavní třídy – flavonoidy a ostatní fenoly (v angličtině flavonoids and nonflavonoids). Flavonoidy jsou dominantní skupinou fenolických látek v ovoci a zelenině a mohou tvořit až dvě třetiny dietního příjmu fenolů [2]. Základní strukturou flavonoidů je fenylobenzopyran (obrázek 1), kdy v závislosti na rozdílných substituentech u pyranového kruhu rozlišujeme další podtřídy – flavony, isoflavony, flavonoly, flavanoneny, flavan-3-oly a antokyanidiny.



Obrázek 1: Strukturální vzorec fenylobenzopyranu

Ostatní fenolické sloučeniny zahrnují především fenolické kyseliny a další podtřídy jako lignany, chalkony, stilbeny, furanokumariny, kurkuminoidy, kapsaicinoidy a v neposlední řadě těkavé fenoly [5][6].

1.1.1.1 Flavony

Flavony jsou jednou z největších podtříd flavonoidů, do které patří více než 2500 látek, včetně glykosidů [6]. V porovnání s dalšími flavonoidy mají jednu z nejjednodušších struktur obsahující ketoskupinu vázanou na uhlík C4. Mezi nejznámější zástupce flavonů patří apigenin a luteolin [2]. Přírodními zdroji flavonů jsou některé byliny (např. *Hypericum perforatum* L., *Scutellaria barbata* D. Don.) [7], ovoce a zelenina (např. vodní melouny a papriky) [2].

1.1.1.2 Isoflavony

Isoflavony mají podobnou strukturu jako flavony, avšak benzenový kruh B má opačnou pozici vzhledem ke kyslíku pyranového kruhu [5]. Isoflavony jsou označovány za fytoestrogeny, jelikož vykazují mírnou estrogenní aktivitu [2]. Hlavním zdrojem isoflavonů je sója (a sójové produkty), která obsahuje vyšší množství genisteinu a daidzeinu [7].

1.1.1.3 Flavonoly

Flavonoly strukturně vycházejí z flavonů, avšak na uhlíku C3 mají navázanou hydroxylovou skupinu, díky které jsou flavonoly považovány za jedny z nejlepších antioxidantů. Kemferol, kvercetin a myricetin patří mezi nejznámější zástupce. Přírodními zdroji je široká škála bylin, ovoce a zeleniny, jelikož se jedná o jednu z nejrozšířenějších podtříd flavonoidů [2][7].

1.1.1.4 Flavanony

Struktura flavanonů opět vychází z flavonů s tím rozdílem, že obsahují zcela saturovaný pyranový kruh (chybí dvojná vazba mezi uhlíky C3 a C4) [2][5]. Známými zástupci flavanonů jsou naringenin a hesperetin, jejichž dietní příjem lze zajistit konzumací širokého spektra citrusového ovoce [7].

1.1.1.5 Flavanoly

Flavanoly nebo také flavan-3-oly na rozdíl od všech předchozích podtříd neobsahují ketoskupinu na pozici C4, postrádají dvojnou vazbu mezi uhlíky C3 a C4 a na uhlíku C3 je vázána hydroxylová skupina, která na rozdíl od anthokyaninů může být vázána ve dvou různých konfiguracích. Tato strukturní rozmanitost flavanolů umožňuje tvorbu několika rozdílných konfigurací, což lze prezentovat na zástupcích této podtřídy – katechinu,

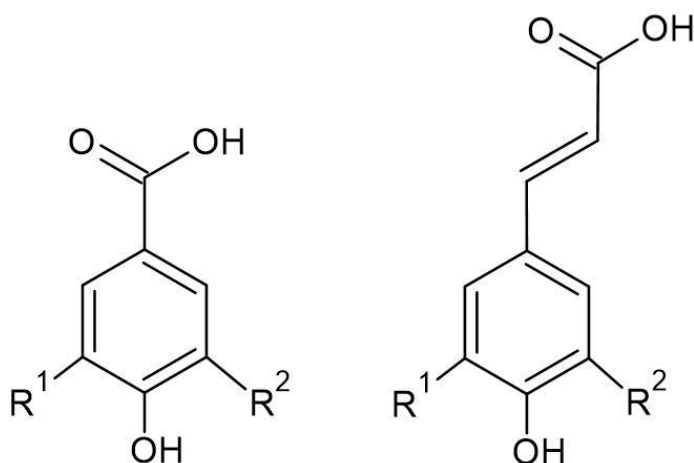
epikatechinu, galokatechinu a epigalokatechinu [2][6]. Jedná se o jedny z nejrozšířenějších flavonoidů, které se vyskytují v ovoci a dalších potravinách jako je čaj nebo čokoláda [2].

1.1.1.6 Antokyanidiny

Podobně jako flavanoly, antokyanidiny nemají na uhlíku C4 navázanou ketoskupinu, mezi uhlíky C3 a C4 chybí dvojná vazba a uhlík C3 obsahuje hydroxylovou skupinu. Unikátní vlastností této podtřídy je přítomnost pyryliového kationtu [5][6] v jejich struktuře, díky čemuž jsou tyto látky známy jako rostlinná barviva, která navíc mění barvu v závislosti na pH prostředí. V přírodě se vyskytují většinou jako glykosidy – antokyany, které se podílí na barevných projevech řady plodů, jako jsou hrozny, broskve, švestky nebo třešně [2].

1.1.1.7 Fenolické kyseliny

Jako fenolickou kyselinu lze označit jakoukoliv fenolickou látku, která obsahuje ve své struktuře karboxylovou skupinu. Jedná se o nejvýznamnější skupinu fenolických sloučenin, která nemá základ ve struktuře fenylobenzopyranu. Fenolické kyseliny lze dále rozdělit na hydroxybenzoové kyseliny a hydroxyskořicové kyseliny (obrázek 2). Mezi hydroxybenzoové kyseliny je možno zařadit kyselinu vanilovou, syringovou nebo galovou a jejich deriváty, především aldehydy – vanilin a syringaldehyd. Naopak do skupiny hydroxyskořicových kyselin patří například kyselina *p*-kumarová, kávová, ferulová, sinapová nebo kyselina chlorgenová a celá řada jejích izomerů, které jsou jednou z hlavních složek kávových zrn. Pravidelný přísun fenolických kyselin lze zajistit konzumací prakticky jakéhokoliv ovoce či zeleniny [2][8].



Obrázek 2: Obecný strukturní vzorec hydroxybenzoové (vlevo) a hydroxyskořicové kyseliny (vpravo)

1.1.2 Biosyntéza fenolických sloučenin

Jako počátek biosyntézy fenolických látek lze považovat dvě základní metabolické dráhy, a to **pentózofosfátový cyklus** a **glykolýzu**, kdy v obou případech je vstupní látkou glukóza. Hlavním úkolem pentózového cyklu je tvorba NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát), avšak pro syntézu fenolických sloučenin je důležitý jeden z meziproduktů této dráhy – erythróza-4-fosfát. Cílem glykolýzy je přeměna glukózy na pyruvát. Podobně jako u pentózového cyklu má pro biosyntézu fenolů význam meziprodukt tohoto cyklu – fosfoenolpyruvát. Tyto dva meziprodukty dále společně vstupují do **šikimátové dráhy**, jejíž hlavní úlohou je tvorba chorismátu, který slouží jako prekursor pro tvorbu aminokyselin tryptofanu, fenylalaninu a tyrosinu. Fenylalanin je vstupní látkou do **fenylpropanoidové dráhy**, ve které již dochází k biosyntéze řady fenolických sloučenin včetně flavonoidů, hydroxyskořicových kyselin a stilbenů. Takto popsany mechanismus vzniku rostlinných fenolů je značně zestručněný, každá metabolická dráha obsahuje řadu enzymatických reakcí a meziproduktů [5][9].

1.1.3 Zdravotní benefity fenolických sloučenin

Dietní příjem rostlinné stravy, především ovoce a zeleniny, je v současné společnosti jedním z trendů zdravého životního stylu, spolu s dalšími aktivitami jako jsou dostatek pohybu, příjem tekutin (především čisté vody) a kvalitní spánek. Konzumace ovoce a zeleniny je běžně spojována s příjmem vitamínů, minerálů, vlákniny a antioxidantů. Právě poslední zmíněnou skupinu látek, resp. vlastnost lze přiřadit k fenolickým sloučeninám. Antioxidační aktivita však není jediným benefitem fenolů pro lidský organismus [5]. Příjem stravy bohaté na fenolické sloučeniny lze předcházet radě onemocnění, nicméně různé látky mohou vykazovat odlišnou biologickou aktivitu a výčet zdravotních benefitů neplatí univerzálně pro všechny zástupce této skupiny látek [10].

1.1.3.1 Antioxidační aktivita

Přirozenou vlastností lidského organismu je tvorba radikálů, struktur s nepárovým elektronem, které jsou velmi reaktivní a mohou způsobit poškození zdravých buněk, což je jev známý jako oxidační stres. Koncentrace volných radikálů je v lidském organismu relativně malá, nicméně díky účinku řetězové reakce dokáže i jeden volný radikál způsobit poškození tisíce molekul. Oxidační stres je pak příčinou vzniku rakoviny, zrychleného stárnutí, kardiovaskulárních a neurodegenerativních onemocnění [5]. Fenolické sloučeniny spolu s dalšími biomolekulami zabraňují oxidačnímu poškození buněk několika mechanismy – vazbou a neutralizací volných radikálů, vazbou kovových iontů, inhibicí

enzymatických systémů, které produkují volné radikály a zvyšováním koncentrace endogenních antioxidantů [11].

1.1.3.2 Antimikrobiální aktivita

Bakterie a další mikroorganismy jsou příčinou řady závažných infekčních onemocnění, které vykazují stále vysokou mortalitu především v rozvojových zemích [12]. Fenolické sloučeniny byly identifikovány jako látky s potenciální antimikrobiální aktivitou a v literatuře lze dohledat celou řadu studií, které se zabývají touto problematikou, obvykle se zaměřením na konkrétní matrici [13][14][15]. Jako hlavní mechanismy účinku se udávají poškození bakteriální membrány a modifikace na genové úrovni. Kromě samotné antimikrobiální aktivity mohou fenoly vykazovat pozitivní modulační účinky na inhibiční aktivitu různých antibiotik vůči patogenním bakteriím [12].

1.1.3.3 Protizánětlivá aktivita

Zánět je jedním z projevů patofyziologických stavů jako obraná reakce na poškození tkáně způsobené mikroorganismy a dalšími chemicko-fyzikálními vlivy [16]. Zánět může být krátce trvající – tzv. akutní, který se vyznačuje exsudací tekutin a plazmatických proteinů a emigrací leukocytů. Pokud se imunitnímu systému nepodaří zánět zastavit v jeho akutní fázi, nastává fáze chronická, která je spojena s přítomností lymfocytů a makrofágů. Především makrofágy produkují několik prozánětlivých mediátorů, které jsou spojeny se vznikem chronických degenerativních onemocnění [17]. Pro zpomalení zánětlivých procesů se používají nesteroidní protizánětlivé látky, jejichž nadměrné používání vede k řadě vedlejších reakcí. Za jistou alternativu léčby lze považovat konzumaci ovoce a zeleniny s vysokým obsahem fenolických sloučenin, které vykazují protizánětlivou aktivitu (inhibují prozánětlivé mediátory) s prakticky nulovými vedlejšími účinky [18][19].

1.2 MODERNÍ TRENDY V KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII

Kapalinová chromatografie je jednou z nejrozšířenějších analytických technik, kterou využívají jak výzkumné, tak i komerční laboratoře po celém světě. Za objevitele chromatografie jako takové je považován M. S. Cvět, který počátkem 20. století úspěšně separoval listová barviva [20][21]. Právě separace složek vzorku na základě distribuce analytu mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází je hlavním principem LC, přičemž mobilní fáze je kapalina. Základní schéma kapalinového chromatografu lze popsat následovně: zásobník mobilní fáze → čerpadlo → dávkovací zařízení → kolona → detektor → počítač. Nicméně současné kapalinové chromatografy přináší řadu dnes již rutinně

používaných inovací jako je možnost čerpání až čtyři mobilních fází současně, odplyňovače mobilní fáze, tlakové a tzv. „leaking“ senzory, termostaty kolon, šesticečné ventily se smyčkou, automatické dávkovače vzorků (tzv. „autosamplery“) a podobně. Ačkoliv kapalinová chromatografie je již dobře zavedenou technikou, stále v této oblasti dochází k vývoji a posunu, který je zaměřen především na miniaturizace LC systémů, separace na dvoudimenzionální úrovni, využití superkritických tekutin a zdokonalování stacionárních fází [22].

1.2.1 Miniaturizace v kapalinové chromatografii

Jedním z aktuálních trendů kapalinové chromatografie je miniaturizace LC systémů. Důvodů k miniaturizaci je hned několik – zkrácení doby analýzy, menší spotřeba vzorku, mobilní a stacionární fáze (princip zelené chemie a snížení ceny analýzy), vyšší hmotnostní citlivost detekce a možnost analýzy v terénu [22][23].

Prvním přístupem miniaturizace v kapalinové chromatografii je samotné zmenšování rozměrů kolony (ve smyslu délky a vnitřního průměru) a velikosti částic. Se snižováním vnitřního průměru kolony (tabulka 1) však vzrůstá zpětný tlak systému, a proto jsou kladeny vyšší nároky na použitou instrumentaci, což sebou přináší i vyšší pořizovací cenu. Od klasické kapalinové chromatografie se postupem času přešlo k vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) schopné pracovat se zpětnými tlaky do 600 barů. Současným trendem a již dobře zavedenou technikou je ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC), kdy je použitá instrumentace schopna odolávat tlakům až 1500 barů. Výhodou UHPLC systémů je možnost pracovat za vysokých průtoků (v rozsahu 0,05 – nižší jednotky ml/min) při použití klasických HPLC kolon nebo naopak pracovat za běžných průtoků, ale při použití částic s velikostí pod 2 μm . V obou případech je dosaženo významného urychlení analýzy. Při použití kolon s vnitřním průměrem pod 0,5 mm je již potřeba, aby čerpadla mobilní fáze produkovala velmi malé (řádově $\mu\text{l}/\text{min}$ až nl/min), konstantní a reprodukovatelné průtoky s minimálními pulzy [22][24][25].

Tabulka 1: Klasifikace LC kolon z pohledu vnitřního průměru kolony.

Vnitřní průměr [mm]	Typ kolony
3,0 – 5,0	HPLC
<2	„Narrow-bore“ HPLC
0,5 – 1	Mikro LC
0,1 – 0,5	Kapilární LC
0,01 – 0,1	Nano LC
0,005 – 0,05	LC „open tubular“

V současnosti se miniaturizace kapalinové chromatografie vydává směrem tzv. laboratoře na čipu. Jedná se o zařízení, které umožňuje na velmi malé ploše (řádově několik mm^2 až cm^2) spojit hned několik analytických procesů včetně dávkování vzorku, čerpání mobilní fáze a samotné separace složek vzorku na koloně, která se obvykle označuje jako separační kanálek. Ten může být naplněn pevným sorbentem, případně monolitem a k zavedení stacionární fáze do kanálku se používá řada technologií jako potažení stěny kanálku stacionární fází, externí příprava stacionární fáze nebo tvorba stacionární fáze *in situ* [22][26]. Pro detekci separovaných látek se nejčastěji využívá spojení čipu s UV/Vis (detektor ultrafialovo-viditelné spektroskopie), fluorescenčním nebo hmotnostním spektrometrem, kde velmi malé průtoky mobilní fáze umožňují vysokou citlivost detekce [27].

1.2.2 Současné trendy ve vývoji stacionárních fází

Vyšší citlivost detekce v důsledku zvýšení účinnosti separace lze dosáhnout použitím stacionární fáze s menšími částicemi. V praxi se nejčastěji používají komerčně dostupné náplňové kolony s plně porézními částicemi o velikosti 3 až 5 μm , které jsou použitelné pro běžné HPLC aplikace. V případě použití částic pod 3 μm narůstá zpětný tlak systému a pro kolony s takovými částicemi je často potřeba přenést metodu na UHPLC systém. Snižování velikosti částic má význam pouze do určité úrovně, jelikož při dalším snížení je dosaženo jen malého zlepšení účinnosti (v důsledku vzniku teplotních radiálních gradientů) za cenu vysokého tlakového odporu [22][28].

Zvýšit účinnost kolony lze použitím povrchově porézních částic, které obsahují pevné neporézní jádro pokryté tenkou vrstvou stacionární fáze. Tím je dosaženo vyšší celkové velikosti částic, která se pohybuje okolo 3 μm a umožňuje tak použití instrumentace na úrovni HPLC. Na druhou stranu samotná vrstva stacionární fáze je velmi tenká (běžně okolo 0,5 μm), čímž je dosaženo zlepšení přenosu hmoty, jelikož analyty mohou pronikat do omezené hloubky vrstvy stacionární fáze. Kolony s povrchově porézními částicemi se tak z hlediska účinnosti podobají kolonám s velmi malými plně porézními částicemi (pod 2 μm), ale z hlediska zpětných tlaků připomínají konvenční plně porézní částice o velikosti 5 – 3 μm [28][29].

Tlaková omezení klasických částicových kolon vedla k rozvoji monolitických kolon jako dalšího typu stacionárních fází. Monolit v LC lze charakterizovat jako jeden kus kompaktního porézního materiálu, jehož hlavní výhodou je snadná příprava a možnost použití vysokých průtoků bez významné ztráty účinnosti a zvyšování zpětného tlaku [30]. Monolitické

stacionární fáze mohou být založeny na bázi anorganických, organických nebo polymerních materiálů [28]. Účinnost monolitických kolon lze srovnat s klasickými náplňovými kolonami o velikosti částic 5 μm , avšak monolity nemohou soupeřit s kolonami o velikosti částic pod 2 μm , zejména při vysokorychlostních separacích [31].

Dalším slibným pokrokem v oblasti stacionárních fází je technika multimodální kapalinové chromatografie, kdy pro rozdělení analytů je využito dvou a více interakčních mechanismů v rámci jedné kolony, z čehož vyplývá vysoká selektivita těchto fází. Často se využívá kombinace mechanismů reverzních fází (RPLC) a měničů iontů (IEC) nebo RPLC a hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), případně IEC a HILIC. Metoda nalézá uplatnění pro těžko rozdělitelné analyty a pro analýzu nabitých a neutrálních látek v jedné směsi, avšak stále je zde prostor pro inovace, především pro analýzu reálných vzorků [32].

1.2.3 Dvoudimenzionální kapalinová chromatografie

Separaci na základě alespoň dvou interakčních mechanismů využívá rovněž metoda dvoudimenzionální kapalinové chromatografie (2DLC). Na rozdíl od vícemodální chromatografie, 2DLC využívá dvou různých kolon (dimenzí), které mají odlišné selektivity. Výhodou (v porovnání s vícemodální chromatografií) jsou výsledné chromatogramy, které jsou prezentovány ve dvourozměrném provedení, což vede k rapidnímu zvýšení kapacity separace a technika 2DLC je tak vhodná pro separace velmi složitých směsí. Existují celkově tři možná provedení 2DLC: nepřímá (offline), frakční (heart-cutting) a v praxi nejvýkonnější komprehensivní 2DLC [22][33].

V případě komprehensivní 2DLC je potřeba dvou čerpacích systému mobilních fází a vícecestného ventilu se dvěma smyčkami. V první dimenzi je obvykle separace uskutečněna za nízkého průtoku na delší koloně s malým vnitřním průměrem. Frakce z první kolony je sbírána do smyčky č. 1 a při naplnění kapacity této smyčky je její obsah převeden (pomocí přepnutí vícecestného ventilu) dalším čerpadlem za vysokého průtoku na druhou, kratší kolonu. Zatímco probíhá separace první frakce ve druhé dimenzi, na první koloně dochází k separaci druhé frakce, která je tentokrát sbírána do smyčky č. 2. Tato druhá frakce je pak rovněž převedena na druhou kolonu, ale až po ukončení separace frakce předchozí. Z toho vyplývá, že kritickým faktorem pro úspěšné provedení komprehensivní 2DLC je správné nastavení časového programu jednotlivých cyklů, rozměrů obou kolon, průtoků mobilních fází a objemů frakcí ve smyčkách [34][35].

1.2.4 Superkritická fluidní chromatografie

Na konci 20. století byla obnovena myšlenka využití mobilní fáze v nadkritickém stavu pro aplikace v separačních technikách, zejména jako možná náhrada za plynovou chromatografii. Pozdější vývoj superkritické fluidní chromatografie (SFC) však dospěl do takové úrovně, že v dnešní době SFC využívá obdobnou instrumentaci a software jako kapalinová chromatografie. Mobilní fází je nejčastěji oxid uhličitý v jeho nadkritickém stavu (nad kritickou teplotou 31 °C a tlakem 7,38 MPa). Oxid uhličitý je však málo polární a použitelný pro eluci spíše nepolárních analytů. Pro zvýšení polaritity se tak využívá různých aditiv (např. metanol), která umožňují eluci i polárních látek. Z hlediska stacionárních fází lze použít prakticky stejné fáze jako v LC s normálními fázemi, včetně silikagelu modifikovaného kyano- nebo amino- skupinou. V porovnání s HPLC má SFC řadu výhod – vyšší výkonost a rychlost analýz, kratší ekvilibrace, nižší provozní náklady, nízké zpětné tlaky a ekologická nezávadnost [36].

1.2.5 Charakterizace kolon pro separace fenolických sloučenin

Pro analýzu fenolických sloučenin v rostlinném materiálu se nejčastěji využívá techniky LC, případně plynové chromatografie (pro analýzu těkavých fenolických sloučenin). V kapalinové chromatografii probíhají separace nejčastěji v módu obrácených (reverzních) fází (RP), za využití kolon s nepolární stacionární fází. Mobilní fáze je nejčastěji směs vody a organického rozpouštědla (acetonitrilu nebo metanolu) nejčastěji s přídavkem kyseliny octové (případně mravenčí) pro potlačení ionizace analytů (zejména fenolických kyselin) [37]. V literatuře lze dohledat i aplikace metody hydrofilní interakční chromatografie, která využívá polárních stacionárních fází (jako v módu s normálními fázemi), ale mobilní fáze je v drtivé většině aplikací směs vodných pufrů s vysokým obsahem acetonitrilu [38][39]. Vzhledem ke složitosti rostlinných materiálů, uplatnění v této oblasti našla rovněž technika 2DLC [40][41].

1.2.5.1 Retenční faktor

Cíleně lze chromatografické kolony, resp. stacionární fáze, charakterizovat hned z několika hledisek. Prvním takovým parametrem a zároveň jednou ze základních veličin v separačních technikách je retenční faktor, který vyjadřuje míru zadržování dané látky na koloně. Pro zjištění retenčního faktoru k (rovnice 1) je zapotřebí znalosti retenčního času analytu t_R a tzv. mrtvého času t_M , který je roven retenčnímu času látky, která není na koloně zadržována. Určení t_M , resp. V_M (mrtvého objemu) však může být problematické např. v HILIC módu, kde je potřeba brát v úvahu množství adsorbované vody na povrchu

stacionární fáze [42]. Čím větší je hodnota retenčního faktoru, tím je látka více zadržována na koloně. Naopak hodnoty blízké nule značí, že látka eluuje v blízkosti mrtvého objemu kolony.

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

Rovnice 1: Výpočet retenčního faktoru.

1.2.5.2 Selektivita separace

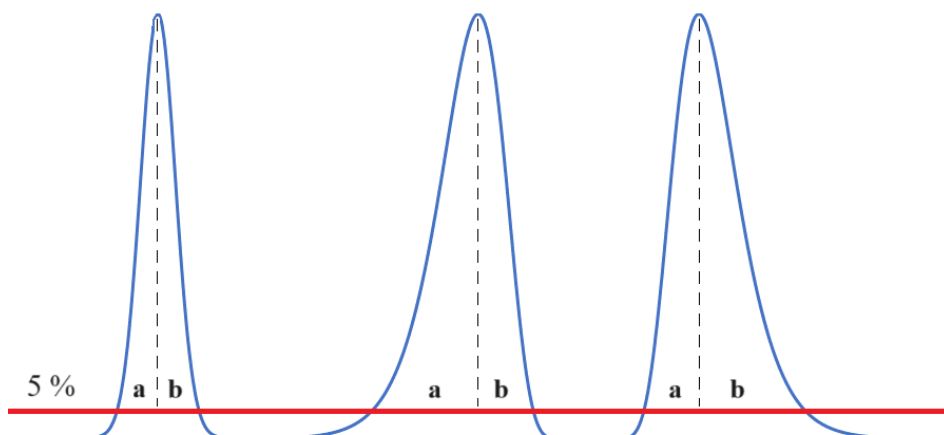
Stacionární fáze lze hodnotit i z hlediska selektivity. Selektivita α je vyjádřena jako poměr retenčního faktoru více zadržované látky k_2 a retenčního faktoru méně zadržované látky k_1 (rovnice 2). Selektivita je počítána pro konkrétní dvojice látek a pokud je její hodnota rovna jedné, znamená to, že látky za daných podmínek eluují v totožném retenčním čase.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Rovnice 2: Výpočet selektivity dvojice látek.

1.2.5.3 Symetrie píků

Dalším parametrem, kterým lze charakterizovat jednotlivé kolony je symetrie, resp. asymetrie A_S (rovnice 3) jednotlivých píků. V kapalinové chromatografii je snaha dosáhnout ideální symetrie (tzv. Gaussova rozdělení), která je rovna jedné. V praxi však dochází k tzv. chvostování (faktor asymetrie >1), resp. frontování (faktor asymetrie <1) píků (obrázek 3), což může výrazně zhoršovat rozdělení jednotlivých látek.



Obrázek 3: Typy píkové symetrie. Zleva: pík s ideální symetrií, frontující pík, chvostující pík.

$$A_s = \frac{b}{a}$$

Rovnice 3: Výpočet asymetrie píku. Hodnoty a a b jsou šířky píku první, resp. druhé poloviny píku v 5 % jeho výšky.

1.2.5.4 Účinnost separace

Účinnost separace nebo také počet teoretických pater N (rovnice 4) je bezrozměrná veličina, která charakterizuje míru rozšiřování eluční zóny analytu na koloně. Hodnota účinnosti je charakteristická pro konkrétní látku a danou kolonu a k jejímu výpočtu je zapotřebí znalosti retenčního času látky t_R a šířky píku (resp. šířky píku v polovině jeho výšky $w_{0,5}$).

$$N = 5,545 \times \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2$$

Rovnice 4: Výpočet účinnosti.

Pokud známe hodnotu účinnosti N a délku chromatografické kolony L , je dále možné vypočítat výškový ekvivalent teoretického patra H (rovnice 5).

$$H = \frac{L}{N}$$

Rovnice 5: Výpočet výškového ekvivalentu teoretického patra.

Z van Deemterovy rovnice pro výpočet H (rovnice 6) vyplývá, že rozšiřování píku analytu na koloně je dáno třemi hlavními příspěvky – vířivou difúzí (člen A), molekulární difúzí (člen B) a odporu proti převodu hmoty (člen C). Příspěvek členu B klesá, a naopak příspěvek členu C roste se zvyšující se lineární rychlostí toku mobilní fáze u . Jednotlivé členy rovnice se zjišťují experimentálně na základě tzv. $H - u$ křivky (závislosti H na u), z jejíhož minima lze rovněž stanovit optimální hodnotu průtoku mobilní fáze pro zachování nejvyšší možné účinnosti.

$$H = A + \frac{B}{u} + C \times u$$

Rovnice 6: Van Deemterova rovnice pro výpočet výškového ekvivalentu teoretického patra.

1.3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem první experimentální části bylo porovnat retenční chování vybraných fenolických sloučenin na různých RP kolonách na základě symetrií píků, retenčních faktorů, selektivit a parametrů van Deemterovy rovnice. K tomu byla použita technika HPLC s detekcí diodového pole (HPLC-DAD). K porovnání byly vybrány následující dvojice látek:

eskulin – eskuletin (glykosid – volná forma), epikatechin – katechin (epimery), kyselina syringová – syringaldehyd (kyselina – aldehyd) a kyselina *p*-kumarová – kyselina *m*-kumarová (*p*- a *m*- izomery). Pro porovnání bylo využito izokratických analýz fenolických sloučenin a vybraných alkylbenzenů.

1.3.1 Kolony

Bylo vybráno osm různých kolon (tabulka 2) určených pro separace v módu reverzních fází. Čtyři kolony byly naplněny povrchově porézními částicemi, zbylé čtyři byly plně porézními částicemi. Ve všech případech byla zachována délka kolony a to 150 mm, lišil se však vnitřní průměr a velikost částic.

Tabulka 2: Seznam testovaných kolon a jejich vnitřní průměry a velikosti částic.

Kolona	Typ částic	Vnitřní průměr [mm]	Velikost částic [μm]	Průtok mobilní fáze [ml/min]
Luna Omega Polar C18	Plně pórovité	3	3	0,5
Luna Omega PS C18	Plně pórovité	3	3	0,5
Evosphere Diphenyl	Plně pórovité	3	3	0,5
ACE 3 C18-PFP	Plně pórovité	3	3	0,5
Kinetex C18	Povrchově pórovité	3	2,6	0,577
Kinetex EVO C18	Povrchově pórovité	3	2,6	0,577
Kinetex Biphenyl	Povrchově pórovité	2,1	2,6	0,283
Ascentis Express C8	Povrchově pórovité	3	2,7	0,556

1.3.2 Použité standardy

Veškeré použité standardy látek byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Eskulin (≥97%)	Benzen (≥99%)
Eskuletin (98%)	Toulen (≥99,5%)
(+)-Katechin hydrát (≥97%)	Ethylbenzen (99,8%)
(-)-Epicatechin (≥90%)	Propylbenzen (98%)
Kyselina syringová (≥98%)	
Syringaldehyd (98%)	
Kyselina <i>p</i> -kumarová (≥98%)	
Kyselina <i>m</i> -kumarová (99%)	

1.3.3 HPLC-DAD analýza

Analýzy byly provedeny za využití HPLC systému Agilent 1200 s detektorem diodového pole (DAD) (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Jako mobilní fáze A byla použita deionizovaná voda (produkovaná systémem Milli-Q, Merck KGaA, Darmstadt, Německo) s přídavkem 0,1 % (v/v) kyseliny octové (čistota pro LC-MS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a mobilní fází B byl acetonitril (čistota pro HPLC, Sigma-Aldrich) s přídavkem 0,1 % (v/v) kyseliny octové. Teplota kolony byla nastavena na 40 °C a dávkovaný objem byl použit 3 µl. Detekce byla uskutečněna při vlnových délkách 280 nm (epikatechin, katechin, *p*-kumarová, *m*-kumarová a syringová kyselina) a 330 nm (eskulin, eskuletin, syringaldehyd). Koncentrace každého standardu ve směsi byla 10 mg/l, včetně „markeru“ mrtvého objemu – thiomocoviny (≥99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Pro účely porovnání selektivity, píkovej symetrie a retence byly použity průtoky mobilní fáze odpovídající tabulce 2 při izokratické analýze 15 % mobilní fáze B.

Ke zjištění účinnosti a parametrů van Deemterovy křivky byl průtok volen v rozmezí 0,03 – 0,8 ml/min v závislosti na parametrech kolony a tlakových limitech systému. Ve většině případů bylo použito celkově 17 rozdílných hodnot průtoků, nejméně pak 10 v případě kolony Kinetex Biphenyl. Separace byly uskutečněny v módu izokratické eluce při 20 % B pro fenolické sloučeniny a 75 % B pro alkylbenzeny.

1.4 VÝSLEDKY A DISKUZE

1.4.1 Porovnání retenčních faktorů

Vybrané kolony byly testovány pro ověření retence vybraných fenolických látek. Pro tyto účely byla zvolena bezrozměrná veličina – retenční faktor. Na základě výsledků v tabulce 3 lze konstatovat následující skutečnosti. Při izokratické analýze byly látky zadržovány nejvíce na koloně Evosphere Diphenyl, a naopak nejméně na koloně Kinetex EVO C18.

Tabulka 3: Hodnoty retenčních faktorů vybraných fenolických sloučenin na různých kolonách v módu reverzních fází ($n = 3$).

Kolona	eskulin	eskuletin	epikatechin	katechin	kyselina syringová	syringaldehyd	kyselina <i>p</i> -kumarová	kyselina <i>m</i> -kumarová
Luna Omega Polar C18	0,80	1,87	1,80	1,14	2,10	3,92	3,82	5,06
Luna Omega PS C18	0,84	2,24	2,34	1,44	2,82	4,93	5,27	7,79
Evosphere Diphenyl	1,05	2,89	3,67	2,21	3,47	6,59	5,83	7,62
ACE 3 C18-PFP	0,85	2,23	2,23	1,37	2,46	5,15	4,40	6,67
Kinetex C18	0,59	1,69	1,65	1,05	1,92	3,95	3,83	5,66
Kinetex EVO C18	0,54	1,49	1,50	0,97	1,80	3,29	3,48	4,98
Kinetex Biphenyl	0,74	1,73	1,67	1,15	1,87	4,27	2,97	4,10
Ascentis Express C8	0,54	1,60	1,31	0,86	1,85	4,01	3,71	5,79

Retence se zpravidla snižovala v následujícím pořadí: Evosphere Diphenyl → Luna Omega PS C18 → ACE 3 C18-PFP → Luna Omega Polar C18 → Kinetex Biphenyl → Kinetex C18 → Ascentis Express C8 → Kinetex EVO C18. Toto pořadí však neplatí univerzálně pro všechny látky, ale bylo vyhodnoceno na základě většího počtu látek v daném pořadí. Kolony naplněné plně porézními částicemi vykazovaly vyšší retenci pro fenolické látky než kolony plněné částicemi povrchově porézními.

1.4.2 Porovnání symetrie píků

Bylo provedeno testování vybraných kolon na symetrii, resp. asymetrii píků jednotlivých látek. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4: Hodnoty symetrií píků vybraných fenolických sloučenin na různých kolonách v módu reverzních fází ($n = 3$).

Kolona	eskulin	eskuletin	epikatechin	katechin	kyselina syringová	syringaldehyd	kyselina <i>p</i> -kumarová	kyselina <i>m</i> -kumarová
Luna Omega Polar C18	1,14	2,09	1,18	1,21	1,10	1,06	1,06	1,04
Luna Omega PS C18	1,05	0,87	0,92	1,03	0,96	0,87	0,87	0,88
Evosphere Diphenyl	0,98	0,96	0,83	0,90	1,23	1,48	0,88	0,87
ACE 3 C18-PFP	1,13	1,25	1,04	1,11	1,06	1,05	1,04	1,02
Kinetex C18	1,10	1,60	0,92	1,10	0,87	0,73	0,70	0,63
Kinetex EVO C18	1,12	1,07	0,95	1,06	0,92	0,81	0,80	0,74
Kinetex Biphenyl	1,44	1,20	1,15	1,28	1,33	1,16	1,26	1,12
Ascentis Express C8	1,15	1,20	1,11	1,20	1,11	1,03	1,02	0,99

Z výsledků jednotlivých analýz je patrné, že látky měly tendenci spíše chvostovat na kolonách Luna Omega Polar C18, ACE 3 C18-PFP, Kinetex Biphenyl a Ascentis Express C8. Na ostatních kolonách docházelo ve většině případů ke frontování píků. Z toho vyplývá, že typ částic (plně porézní × povrchově porézní) neměl vliv na tvar píků z hlediska typu asymetrie.

Dále byly výsledky porovnány z hlediska celkové asymetrie, vyjádřené jako průměr hodnot odchylek jednotlivých látek od ideální symetrie na dané koloně, přičemž hodnoty menší než 1 v tabulce 4 byly pro účely výpočtu brány jako převrácené. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na kolonách ACE 3 C18-PFP (průměrná odchylka = 0,09), Luna Omega PS C18 a Ascentis Express C8 (průměrná odchylka = 0,10). Naopak nejhorší výsledky byly zjištěny u kolon Kinetex C18 (průměrná odchylka = 0,30), Luna Omega Polar C18 a Kinetex Biphenyl (průměrná odchylka = 0,24).

1.4.3 Porovnání selektivity vybraných dvojic látek

Vybrané dvojice (eskulin – eskuletin; epikatechin – katechin; kyselina syringová – syringaldehyd; kyselina *p*-kumarová – kyselina *m*-kumarová) byly podrobeny ověření selektivit α na testovaných kolonách.

Tabulka 5: Hodnoty selektivit pro vybrané dvojice fenolických látek na různých kolonách v módu reverzních fází ($n = 3$).

Kolona	eskulin eskuletin	epikatechin katechin	kyselina syringová syringaldehyd	kyselina <i>p</i> -kumarová kyselina <i>m</i> -kumarová
Luna Omega Polar C18	2.33	1.57	1.86	1.33
Luna Omega PS C18	2.68	1.63	1.75	1.48
Evosphere Diphenyl	2.75	1.66	1.90	1.31
ACE 3 C18-PFP	2.64	1.63	2.10	1.52
Kinetex C18	2.85	1.57	2.05	1.48
Kinetex EVO C18	2.75	1.56	1.83	1.43
Kinetex Biphenyl	2.34	1.46	2.28	1.38
Ascentis Express C8	2.95	1.52	2.17	1.56

Z tabulky 5 vyplývá, že selektivita vybraných dvojic byla dostatečná na všech použitých kolonách pro reverzní fáze. Zároveň nebyly zjištěny výrazné rozdíly mezi jednotlivými kolonami. Vzhledem k tomu, že selektivita závisí na použité mobilní fázi (zejména poměru voda – organická složka), dané výsledky jsou platné pouze pro konkrétní podmínky analýzy a změnou mobilní fáze mohlo dojít k zásadním změnám selektivit.

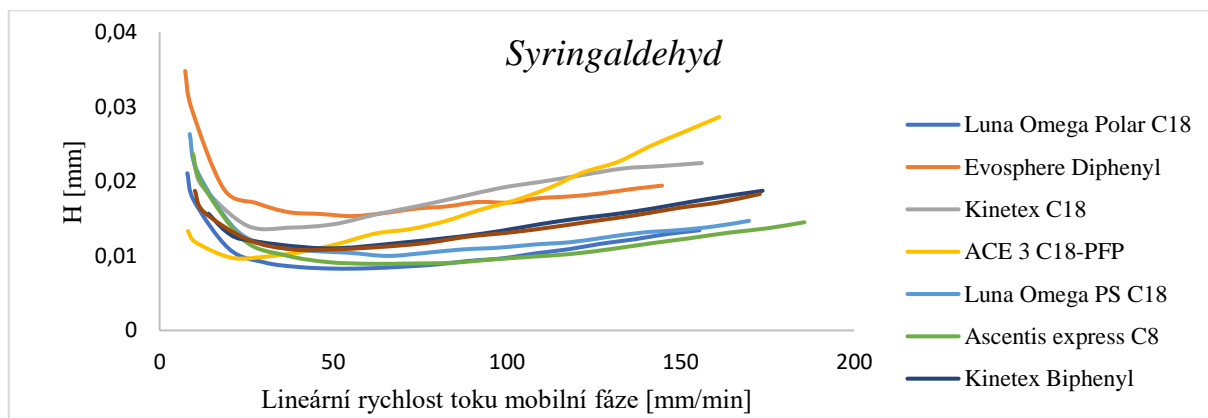
1.4.4 Porovnání členů van Deemterovy rovnice

Pro porovnání účinností vybraných kolon, resp. příspěvků jednotlivých členů A , B a C k celkovému výškovému ekvivalentu teoretického patra byla provedena série analýz fenolických sloučenin při různých průtocích mobilní fáze. Platnost van Deemterovy rovnice je omezena v základním tvaru na píky s ideální symetrií (Gaussovým průběhem) a vzhledem ke chvostování, resp. frontování jednotlivých fenolických látek (viz. kapitola 1.4.2) byly na každé koloně rovněž provedeny analýzy alkylbenzenů, jejichž symetrie píků se blíží k jedné.

1.4.4.1 Van Deemterova rovnice pro fenolické sloučeniny

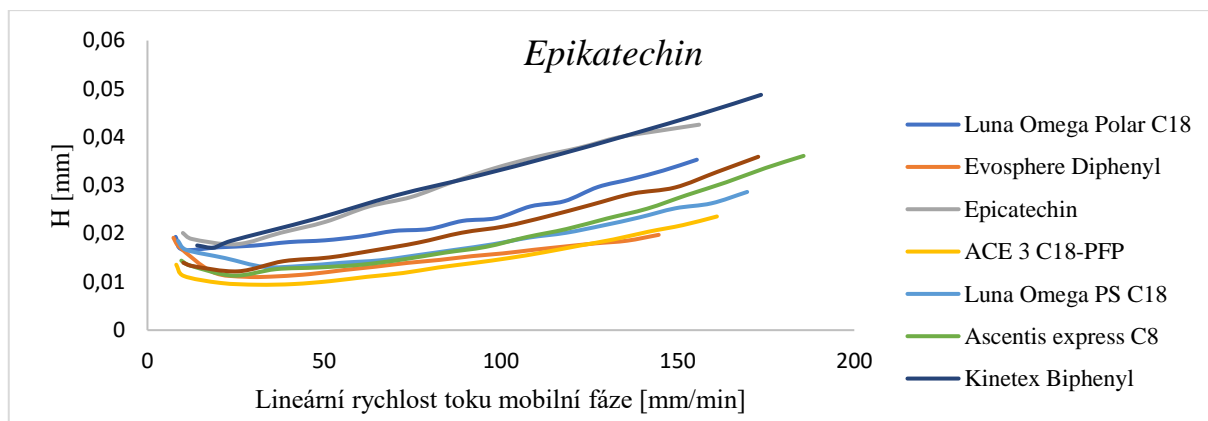
Analýzou fenolických látek a thiomocoviny při různých průtocích byly sestrojeny $H - u$ křivky (závislosti výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti toku mobilní fáze) pro jednotlivé látky a kolony v rozmezí průtoků 0,03 – 0,8 ml/min, přičemž spodní hranice průtoků byla dána schopností systému spolehlivě čerpat mobilní fázi při velmi malých průtocích a horní hodnota byla dána tlakovým limitem systému.

Na obrázcích 4 a 5 jsou znázorněny dvě typické situace, kterých bylo dosaženo analýzami fenolických sloučenin. V prvním případě (obrázek 4) byly získány relativně uspokojivé závislosti, jelikož z takovýchto tvarů $H - u$ křivek lze určit všechny tři členy van Deemterovy rovnice. Kromě syringaldehydu byly podobné závislosti získány pro kyselinu syringovou, p - a m -kumarovou (přílohy 1 – 3).



Obrázek 4: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro syringaldehyd na testovaných kolonách ($n = 1$).

Druhá možná situace je znázorněna na obrázku 5. V tomto případě průběh získaných $H - u$ neumožňoval spolehlivé určení členu B . Obdobné závislosti jako u epikatechinu byly získány pro katechin, eskulin a eskuletin (přílohy 4 – 6).

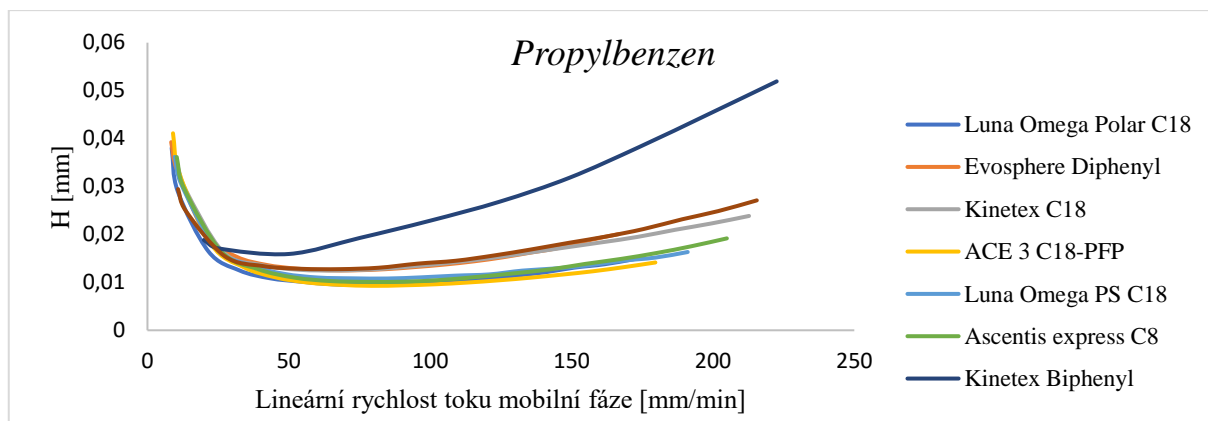


Obrázek 5: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro epikatechin na testovaných kolonách ($n = 1$).

Z výsledků je patrné, že $H - u$ křivky fenolických látek dosahují svého minima při velmi nízkých lineárních rychlostech toku mobilní fáze, resp. průtocích. Na základě hodnot H pro jednotlivé analýzy lze tvrdit, že dobré účinnosti pro většinu vybraných fenolických látek bylo dosaženo na kolonách ACE 3 C18-PFP a Ascentis express C8. Naopak jako nejhorší z hlediska účinnosti se jeví kolony Kinetex Biphenyl a Kinetex C18.

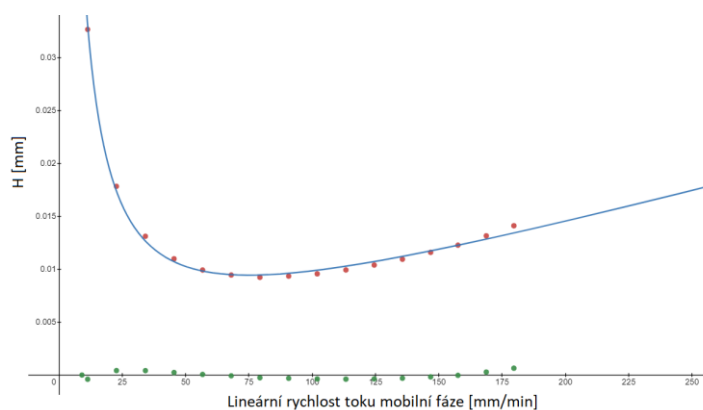
1.4.4.2 Van Deemterova rovnice pro alkylbenzeny

Vzhledem k výše diskutovaným průběhům $H - u$ křivek fenolických sloučenin z hlediska určení jednotlivých členů van Deemterovy rovnice byly pro tyto účely provedeny také analýzy homologické série alkylbenzenů. Vycházelo se z předpokladu, že kinetické aspekty separace závisí zejména na velikosti molekul analytů. Pro charakterizaci kolon z hlediska členů van Deemterovy rovnice byl tak použit tento přístup, jelikož obě skupiny látek jsou relativně malé molekuly. Pro ukázkou průběhu $H - u$ křivek byl zvolen propylbenzen (obrázek 6), jelikož jeho molekulová hmotnost je nejbližší vybraným fenolickým látkám. Ostatní závislosti alkylbenzenů jsou uvedeny v přílohách 7 – 9.



Obrázek 6: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro propylbenzen na testovaných kolonách ($n = 1$).

Pro určení členů A , B a C van Deemterovy rovnice byly získané hodnoty zpracovány v online statistickém softwaru Desmos (Desmos, Inc., San Francisco, CA, USA), přičemž byl použit matematický model ve tvaru $y_1 = a + \frac{b}{x_1} + c \times x_1$, což je ekvivalent rovnice 6. Výsledkem byly hodnoty jednotlivých členů a , b , c , resp. A , B a C a průběh dané závislosti, včetně reziduálních hodnot (obrázek 7).



Obrázek 7: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro propylbenzen na koloně ACE 3 C18-PFP. Červené body – experimentálně zjištěné hodnoty, modrá linie – průběh matematického modelu, zelené body – hodnoty reziduí ($n = 1$).

Byl vypracován přehled vlivu vířivé difúze alkylbenzenů pro jednotlivé kolony na celkovou účinnost kolony (tabulka 6). Z výsledků je zřejmé, že nejmenší vliv na účinnost separace měla vířivá difúze na kolonách s povrchově porézními částicemi. Výrazně nižší hodnoty byly zjištěny pro kolonu Kinetex Biphenyl, která jako jediná z testovaných kolon měla vnitřní průměr 2,1 mm. Se zvyšující se molekulovou hmotností rostl příspěvek členu A k celkové účinnosti a snižoval se rozdíl mezi povrchově a plně porézními částicemi.

Tabulka 6: Hodnoty vířivé difúze (člen *A*) alkylbenzenů pro jednotlivé kolony. Kolony s povrchově porézními částicemi jsou zvýrazněny modře.

Benzen		Toulen	
	<i>A</i> [μm]		<i>A</i> [μm]
Kinetex Biphenyl	-18.05	Kinetex Biphenyl	-16.05
Ascentis express C8	-5.69	Ascentis express C8	-4.16
Kinetex C18	-5.52	Kinetex C18	-3.20
Kinetex EVO C18	-4.90	Kinetex EVO C18	-2.96
ACE 3 C18-PFP	-3.09	ACE 3 C18-PFP	-1.90
Luna Omega PS C18	-3.06	Luna Omega PS C18	-1.26
Luna Omega Polar C18	-2.05	Luna Omega Polar C18	-0.63
Evosphere Diphenyl	-0.35	Evosphere Diphenyl	0.70

Ethylbenzen		Propylbenzen	
	<i>A</i> [μm]		<i>A</i> [μm]
Kinetex Biphenyl	-13.78	Kinetex Biphenyl	-11.82
Ascentis express C8	-2.69	Ascentis express C8	-1.29
Kinetex C18	-1.44	ACE 3 C18-PFP	-0.35
Kinetex EVO C18	-1.22	Luna Omega Polar C18	0.09
ACE 3 C18-PFP	-0.95	Kinetex C18	0.29
Luna Omega Polar C18	-0.51	Kinetex EVO C18	0.49
Luna Omega PS C18	0.20	Luna Omega PS C18	1.63
Evosphere Diphenyl	1.78	Evosphere Diphenyl	1.99

Vliv molekulární difúze (člen *B*) alkylbenzenů je shrnut v tabulce 7. Rozdíly v molekulární difúzi na různých kolonách nebyly příliš velké (výjimkou byla opět kolona Kinetex Biphenyl) v porovnání s vířivou difúzí, kde rozdíly mezi jednotlivými kolonami byly v mnoha případech více jak dvojnásobné. S rostoucí molekulovou hmotností klesal příspěvek členu *B* k celkové účinnosti kolon. Nízkých hodnot členu *B* bylo dosaženo na kolonách Luna Omega Polar C18, Evosphere Diphenyl a Kinetex EVO C18.

Tabulka 7: Hodnoty molekulární difúze (člen B) alkylbenzenů pro jednotlivé kolony. Kolony s povrchově porézními částicemi jsou zvýrazněny modře.

Benzen		Toulen	
	B [$\mu\text{m}^2/\text{min}$]		B [$\mu\text{m}^2/\text{min}$]
Luna Omega Polar C18	367.5	Luna Omega Polar C18	330.1
Evosphere Diphenyl	375.4	Evosphere Diphenyl	343.4
Luna Omega PS C18	391.3	Kinetex EVO C18	357.9
Kinetex EVO C18	395.0	Luna Omega PS C18	367.6
Kinetex C18	421.7	Kinetex C18	391.7
ACE 3 C18-PFP	422.8	ACE 3 C18-PFP	400.9
Ascentis express C8	442.5	Ascentis express C8	419.8
Kinetex Biphenyl	716.0	Kinetex Biphenyl	662.7

Ethylbenzen		Propylbenzen	
	B [$\mu\text{m}^2/\text{min}$]		B [$\mu\text{m}^2/\text{min}$]
Evosphere Diphenyl	309.1	Kinetex EVO C18	307.2
Kinetex EVO C18	327.4	Evosphere Diphenyl	313.3
Luna Omega Polar C18	335.1	Luna Omega Polar C18	314.1
Luna Omega PS C18	343.7	Luna Omega PS C18	332.1
Kinetex C18	369.8	Kinetex C18	359.9
ACE 3 C18-PFP	374.4	ACE 3 C18-PFP	369.0
Ascentis express C8	395.7	Ascentis express C8	384.3
Kinetex Biphenyl	584.9	Kinetex Biphenyl	531.4

Posledním členem van Deemterovy rovnice je odpor proti převodu hmoty (člen C), jehož hodnoty pro jednotlivé kolony jsou shrnuty v tabulce 8. Z výsledků vyplývá, že příspěvek odporu proti převodu hmoty byl větší (v průměru o zhruba 40 % při vynechání kolony Kinetex Biphenyl) u kolon s povrchově porézními částicemi. Nejnížší hodnoty členu C vykazovala kolona ACE 3 C18-PFP, naopak jako nejhorší se ukázaly být kolony Kinetex EVO C18 a Kinetex Biphenyl. S rostoucí molekulovou hmotností docházelo ke snižování příspěvku členu C k celkové účinnosti.

Tabulka 8: Hodnoty odporu proti převodu hmoty (člen C) alkylbenzenů pro jednotlivé kolony. Kolony s povrchově porézními částicemi jsou zvýrazněny modře.

Benzen		Toulen	
	C [min×10 ³]		C [min×10 ³]
ACE 3 C18-PFP	0.136	ACE 3 C18-PFP	0.105
Evosphere Diphenyl	0.141	Luna Omega Polar C18	0.117
Luna Omega Polar C18	0.151	Luna Omega PS C18	0.119
Luna Omega PS C18	0.154	Evosphere Diphenyl	0.122
Ascentis express C8	0.187	Ascentis express C8	0.149
Kinetex C18	0.201	Kinetex C18	0.159
Kinetex EVO C18	0.222	Kinetex EVO C18	0.181
Kinetex Biphenyl	0.386	Kinetex Biphenyl	0.359

Ethylbenzen		Propylbenzen	
	C [min×10 ³]		C [min×10 ³]
ACE 3 C18-PFP	0.084	Luna Omega PS C18	0.064
Luna Omega PS C18	0.090	ACE 3 C18-PFP	0.065
Luna Omega Polar C18	0.094	Luna Omega Polar C18	0.071
Evosphere Diphenyl	0.102	Ascentis express C8	0.084
Ascentis express C8	0.116	Evosphere Diphenyl	0.090
Kinetex C18	0.129	Kinetex C18	0.100
Kinetex EVO C18	0.146	Kinetex EVO C18	0.110
Kinetex Biphenyl	0.320	Kinetex Biphenyl	0.285

Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že vliv typu částice na jednotlivé členy van Deemterovy rovnice klesal v následujícím pořadí: vířivá difúze → odpor proti převodu hmoty → molekulární difúze. Z praktického hlediska a pro zvolení kolony s nejlepšími kinetickými aspekty separace, bylo potřeba přepočítat členy *B* a *C* na konkrétní hodnotu průtoku, resp. lineární rychlosti toku mobilní fáze (tabulka 9). V praxi se běžně jako první volba používá průtok 0,5 ml/min pro kolony o rozměrech 150 × 3 mm.

Tabulka 9: Hodnoty výškového ekvivalentu teoretického patra (*H*) a dalších členů van Deemterovy rovnice přepočítané na konkrétní hodnotu průtoku 0,5 ml/min pro propylbenzen.

	A [μm]	B/u [μm]	C×u [μm]	H [μm]
ACE 3 C18-PFP	-0.353	3.257	7.417	10.322
Luna Omega Polar C18	0.089	2.892	7.700	10.681
Luna Omega PS C18	1.632	2.747	7.751	12.130
Ascentis Express C8	-1.285	2.967	10.914	12.596
Evosphere Diphenyl	1.996	2.981	9.437	14.414
Kinetex C18	0.285	2.692	13.369	16.346
Kinetex EVO C18	0.492	2.261	14.929	17.682
Kinetex Biphenyl	-11.819	3.911	38.666	30.757

Nejlepších kinetických aspektů separace (pro propylbenzen) při průtoku 0,5 ml/min bylo dosaženo na kolonách ACE 3 C18-PFP a Luna Omega Polar C18. Naopak nejhorších výsledků z hlediska účinnosti bylo dosaženo na kolonách Kinetex Biphenyl a Kinetex EVO C18. Z tabulky 9 je patrné, že největší vliv na celkovou účinnost měl odpor proti převodu hmoty, následovaný molekulární difúzí. Téměř zanedbatelný, a v mnoho případech i záporný, byl člen A, tedy příspěvek vířivé difúze.

1.5 SHRNU TÍ

V první experimentální části bylo porovnáno retenční chování vybraných fenolických sloučenin na osmi různých kolonách určených pro separace v systému obrácených fází. Pro tyto účely byly vybrány jak kolony s plně porézními částicemi, tak i kolony s povrchově porézními částicemi. Kolony byly hodnoceny z hlediska retence, píkové symetrie a selektivity vybraných dvojic látek. Účinnost kolon byla ověřena na základě $H - u$ křivek, přičemž pro tyto účely byly dodatečně provedeny experimenty zahrnující homologickou sérii alkylbenzenů. Na základě dosažených výsledků byly jako nejvhodnější pro analýzu fenolických látek vybrány kolony ACE 3 C18-PFP a Luna Omega Polar C18.

2 LC-MS/MS STANOVENÍ FENOLICKÝCH SLOUČENIN

2.1 SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometr je v současné době jedním z nejvýkonnějších detektorů v oblasti analytické chemie. Jeho základním principem je ionizace analytů, separace získaných iontů a jejich následná detekce. K ionizaci analytů dochází v iontovém zdroji, přičemž existuje celá řada ionizačních technik jako elektronová ionizace, chemická ionizace, elektrosprej nebo ionizace za atmosférického tlaku. Volba ionizační techniky závisí na povaze cíleného analytu (zejména na molekulové hmotnosti a polaritě), případně na použité separační technice. Ionty získané z iontového zdroje jsou dále vedeny do hmotnostního analyzátoru, jehož hlavní úlohou je separace získaných iontů na základě poměru hmotnost iontu m a náboje z . Na trhu je hned několik hmotnostních analyzátorů, které se liší základním principem a v neposlední řadě i samotnou výkonností a cenou. Za velmi jednoduchý, ale přesto velmi oblíbený, je považován kvadrupólový analyzátor (Q). Dalšími relativně jednoduchými analyzátoři jsou iontová past (IT) a analyzátor doby letu (TOF). Nejlepších detekčních parametrů dosahují analyzátoři Orbitrap nebo iontová cyklotronová rezonance (ICR), v současné době jsou však stále velmi cenově nákladné. Aktuálním trendem je spojení více hmotnostních analyzátorů za sebou (např. Q-q-Q nebo Q-q-TOF), díky čemuž je dosaženo velmi vysokých selektivit analýz. Použití samotného hmotnostního spektrometru pro analýzu složitých směsí (např. rostlinného materiálu) je velmi omezené a pro identifikaci a kvantifikaci co největšího množství látek je potřeba spojit hmotnostní spektrometr se separační technikou (LC-MS, v případě tandemové hmotnostní spektrometrie HPLC-MS/MS)) [22][43].

V druhé polovině 20. století došlo k výraznému posunu v oblasti separačních technik, jelikož se na trhu objevilo první spojení plynové chromatografie (GC) a hmotnostního detektoru. Spojení těchto dvou technik bylo relativně jednoduché, jelikož podmínky (jako např. těkavost a tepelná stabilita analytů nebo malý objem plynu v porovnání s kapalinou) byly pro GC a MS prakticky stejné. V případě kapalinové chromatografie byla však situace podstatně složitější, zejména z důvodu nutnosti propojovacího rozhraní obou technik, jehož hlavním účelem bylo odstranění přebytku mobilní fáze. Dnes je spojení LC-MS zcela běžnou záležitostí a přináší řadu výhod jako je identifikace a kvantitativní stanovení separovaných látek, vysoká

selektivita a citlivost, nízké detekční limity a zejména možnost identifikovat látky, které nelze rozdělit pomocí LC [22][43].

2.2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem druhé experimentální části bylo optimalizovat a validovat HPLC-MS/MS metodu pro analýzu 48 standardů běžných fenolických sloučenin. Požadavkem bylo vytvořit metodu s dobrou selektivitou, krátkou dobou jedné analýzy, nízkými detekčními limity, vysokou přesností, správností a opakovatelností. Jedním z dalších požadavků byla univerzálnost metody pro účely stanovení fenolických látek v rostlinných materiálech, což bylo předmětem třetí a čtvrté části této práce.

2.2.1 Použité standardy

Standardy látek byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

<u>Aldehydy</u>	<u>Flavonoidy</u>	Kys. chlorgenová (95%)
4-hydroxybenzaldehyd (98%)	7-hydroxyflavon (AS)	Kys. kávová (≥98%)
Koniferyl aldehyd (96%)	(-)-Epikatechin (≥90%)	Kys. <i>m</i> -kumarová (99%)
Vanilin (99%)	Hesperetin (95%)	Kys. <i>p</i> -kumarová (≥98%)
Protokatechový aldehyd (≥97%)	(+)-Katechin (≥97%)	Kys. protokatechová (≥97%)
Syringaldehyd (98%)	Kvercetin (99%)	Kys. salicylová (≥99%)
<u>Alkylfenoly</u>	Myricetin (≥96%)	Kys. sinapová (AS)
4-methylkatechol (≥95%)	(+)-Naringenin (95%)	Kys. syringová (≥98%)
4-ethylkatechol (95%)	Naringin (≥95%)	Kys. vanilová (≥97%)
4-vinylfenol (10% v PG)	Taxifolin (AS)	Kys. veratrová (≥99%)
<u>Benzotrioly</u>	Rutin (90 %)	<u>Fenyletanoidy</u>
Pyrogallol (AS)	<u>Methoxybenzeny</u>	Tyrosol (AS)
<u>Kumariny</u>	Homovanilyl alkohol (99%)	<u>Stilbenoidy</u>
4-hydroxykumarin (98%)	Koniferyl alkohol (AS)	Resveratrol (≥99%)
Skopoletin (AS)	Vanilyl methyl keton (96%)	
Eskulin (>97%)	<u>Fenolické kyseliny</u>	

Eskuletin (98%)	Kys. <i>p</i> -hydroxybenzoová (99%)	
<u>Estery</u>	Kys. ferulová (99%)	<u>Příbuzné sloučeniny</u>
Ethyl galát (≥96%)	Kys. galová (≥98%)	Kys. <i>trans</i> -skořicová (≥99%)
Ethylester kys. kávové (N)	Kys. gentisová (AS)	Tryptofol (97%)
Ethyl vanilát (AS)	Kys. homovanilová (AS)	

Význam zkratk pro čistoty některých standardních látek: AS – analytický standard, N – neuváděno, PG – polyethylen glykol.

2.2.2 HPLC-MS/MS analýza

Pro separaci fenolických sloučenin byl využit HPLC systém Agilent 1260 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Separace byly uskutečněny na koloně Luna Omega Polar C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) o rozměrech 150 × 3 mm a s velikostí částic 3 μm. Byla použita gradientová eluce analytů s mobilními fázemi A (voda + 0,1 % (v/v) kyseliny octové) a B (acetonitril + 0,1 % (v/v) kyseliny octové). Čistota a původ použitých chemikálií odpovídá kapitole 1.3.3, vyjma čistoty acetonitrilu, který byl určen pro LC-MS aplikace. Gradientový profil finální metody byl následující: 0 min – 15 % B; 12 min – 51 % B; 12.01 min – 100 % B; 14 min – 100 % B. Po ukončení analýzy proběhlo ustálení podmínek na počáteční hodnoty 15 % B po dobu 4 minut. Separace probíhali při teplotě 40 °C, průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min a dávkovaný objem činil 3 μl.

Pro detekci látek byl LC systém připojen k hmotnostnímu spektrometru QTrap 4500 od firmy AB Sciex LLC (Framingham, MA, USA). Ionizace fenolických sloučenin byla uskutečněna elektrosprejem v negativním módu. Záznam analýzy probíhal v módu MRM (sledování mnoha reakcí) s optimalizovanými parametry DP (deklastrační potenciál), CE (kolizní energie) a CXP (výstupní potenciál kolizní cely). Záznam každého MRM přechodu probíhal po dobu 90 sekund (tzv. schedule mód).

Zásobní roztoky fenolických sloučenin o koncentraci 1 mg/ml byly připraveny navážením příslušného množství na analytických vahách (SARTORIUS, Ústí nad Labem, Česká republika) a rozpuštěním v metanolu (čistota LC-MS) od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3 VÝSLEDKY A DISKUZE

2.3.1 Optimalizace podmínek MS/MS detekce

Vzhledem ke složitosti rostlinných materiálů byla pro detekci látek zvolena technika MS/MS v MRM módu, která vykazovala vysokou selektivitu pro sledované analyty. Hmotnostní spektrometr QTrap 4500 využíval tři za sebou seřazených kvadrupólů (Q-q-Q uspořádání), přičemž prvním kvadrupólem byly vybrány ionty s definovanou hodnotou m/z (prekurzorový iont), které byly následně vedeny do druhého kvadrupólu (tzv. kolizní cely), kde byly rozštěpeny a vybrané produktové ionty byly izolovány třetím kvadrupólem, odkud byly vedeny k detekci.

Samotná optimalizace probíhala v módu přímého nástřiku při průtoku 7 $\mu\text{l}/\text{min}$. Každá látka byla podrobena optimalizaci individuálně. Jako rozpouštědlo byla použita směs acetonitrilu a vody v objemovém poměru 1:1 a výchozí koncentrace každého standardu byla 0,1 mg/l. V případě příliš nízké či vysoké odezvy byla koncentrace upravena na přijatelnější hodnoty. Mezi optimalizacemi jednotlivých látek byl hmotnostní spektrometr promýván metanolem při průtoku 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ po dobu 15 minut.

Výstupem optimalizace pro detekci fenolických sloučenin byly konkrétní hodnoty prekurzorových a produktových iontů (tzv. MRM přechody) a dále hodnoty parametrů DP, CE a CXP (příloha 10). Přechody s nejvyšší intenzitou byly vybrány jako tzv. kvantifikátory *QT* (určené pro kvantitativní analýzu), MRM přechody s druhou nejvyšší intenzitou byly vybrány jako tzv. kvalifikátory *QL* (určené pro ověření identifikace látky). Nicméně při optimalizaci podmínek HPLC separace bylo zjištěno, že *QL* pro některé látky vykazovaly při spojení HPLC-MS/MS nulovou odezvu a v takovém případě byla identifikace látek založena pouze na *QT* a shodném retenčním času píku standardu a píku v reálném vzorku.

2.3.2 Optimalizace podmínek HPLC separace

2.3.2.1 Volba chromatografického systému

Na základě dostupných zdrojů [44][45][46][47][48] byla pro separace fenolických sloučenin zvolena technika kapalinové chromatografie v módu reverzních fází s gradientovou elucí. Jako mobilní fáze A byla použita deionizovaná voda a jako organická složka B byl zvolen acetonitril. Pro zabránění ionizace fenolických kyselin byly obě složky mobilní fáze okyseleny přísadkou 0,1 % (v/v) kyseliny octové. Na základě kapitoly 1.4.4.2 byla pro separaci fenolických látek vybrána kolona Luna Omega Polar C18, jelikož vykazovala

přijatelné hodnoty retence, selektivity a píkových symetrií (vyjma eskuletinu). Zároveň při průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min dosahovala (spolu s kolonou ACE 3 C18-PFP) nejnižších hodnot výškového ekvivalentu teoretického patra pro propylbenzen.

2.3.2.2 Volba teploty, průtoku a dávkovaného objemu

Prakticky veškeré LC separace probíhají při konstantní teplotě, jelikož teplota má vliv na retenci a selektivitu látek. U většiny C18 kolon lze provádět separace až do teploty 60 °C (při vyšších teplotách již dochází k degradaci stacionární fáze), v praxi jsou však nejčastěji používány (pro prodloužení životnosti kolony) teploty v rozmezí 25 – 40 °C. Při použití vyšší teploty je dosaženo urychlení analýz, zisku užších píků a v neposlední řadě také nižších zpětných tlaků systému. Proto byla pro separaci fenolických látek v této práci zvolena teplota 40 °C.

Použitý průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, ačkoliv z kapitoly 1.4.4.1 je patrné, že nejvyšší účinnosti pro fenolické sloučeniny je dosaženo při průtocích okolo 0,1 – 0,2 ml/min. Takto nízké průtoky však vedou k citelnému prodloužení analýz, což je v rozporu s jedním z požadavků pro finální metodu. V případě alkylbenzenů bylo v oblasti průtoků 0,5 ml/min dosaženo minim $H - u$ křivek a tudíž lze předpokladat, že při tomto průtoku bylo dosaženo uspokojivých kinetických aspektů separace.

Dávkovaný objem byl na počátku tvorby metody zvolen 3 μ l a tento objem byl zachován až do finální podoby metody. V případě potřeby snížení detekčních limitů by bylo možné použít vyšší objem dávkování, pravděpodobně za cenu zhoršení separace vlivem rozšiřování elučních zón.

2.3.2.3 Optimalizace gradientového profilu

Spojení LC-MS/MS přináší nezměrnou výhodu v možnosti spolehlivě identifikovat a kvantifikovat látky, které nejsou rozděleny v průběhu separace na chromatografické koloně. Z tohoto důvodu nebylo nutné dosáhnout během optimalizace profilu gradientové eluce separace všech 48 standardů fenolických sloučenin, ale pouze kritických dvojic, což byly látky se stejnými prekurzorovými a produktovými ionty. Pokud dvě látky měly stejný prekurzorový iont (stejnou molekulovou hmotnost), ale zcela odlišné byly produktové ionty, bylo možné tyto látky stanovit i v případě, že byly jejich retenční časy stejné. Jako kritické dvojice (tabulka 10) byly identifikovány: kyselina *p*-hydroxybenzoová – kyselina salicylová; vanilyl methyl keton – koniferyl alkohol; kvercetin – hesperetin; tyrosol – protocatechový

aldehyd; katechin – epikatechin; kyselina gentisová – kyselina protokatechová;
kyselina *m*-kumarová – kyselina *p*-kumarová; kyselina veratrová – kyselina homovanilová.

Tabulka 10: Rozlišení *R* vybraných kritických dvojic fenolických látek získané analýzami při třech různých profilech gradientové eluce ($n = 3$).

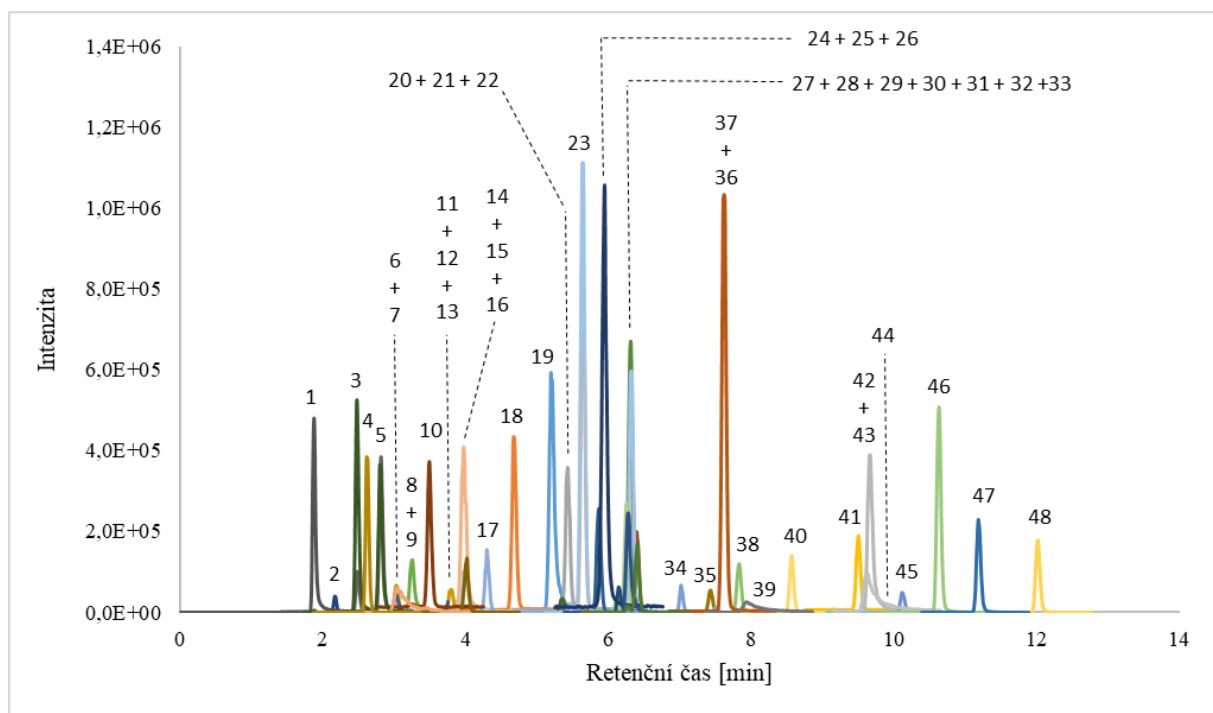
Název sloučeniny	<i>R</i> (gradient 1)	<i>R</i> (gradient 2)	<i>R</i> (gradient 3)
Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	4.17	9.26	9.12
Kyselina salicylová			
Vanilyl methyl keton	1.61	1.77	1.44
Koniferyl alkohol			
Kvercetin	1.93	2.34	1.76
Hesperetin			
Tyrosol	0.14	0.15	0.11
Protokatechuový aldehyd			
Katechin	3.68	3.15	4.60
Epikatechin			
Kyselina gentisová	0.91	1.33	1.07
Kyselina protokatechuová			
Kyselina <i>m</i> -kumarová	2.48	2.98	2.76
Kyselina <i>p</i> -kumarová			
Kyselina veratrová	10.74	11.32	10.97
Kyselina homovanilová			
Celkový produkt rozlišení*	161	813	379

*celkový produkt rozlišení vypočítán jako součin rozlišení všech kritických dvojic v rámci daného gradientu

Bylo připraveno celkem 5 HPLC vialek (směsí o koncentraci 1 mg/l), kdy každá vialka obsahovala přibližně 10 standardů fenolických látek, přičemž kritické dvojice a látky s velmi blízkou molekulovou hmotností byly cíleně umístěny do odlišných vialek. Byl vytvořen prvotní profil gradientové eluce: 0 min – 3 % B; 15 min – 60 % B (gradient 1) a byly provedeny analýzy jednotlivých směsí (příloha 11). Na základě těchto analýz bylo zjištěno relativně uspokojivé rozdělení kritických dvojic (vyjma dvojice tyrosol – protokatechuový aldehyd) avšak většina látek eluovala mezi 8. a 14. minutou. Aby bylo využito „prázdných“ míst především na počátku chromatogramu, byl gradientový profil upraven následovně: 0 min – 15 % B, 15 min – 60 % B (gradient 2). Tímto došlo k efektivnějšímu využití volného místa v chromatogramu, jelikož většina látek eluovala mezi 2. a 10. minutou a zároveň došlo ke zkrácení doby celé analýzy. Dodatečně byl testován gradientový profil: 0 min – 7 % B, 15 min – 75 % B (gradient 3). Výsledkem těchto analýz bylo zhoršené využití volného místa v chromatogramu za cenu jen velmi mírného urychlení separace (příloha 12).

Z tabulky 10 je patrné, že ani v jednom z testovaných gradientů nedošlo k rozdělení dvojice tyrosol – protokatechový aldehyd. Tato dvojice má přitom velmi blízké kvantifikační MRM přechody (137/106 resp. 137/108), což může být problematické u hmotnostních spektrometrů s nízkým rozlišením. Proto byl každý tento standard změřen individuálně (gradientem 3) při záznamu MRM přechodů těchto dvou látek. Z těchto analýz bylo zjištěno, že obě látky sdílí pouze kvalifikační MRM přechod tyrosolu (137/119), což je třeba brát v úvahu při identifikaci sloučenin v reálných vzorcích.

Vzhledem k dobrému rozdělení kritických dvojic a vysokému celkovému produktu rozlišení, využití relativně celého prostoru chromatogramu a uspokojivému retenčnímu času poslední eluované látky (7-hydroxyflavon – 12,01 min) byl gradient 2 zvolen jako finální profil gradientové eluce (obrázek 8). Metoda byla zkrácena (byla zachována strmost gradientu 2) a upravena do finální podoby: 0 min – 15 % B, 12 min – 51 % B, 12,01 min – 100 % B, 14 min – 100 % B. Přidání kroku se 100 % mobilní fází B po dobu 2 minut sloužilo pro eluci silně zadržovaných látek v případě reálných vzorků a podle potřeby tento čas může být prodloužen nebo zkrácen. Záznam každého MRM přechodu probíhal pouze po určitou dobu (tzv. schedule mód) v oblasti elučního času píku dané látky.



Obrázek 8: Chromatogram analýzy 48 fenolických sloučenin (koncentrace 0,1 mg/l, schedule mód) za podmínek finálního gradientu 2 při záznamu pouze kvantifikačních MRM přechodů. Označení látek – 1 – kyselina galová; 2 – pyrogallol; 3 – kyselina protokatechová; 4 – eskulin; 5 – kyselina gentisová; 6 – katechin; 7 – kyselina chlorgenová; 8 – tyrosol; 9 – protokatechový aldehyd; 10 – kyselina p-hydroxybenzoová; 11 – homovanilyl alkohol; 12 – epikatechin; 13 – kyselina

homovanilová; 14 – eskuletin; 15 – kyselina kávová; 16 – kyselina vanilová; 17 – kyselina syringová; 18 – 4-hydroxybenzaldehyd; 19 – ethyl galát; 20 – koniferyl alkohol; 21 – 4-methylkatechol; 22 – vanilin; 23 – kyselina p-kumarová; 24 – vanilyl methyl keton; 25 – syringaldehyd; 26 – kyselina salicylová; 27 – rutin; 28 – kyselina ferulová; 29 – taxifolin; 30 – skopoletin; 31 – kyselina m-kumarová; 32 – kyselina sinapová; 33 – kyselina veratrová; 34 – naringin; 35 – koniferyl aldehyd; 36 – tryptofol; 37 – 4-hydroxykumarin; 38 – 4-ethylkatechol; 39 – myricetin; 40 – resveratrol; 41 – kyselina trans-skořicová; 42 – kvercetin; 43 – ethylester kyseliny kávové; 44 – 4-vinylfenol; 45 – ethyl vanilát; 46 – naringenin; 47 – hesperetin; 48 – 7-hydroxyflavon.

2.3.3 Validace HPLC-MS/MS metody

Vytvořená metoda byla podrobena validačním zkouškám pro ověření správnosti, opakovatelnosti, pracovního rozsahu, linearitu a limitů detekce a kvantifikace. Dosažené výsledky byly porovnány s vybranými publikacemi, které se zabývají LC-MS/MS stanovením fenolických látek. První takovou studii uskutečnil Jun-Ge Song a kol. [49], kteří vytvořili HPLC-MS/MS metodu pro analýzu 12 fenolických sloučenin v řepkovém oleji za využití QuEChERS (rychlá, jednoduchá, nízkonákladová, efektivní, robustní a bezpečná) extrakce. Myrtsi a kol. [50] metodu HPLC-MS/MS použili pro kvantitativní analýzu 32 fenolických látek v hroznech a vinných produktech. Pro úpravu vzorků využili techniku extrakce v ultrazvukové lázni. Třetí z porovnávaných studií byla provedena Barnabou a kol. [51], kteří pro úpravu vzorku zvolili online SPE (extrakce pevnou fází) extrakční metodu a vytvořenou UHPLC-MS/MS metodou analyzovali celkem 56 různých fenolických sloučenin.

2.3.3.1 Správnost

Správnost metody vyjadřuje shodu mezi experimentálně zjištěnou koncentrací látky a její referenční hodnotou [52]. Pro ověření správnosti byly připraveny tři směsi standardních roztoků fenolických sloučenin na odlišných koncentračních úrovních – nízká (0,01 mg/l), střední (0,05 mg/l) a vysoká (0,3 mg/l). Správnost byla vyhodnocena pomocí rovnice 7 na základě kalibračních křivek v rozmezí linearitu, jak je uvedeno v tabulce 11.

$$\text{Správnost [\%]} = \frac{c_{kal.}}{c_{ref.}} \times 100$$

Rovnice 7: Výpočet správnosti metody ($c_{kal.}$ – koncentrace látky zjištěná z kalibrační křivky; $c_{teor.}$ – referenční hodnota koncentrace látky)

Z tabulky 11 vyplývá, že správnost metody dosahovala velmi uspokojivých výsledků na střední a vysoké koncentrační úrovni. Průměrná správnost na střední koncentrační úrovni činila 100,74 % v intervalu 90,16 – 108,79 %. V případě vysoké koncentrační úrovně byla průměrná správnost 102,18 % a interval hodnoty byl 98,68 – 105,35 %. Zhoršené správnosti bylo dosaženo v případě nízké koncentrační úrovně, kdy průměr správností byl 76,19 %

a hodnoty se pohybovaly v intervalu 44,2 – 110,11 %. Pro dosažení lepších výsledků správnosti na této koncentrační úrovni by bylo zapotřebí snížit pracovní rozsah metody, což by vedlo ke snížení univerzálnosti metody.

Porovnávané studie dosahovaly na středních koncentračních hladinách (2 mg/kg; 0,3 mg/l a 1 mg/l) průměrných správností 90,1; 90,9 a 96,6 % při intervalech 74,5 – 103,9; 73,4 – 121,9 a 73 – 116 %. Správnosti u zmíněných studií byly získány na základě návratnosti standardních přídávků ke konkrétní matici vzorku, což může být příčinou relativně horších výsledků v porovnání s hodnotami v této práci [49][50][51].

2.3.3.2 Opakovatelnost

Přesnost metody charakterizuje rozložení náhodných chyb jednotlivých analýz za konkrétních podmínek měření [52]. Přesnost metody byla zjišťována jako opakovatelnost získaných dat v rámci jednoho dne, tzv. intradenní opakovatelnost (počet analýz $n = 7$) a ve třech dnech jdoucích po sobě, tzv. mezidenní opakovatelnost (počet analýz $n = 3 \times 6$). Opakovatelnost, resp. relativní směrodatná odchylka *RSD*, byla vypočítána na základě rovnice 8 a při koncentracích látek ve směsi 0,1 mg/l.

$$RSD [\%] = \frac{100 \times S}{\bar{P}}$$

Rovnice 8: Výpočet opakovatelnosti metody (S – směrodatná odchylka ploch píků, \bar{P} – průměr ploch píků).

Průměrná relativní směrodatná odchylka intradenní opakovatelnosti činila 2,03 %. Hodnoty *RSD* větší než 5 % v případě intradenní opakovatelnosti byly zjištěny pouze u myricetinu. Průměrná hodnota *RSD* mezidenní opakovatelnosti byla zjištěna 3,37 %. Pro myricetin a homovanilyl alkohol byly hodnoty *RSD* větší než 10 % a kvantifikace těchto sloučenin v rámci několika dnů by mohla být zatížena menší či větší chybou se značnou směrodatnou odchylkou výsledků. Lze konstatovat, že metoda dosahuje dobrých intradenních i mezidenních opakovatelností, vyjma myricetinu, pro jehož zlepšení hodnot *RSD* lze využít vnitřního standardu (látku s podobnou strukturou a retečním chováním), který by korigoval výchylky odezvy hmotnostního spektrometru.

Průměrné mezidenní *RSD* v porovnávaných studiích dosahovaly na daných koncentračních úrovních (2 mg/kg; 0,25 mg/l a 0,1 mg/l) hodnot 8,1 a 5,6 %. Barnaba a kol. uvádí, že velikost mezidenní *RSD* byla u všech látek menší než 10 % [49][50][51].

2.3.3.3 Limity detekce a kvantifikace

Limity detekce LOD a limity kvantifikace LOQ jednotlivých látek byly vypočítány na základě kalibračních křivek a velikosti šumu odezvy detektoru podle rovnic 9 a 10. Tyto limity určují, od jakých koncentračních úrovní je možné spolehlivě identifikovat, resp. kvantifikovat danou látku [52].

$$LOD = \frac{3 \times h_n}{m}$$

Rovnice 9: Výpočet limitu detekce metody (h_n – velikost šumu detektoru pro konkrétní MRM přechod, m – směrnice kalibrační křivky dané látky).

$$LOQ = \frac{10 \times h_n}{m}$$

Rovnice 10: Výpočet limitu kvantifikace metody (h_n – velikost šumu detektoru pro konkrétní MRM přechod, m – směrnice kalibrační křivky dané látky).

Limity detekce, resp. limity kvantifikace se pohybovaly v rozmezí 0,06 – 40,45 $\mu\text{g/l}$, resp. 0,21 – 134,84 $\mu\text{g/l}$. Průměrný limit detekce byl zjištěn 1,69 $\mu\text{g/l}$ a průměrný limit kvantifikace byl 5,63 $\mu\text{g/l}$, což lze považovat za velmi uspokojivé a dostatečné pro spolehlivou identifikaci a kvantifikaci majoritních, ale i méně významných fenolických látek v rostlinných matricích.

Průměrné limity kvantifikace u srovnávacích studií činily 51,1; 144 a 13 $\mu\text{g/l}$. Hodnoty LOQ se pohybovaly v rozmezí 7 – 267; 22,6 – 479,8 a 0,1 – 117 $\mu\text{g/l}$. Nejlepších výsledků tak dosahovala studie provedená Barnabou a kol., jejichž limity kvantifikace jsou srovnatelné s hodnotami LOQ v této práci [49][50][51].

2.3.3.4 Linearita a pracovní rozsah

Kalibrační křivka každé látky byla dále využita pro určení rozmezí linearity, tedy pracovního rozsahu koncentrací, při kterém je nejistota měření v přijatelných mezích [52]. Rozmezí linearity bylo určeno v co nejširším možném koncentračním rozsahu při zachování vysokých hodnot koeficientů determinace R^2 , resp. linearity metody.

Za uspokojivé lze považovat i hodnoty pracovních rozsahů (a jejich odpovídající linearity), které se pohybovaly v rozmezí 0,001 – 1 mg/l , přičemž teoretická spodní hodnota daného intervalu by mohla být rozšířena až ke konkrétním hodnotám LOQ dané látky. Linearita metody se pohybovala v rozmezí 0,9970 – 0,9996, přičemž průměrná hodnota byla 0,9988.

Srovnávací studie dosahovaly průměrných linearit 0,9948 a 0,9996 v rozmezí hodnot 0,9902 – 0,9984 a 0,9988 – 0,9999. Barnaba a kol. ve své práci neuvádí konkrétní hodnoty linearit pro jednotlivé látky. Nicméně uvádí, že pro většinu látek byla zjištěná linearita větší než 0,9900 (v případě pěti fenolických látek byla linearita nižší než 0,9900) [49][50][51].

2.4 SHRNU TÍ

Ve druhé experimentální části byla vyvinuta HPLC-MS/MS metoda pro analýzu 48 fenolických sloučenin, včetně zástupců flavonoidů, fenolických kyselin a aldehydů. Byly optimalizovány podmínky detekce a dále byly stanoveny podmínky separace, pro dosažení dobrého rozlišení kritických dvojic látek při zachování relativně krátké doby jedné analýzy. Metoda byla dále validována v rámci správnosti, opakovatelnosti, linearity, rozmezí linearity a limitů detekce a kvantifikace. Dosažené výsledky byly porovnány s třemi publikovanými pracemi z oblasti HPLC-MS/MS stanovení fenolických sloučenin. Vyvinutá metoda bude sloužit jako efektivní nástroj pro rychlou a spolehlivou analýzu látek i s minoritním zastoupením v přírodních matricích.

Tabulka 11: Výsledky validace metody HPLC-MS/MS pro stanovení 48 fenolických sloučenin.

Název sloučeniny	Správnost nízká [%] (0,01 mg/L)	Správnost střední [%] (0,05 mg/L)	Správnost vysoká [%] (0,3 mg/L)	Opakovatelnost Den 1 [%] (0,1 mg/L)	Opakovatelnost Den 1 – 3 [%] (0,1 mg/L)	Linearita	Rozmezí linearity [mg/L]	Limit detekce [µg/L]	Limit kvantifikace [µg/L]
4-ethylcatechol	88,34	99,69	102,08	0,77	0,81	0,9996	0,001–1	0,32	1,05
4-hydroxybenzaldehyd	49,52	102,24	103,87	0,99	3,12	0,9983	0,005–0,5	1,18	3,94
4-hydroxykumarin	77,95	108,67	98,68	0,64	2,23	0,9972	0,001–0,3	0,07	0,24
4-methylcatechol	83,31	97,54	101,92	1,24	1,37	0,9996	0,005–0,5	0,90	3,00
4-vinylfenol	71,23	90,16	101,75	4,23	4,66	0,9986	0,005–0,5	1,18	3,92
7-hydroxyflavon	51,29	104,68	105,35	0,53	0,95	0,9970	0,001–0,5	0,13	0,42
Epikatechin	87,23	96,48	101,62	2,01	2,71	0,9994	0,005–0,5	1,53	5,11
Eskuletin	57,88	106,38	104,23	2,01	1,88	0,9979	0,001–0,5	0,54	1,79
Eskulin	75,23	102,17	101,89	2,51	2,02	0,9990	0,001–0,5	0,06	0,21
Ethyl galát	84,07	105,43	99,02	1,14	1,89	0,9984	0,001–0,3	0,12	0,41
Ethyl vanilát	55,09	94,87	103,69	2,44	2,52	0,9993	0,001–1	0,85	2,83
Ethylester kys, kávové	85,32	105,15	99,13	0,87	0,79	0,9988	0,001–0,3	0,19	0,62
Hesperetin	75,78	101,45	102,81	0,69	0,92	0,9992	0,001–0,5	0,09	0,31
Homovanilyl alkohol	-	-	104,52	4,57	10,65	0,9973	0,1–1	40,5	134,8
Katechin	64,53	99,07	103,13	2,44	3,24	0,9983	0,005–0,5	1,36	4,53
Koniferyl aldehyd	78,52	100,52	103,28	0,94	1,58	0,9990	0,001–0,5	0,96	3,20
Koniferyl alkohol	66,51	99,02	102,56	2,19	2,94	0,9982	0,005–0,5	2,36	7,85
Kvercetin	78,13	103,10	102,59	2,80	8,79	0,9990	0,001–0,5	0,53	1,76
Kys, p-hydroxybenzoová	75,85	98,71	101,43	1,99	2,07	0,9993	0,005–0,5	1,44	4,80
Kys, ferulová	80,75	101,65	103,15	2,69	2,97	0,9990	0,001–0,5	0,18	0,60
Kys, galová	105,17	101,95	-	1,08	2,46	0,9993	0,001–0,1	0,15	0,48
Kys, gentisová	90,15	98,95	100,99	1,96	1,85	0,9992	0,001–0,5	0,11	0,36
Kys, homovanilová	81,01	99,65	101,86	2,54	2,34	0,9995	0,005–0,5	2,04	6,80
Kys, chlorgenová	79,28	101,04	102,89	1,16	1,63	0,9992	0,001–0,5	0,59	1,98
Kys, kávová	79,37	108,79	98,83	1,25	1,37	0,9977	0,001–0,3	0,24	0,80

LC-MS/MS stanovení fenolických sloučenin

Kys, <i>m</i>-kumarová	70,88	102,18	103,36	2,04	2,00	0,9988	0,001–0,5	0,41	1,37
Kys, <i>p</i>-kumarová	66,63	104,30	102,24	3,13	2,46	0,9986	0,001–0,5	0,20	0,68
Kys, protokatechová	59,20	106,28	104,21	1,10	1,35	0,9975	0,001–0,5	0,19	0,63
Kys, salicylová	77,96	97,91	102,82	1,21	2,14	0,9988	0,005–0,5	0,75	2,51
Kys, sinapová	78,75	99,54	102,35	1,84	1,98	0,9991	0,001–0,5	0,19	0,64
Kys, syringová	90,07	100,53	99,92	1,40	1,69	0,9997	0,001–0,5	0,31	1,04
Kys, <i>trans</i>-skořicová	90,32	98,99	102,20	1,71	2,16	0,9996	0,001–0,5	0,57	1,89
Kys, vanilová	69,23	99,05	102,63	2,12	2,10	0,9988	0,005–0,5	1,57	5,24
Kys, veratrová	66,40	98,13	103,05	2,56	2,30	0,9990	0,005–0,5	0,57	1,91
Myricetin	110,11	89,39	103,41	7,55	38,26	0,9990	0,005–1	0,93	3,11
Naringenin	69,12	104,20	103,09	0,48	0,54	0,9988	0,001–0,5	0,09	0,31
Naringin	91,16	97,79	102,09	2,33	2,52	0,9995	0,001–0,5	0,41	1,35
Protokatechový aldehyd	44,20	103,35	103,04	2,52	2,55	0,9984	0,005–0,5	0,91	3,02
Pyrogallol	52,30	102,78	102,92	2,09	6,56	0,9988	0,005–0,5	0,63	2,11
Resveratrol	90,23	98,46	101,54	0,87	1,11	0,9996	0,001–0,5	0,21	0,71
Rutin	77,32	96,71	103,84	4,33	4,10	0,9988	0,001–1	0,69	2,31
Skopoletin	84,81	106,18	99,20	1,51	1,94	0,9989	0,001–0,3	0,30	0,98
Syringaldehyd	89,53	99,42	101,46	2,22	3,25	0,9997	0,001–0,5	0,67	2,22
Taxifolin	52,22	108,24	103,85	2,23	2,40	0,9973	0,001–0,5	0,49	1,62
Tryptofol	82,10	97,52	102,38	1,90	3,06	0,9993	0,005–0,5	1,12	3,73
Tyrosol	66,47	99,38	98,91	2,25	3,20	0,9988	0,01–0,5	3,32	11,1
Vanilin	69,53	98,31	103,90	1,63	3,30	0,9987	0,005–0,5	1,77	5,90
Vanilyl methyl keton	105,75	98,71	98,97	2,88	3,05	0,9993	0,01–0,5	7,21	24,0

3 FENOLICKÝ PROFIL RŮZNÝCH TYPŮ OCTA

3.1 OCET

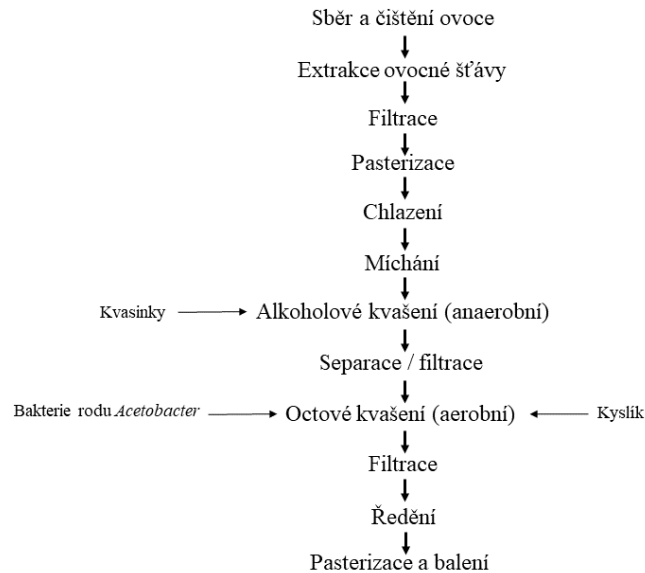
Ocet lze považovat za tradiční potravinářský produkt, jehož historie sahá až do období 3 000 let př. n. l. Je velmi dobře známo, že působením kvasinek na cukry přítomné v rostlinných plodech dochází k tzv. alkoholovému kvašení, tedy přeměně cukrů na etanol a oxid uhličitý. Tento proces dal vzniku alkoholovým nápojům, které jsou populární po celém světě a stávají se nedílnou součástí každé společenské události. Pakliže se do alkoholu dostanou bakterie rodu *Acetobacter*, dojde k jeho oxidaci na kyselinu octovou. Tento proces se nazývá octové kvašení, které chemickou rovnicí poprvé popsal německý chemik J. W. Döbereiner ve dvacátých letech 19. století [53].

Významné světové organizace používají pro ocet různé definice, nicméně obvykle se shodují, že ocet vzniká dvojitým kvašením rostlinných produktů zemědělského původu, je určený pro lidskou spotřebu a obsahuje nejméně 4 % kyseliny octové [54][55][56]. Ocet nelze považovat za potravinu v pravém slova smyslu, nejedná se ani o nápoj. Spíše jej lze klasifikovat jako dochucovadlo, podobně jako koření. Vzhledem k vysokému obsahu kyseliny octové jej lze použít i jako konzervační činidlo, čehož je využíváno např. při zavařování okurek. Nalézá využití i v kosmetickém průmyslu, medicíně nebo v domácnostech pro odstranění vodního kamene [57].

Výchozí surovinou pro výrobu octa může být prakticky jakýkoliv rostlinný materiál obsahující příslušné sacharidy, které lze kvasinkami přeměnit na etanol. Tradičními surovinami pro výrobu octa jsou jablka, vinná réva, rýže, škroby, pivo, hrušky a různé druhy bobulí od malin po borůvky. Aby byla produkce octů co nejlevnější, používá se obvykle ovoce nižší kvality, vedlejších produktů výroby potravin nebo odpadního rostlinného materiálu. Existují však produkty, u kterých si producenti zakládají na vysoké kvalitě použitých surovin a pro které je používáno specifického procesu výroby, tak aby bylo dosaženo co nejlepších nutričních parametrů, chuti a aroma. K octům mohou být přidána různá aditiva, takové octy jsou označovány jako ochucené a pro tyto účely lze využít česnek, med, skořici, hřebíček, mátu a další byliny [57].

3.1.1 Základní způsoby výroby octa

V zásadě rozlišujeme tři hlavní metody pro výrobu octa (obrázek 9), nicméně existují i další, unikátní způsoby, které jsou specifické např. pro balzamikové octy.



Obrázek 9: Obecné schéma výroby octa. Převzato a upraveno z [58]

Jedním z vůbec nejstarších a nejtradičnějších způsobů výroby octa je povrchová, rovněž známá jako Orleánská metoda, podle místa původu. Výroba může probíhat v sudech o objemu 200 l, přičemž do tohoto sudu je prvně přidán nadbytek octa, k němuž se přidá menší podíl vína (v případě výroby vinných octů). V intervalu jednoho týdne jsou přidávány další přídavky vína a po uplynutí zhruba 4 týdnů může být ze sudu odebrán první podíl octa v objemu odpovídající jednomu přídavku vína. Toto je opakováno každý týden, jedná se tedy o kontinuální proces [59]. Bakterie rodu *Acetobacter* jsou přítomny v podobě biofilmu plovoucího na povrchu obsahu sudu (odtud název povrchová metoda), kde je nejvyšší koncentrace kyslíku [60]. Aby nedošlo k porušení povrchového biofilmu, víno je doplňováno pomocí skleněné trubice, která je zavedena na dno sudu. Výroba probíhá za přístupu vzduchu a při teplotě okolo 29 °C [61].

Hlavní nevýhodou povrchové metody je její nízká rychlost, proto byla vyvinuta metoda rychlého octářství, rovněž známá jako hoblinová technologie nebo generátorová metoda. V případě této metody jsou bakterie imobilizovány na bukových hoblinách, které jsou zachyceny na roštu. Takový systém je umístěn do nádrže, která je následně naplněna např. vínem s přídavkem určitého množství kyseliny octové a výživy pro bakterie. Přístup vzduchu

je zajištěn skrz perforované dno a otvory na bocích nádrže. Celý systém je doplněn chladícím zařízením, jelikož během kvašení vína dochází ke zvýšení teploty, což by mělo za následek usmrcení bakterií. Po uplynutí 10 dní je ocet nahromaděn na dně nádrže, odkud je sbírán k dalšímu zpracování [59][61].

V současnosti nejpoužívanější je submerzní metoda, která na rozdíl od generátorové a povrchové metody využívá bakterií volně rozptýlených v celém objemu kapaliny [62]. Obsah nádrže je míchán za přísunu živin a vzduchu a udržován při teplotě 26 až 38 °C. Takový systém, kterému se říká obvykle „acetátor“, dokáže alkohol přeměnit na ocet během několika hodin [61]

3.1.2 Klasifikace octů

Zatímco na definici octa se jednotlivé světové organizace více či méně shodují, společný pohled na jeho klasifikaci je již do určité míry odlišný, přestože jednotlivá dělení jsou si často velmi podobná. Obvykle se používá dělení na základě výchozí suroviny. FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) rozlišuje 8 základních skupin octů – jablečný cider ocet, vinný ocet, sladový ocet, cukerný ocet, glukózový ocet, lihový ocet, ocet vzniklý mísením lihového a cider octa a ocet vyrobený z jablek [55]. Toto dělení však zcela ignoruje octy vyrobené z dalších ovocných plodů, případně i ze zeleniny a dalších surovin. Logičtější se zdá být členění z pohledu Evropské unie – vinný ocet, ovocný ocet, jablečný cider ocet, lihový ocet, obilný ocet a poslední skupinou jsou ostatní octy, kam patří např. octy syrovátkové, pивní, sladové nebo medové [54].

Objasnění z hlediska klasifikace octa nepřináší, bohužel, ani odborná literatura, ve které jsou často navíc samostatně rozlišovány octy specifické pro konkrétní geografickou oblast. Takové členění lze nalézt v knize „Vinegars of the world“, ve které jsou octy děleny kombinovaně na základě výchozího materiálu a geografického umístění – rýžové octy, sladové a lihové octy, vinné octy, tradiční balzamikové octy, Jerez octy, jablečné cider octy, africké octy, tchajwanské ovocné octy, obilné octy, syrovátkové octy a octy vyrobené z dalšího tropického ovoce [57].

Vzhledem k této rozmanitosti a nesouladu v klasifikaci octů, v této práci bude dále podrobně diskutováno šest základních skupin octa, které jsou běžně dostupné a populární v rámci České republiky – lihové octy, jablečné octy, rýžové octy a různé vinné octy (bílý, červený, balzamikový).

3.1.2.1 Lihové octy

Na otázku „Který ocet je na světě nejpobulárnější?“ lze jen těžko najít jednoznačnou odpověď. Přístup k takovým datům je omezený a dalším faktorem jsou kulturní rozdíly v rámci jednotlivých regionů, tedy balzamický ocet se bude těšit vysoké popularitě v zemích Středozevního moře, rýžový ocet bude zas oblíbený na Dálném východě. V České republice jsou nedílnou součástí každé kuchyně octy lihové, nejsou však k dispozici relevantní data pro zjištění procentuálního podílu tohoto typu octa na tuzemském trhu. V roce 2002 byl podíl lihových octů na celkovém evropském trhu 65 % [57].

Jako výchozí surovina pro výrobu lihového octa se používá rafinovaný líc, který se získává rafinací surového lihu. Surový líc se nejčastěji vyrábí z obilnin, bramborového škrobu nebo melasy, která je odpadním produktem při zpracování cukrové řepy [63][59]. Na základě vyhlášky č. 248/2018 Sb. je kvasný lihový ocet definován jako produkt vyrobený kysáním kvasného lihu pocházejícího ze škrobnatých nebo cukerných surovin. Vyhláška zároveň umožňuje barvení takového octa a jeho použití pro výrobu (resp. ředění) ostatních typů octa (např. ovocných), přičemž množství kyseliny octové pocházející z kvasného lihového octa nesmí v takovém výrobku přesahovat 49 % [64].

Je zakázáno používat k výrobě lihového octa syntetický líc. Byla navržena celá řada indikátorů pro hodnocení autenticity lihového octa. Grégrová a kol. [65] ve své studii uvádí analýzu těkavých látek za využití plynové chromatografie jako dobrou metodu pro odlišení lihových octů z rafinovaného a syntetického lihu, jelikož autentické octy obsahovaly určité množství etanolu a ethylacetátu, což nebylo prokázáno v případě octů vyrobených ze syntetického lihu. Autoři dále uvádí fakt, že hodnocení autenticity lihových octů je ztelně těžší než v případě např. ovocných octů, jelikož rafinovaný líc obsahuje jen velmi malé množství látek charakteristických pro výchozí materiál.

3.1.2.2 Jablečné octy

V literatuře se lze shledat s označením „jablečné octy“, ale také „cider octy“, případně „jablečné cider octy“. Cider je alkoholický nápoj získaný částečnou fermentací šťávy z čerstvých jablek, koncentrátu jablečné šťávy nebo jejich směsí. Na základě dat zveřejněných organizací AIVC (The European Cider and Fruit Wine Association) patří Česká republika mezi nejrychleji rostoucí trhy cider alkoholických nápojů spolu s řadou zemí jihovýchodní Evropy. Cider se těší největší popularitě v západní Evropě, především ve Velké Británii [66].

Z těchto skutečností se lze domnívat, že výraz jablečný cider ocet (nebo pouze cider ocet) je používán především v anglicky mluvících zemích.

V obou případech jsou výchozí surovinou jablka, resp. jablečná šťáva či její koncentrát, ze kterého musí nejprve alkoholovým kvašením vzniknout cider a až poté (octovým kvašením) ocet. Při tradičním způsobu výroby jablečného octa probíhá alkoholové i octové kvašení v jednom a tom samém dřevěném sudu. Vyrobít ocet tradičním způsobem trvá 5 – 6 měsíců, proto se dnes nejčastěji používá submerzní metoda, která celý proces mnohonásobně urychlí [57][67].

Za hlavní bioaktivní sloučeniny v jablečných octech lze označit kyselinu octovou a fenolické sloučeniny. V jablečných octech se dále nachází určité množství organických kyselin (jantarová, askorbová, citronová, mravenčí), pektin, vitamíny skupiny B a malé množství minerálů. Byla hlášena a zkoumána celá řada zdravotních benefitů jablečného octa. Jablečné octy pomáhají snižovat krevní tlak a cholesterol, udržovat rovnováhu pH prostředí organismu, v boji proti cukrovce a obezitě. Antioxidační aktivita tohoto octa může navíc sloužit jako prevence před rozvinutím Alzheimerovy choroby [68][69].

3.1.2.3 Rýžové octy

V jihovýchodní Asii, zejména v Číně, Japonsku a Koreji, jsou velmi populární rýžové octy, které se vyrábí fermentací rýžového vína, známého také jako saké. Na trhu se lze setkat se třemi hlavními typy rýžového octa – bílý (také označován jako jantarový), který se používá zejména ve sladko-slané kuchyni, červený, podávaný s vařenými kraby a černý, který je známý pro své zdravotní benefity. Jednotlivé druhy se liší typem použité rýže, barvou, procesem fermentace, kyselostí a oblíbeností v rámci regionu. Narazit lze i na ocet Kasuzu, který se vyrábí tradiční povrchovou metodou ze saké kalů a je populární v Číně a Japonsku [57][70].

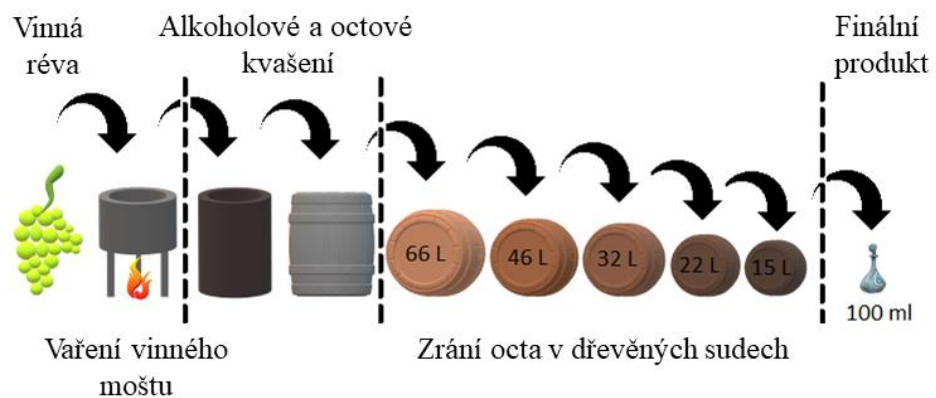
Bílé rýžové octy jsou charakteristické svým jantarovým zabarvením a jsou méně kyselé v porovnání s lihovými octy. Existují určité rozdíly mezi bílými rýžovými octy původem z Číny a Japonska. Čínské octy jsou kyselejší a uplatnění nalézají v přípravě již zmíněných sladko-slaných jídel. Japonské bílé rýžové octy (známé také jako Komesu) jsou typické svojí konzervativnější chutí a jsou vhodné zejména v kombinaci se sushi. Pro alkoholové kvašení je použita bílá (loupaná) rýže, octové kvašení může probíhat povrchovou metodou, která je tradičnější a produkuje vysoce kvalitní octy, nebo rychlejší submerzní metodou [57][71].

Červený rýžový ocet, oblíbený zejména v Číně, je vyráběn z rýže koji a vykazuje až dvojnásobně vyšší kyselost v porovnání s octy bílými a černými. Charakteristické červené zbarvení tohoto octa a výrazná chuť je způsobena plísní *Monascus purpureus*, která je přirozenou součástí rýže koji. Fermentace je tradičně uskutečněna povrchovou metodou, kdy finální produkt může zrát více jak 3 roky [57][72].

Pro výrobu černých rýžových octů (známých jako Kurosu) je používána rýže neloupaná [57], díky čemuž tyto octy obsahují více nutričně prospěšných látek, a proto jejich konzumací lze předejít řadě onemocnění, včetně rakoviny [73][74]. Černé rýžové octy mají charakteristickou tmavou barvu, podobně jako octy balzamikové [71]. Pro jejich produkci se nejčastěji využívá tradiční povrchové metody v keramických nádobách, někteří výrobci však dávají přednost rychlejší submerzní metodě. Tradiční metodou lze získat ocet již po 6 měsících fermentace [57].

3.1.2.4 Vinné octy

Velmi oblíbené v rámci jižní a střední Evropy jsou octy vyrobené z bílého, případně červeného vína. Tradiční povrchový způsob výroby probíhal v dřevěných sudech, v současnosti se vinné octy vyrábí zejména submerzní metodou a pro produkci těch nejkvalitnějších vinných octů jsou používány odrůdy vinné révy Champagne, Sherry nebo Pinot Grigio. Výjimkou jsou balzamikové octy z italské Modeny nebo španělské octy Jerez (známé také jako Sherry), které si zachovávají tradiční způsob výroby a jsou tak označovány jako vysoce kvalitní, čemuž odpovídá i jejich cena [57].



Obrázek 10: Schéma výroby tradičního balzamikového octa z Modeny.

Na počátku 21. století získaly tradiční balzamikové octy od Evropské unie chráněné označení původu, díky kterému produkce octů označených jako „balzamikový ocet z Modeny“ (resp. z Reggio Emilia) a „tradiční balzamikové octy z Modeny“ (resp. z Reggio Emilia) může probíhat pouze v těchto dvou zmíněných italských provinciích a z vinné révy pocházející z těchto provincií [75]. Zároveň jsou kladeny požadavky na způsob výroby takových octů. Výroba balzamikových octů z Modeny spočívá v míchání vinného moštu s vinným octem s možností přídavku karamelu jako barviva. Pravidla pro výrobu tradičních balzamikových octů z Modeny jsou přísnější (obrázek 10) a mimo alkoholové a octové kvašení zahrnují zrání obvykle v 5 – 7 dřevěných sudech z různého typu dřeva po dobu minimálně 12 let. Výsledkem takového procesu je vysoce hustý, tmavý ocet se sladkou, kyselou a ovocnou chutí [76].

Kvalita, chemické složení a fyzikálně-chemické parametry vinných octů závisí na třech hlavních parametrech – na jakosti použité vinné révy, na zvoleném fermentačním systému a na případném zrání v dřevěných sudech. Byla navržena celá řada parametrů, které jsou využívány (nebo mají potenciál využití) pro hodnocení kvality a autenticity vinných octů. K takovým účelům slouží například stanovení obsahu 5-hydroxymethylfurfuralu, chirálních aminokyselin, fenolických sloučenin, polyalkoholů a dalších těkavých sloučenin [77][78].

3.1.2.5 Fenolické látky v octech

Byla provedena celá řada studií (tabulka 12), jejichž předmětem byl obsah fenolických látek v různých typech octa. K tomuto účely byla nejčastěji použita technika kapalinové chromatografie v kombinaci s detekcí diodového pole nebo hmotnostním spektrometrem. Dosavadní práce v tomto oboru jsou obvykle omezeny na konkrétní typ octa a počet sledovaných analytů je ve většině případů relativně nízký. Vyvinuté metody se vzájemně odlišují typem detekce, zvolenou chromatografickou kolonou, resp. mobilní fází, způsobem úpravy vzorku a v neposlední řadě také celkovou dobou jedné analýzy. Největší pozornost byla v minulosti věnována vinným a jablečným octům, naopak existuje jen omezený počet studií charakterizující fenolický profil rýžových a lihových octů.

Tabulka 12: Studie využívající techniku LC pro charakterizaci fenolického profilu různých typů octa.

Typ octa	Kolona	Detekce	Úprava vzorku	Analyty	Ref.
Vinný	Kromasil C18	UV/Vis	Filtrace	Fenolické kyseliny, flavonoly, naringenin (celkem 8 látek)	[79]
Vinný	Eclipse XDB-C18	DAD	Neuveдено	Různé (celkem 19 látek)	[80]
Vinný červený	Acclaim C18	UV/Vis	Filtrace	Fenolické kyseliny	[81]
Vinný a balzamikový	Waters C18	MS/MS	Online - SPE	Různé (celkem 56 látek)	[51]
Vinný a balzamikový	BEH C18	DAD	Neuveдено	Fenolické kyseliny, tyrosol (celkem 7 látek)	[82]
Balzamikový	Atlantis C18	DAD	SPE	Fenolické kyseliny, katechin, vanilin, myricetin (celkem 10 látek)	[83]
Vinný a jablečný	Luna C18	DAD	Filtrace	Fenolické kyseliny, katechin (celkem 6 látek)	[84]
Vinný a jablečný	Hypersil Gold	UV/Vis	Filtrace	Fenolické kyseliny, katechiny, myricetin, rutin (celkem 15 látek)	[85]
Vinný a jablečný	Luna C18	DAD-MS/MS	Filtrace	Různé (celkem 27 látek)	[86]
Jablečný	Nucleosil 100 C18	DAD	Extrakce ultrazvukem	Fenolické kyseliny, naringenin, myricetin (celkem 5 látek)	[87]
Rýžový	Fenylová RP kolona	UV/Vis	Extrakce ethylacetátem	Fenolické kyseliny, katechin, rutin (celkem 11 látek)	[88]
Celkem 15 druhů	Luna C18	DAD	Filtrace	Fenolické kyseliny, katechin (celkem 8 látek)	[89]

Metody využívající pro detekci DAD, případně UV/Vis detektorů jsou charakteristické relativně dlouhou dobou jedné analýzy (až vyšší desíty minut), zatímco separace spojené s hmotnostní detekcí jsou uskutečněny obvykle do dvaceti minut. Spíše, než charakterizaci profilu fenolických látek byla pozornost věnována stanovení celkového obsahu fenolických látek a antioxidační aktivity octů [90][91][92][93][94][95].

3.2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem třetí experimentální části bylo využít vytvořenou HPLC-MS/MS metodu (kapitola 2.2.2) pro charakterizaci a rozlišení různých typů octa na základě jejich profilu fenolických látek. K tomuto účelu bylo vybráno šest základních typů octa, které jsou běžně konzumovány v rámci České republiky – lihový, jablečný, rýžový, vinný bílý, vinný červený a balzamikový.

3.2.1 Vzorky octů

Vzorky octů byly zakoupeny v českých kamenných prodejnách nebo na českých e-shopech. Pro každý typ octa byly zakoupeny 3 až 4 vzorky od různých výrobců.

Lihové

- Gurmen, Ocet kvasný lihový
- K-Classic, Ocet

- Tesco, Ocet

Jablečné

- Benita, Ocet kvasný jablečný
- KAND, Ocet jablečný zlatý
- Bzenecký ocet, Jablečný kvasný

Rýžové

- Pearl River Bridge, Rice vinegar
- Tokyoto, Rice vinegar for sushi
- Heng Shun, Sushi vinegar

Vinné bílé

- De Nigris, White wine vinegar
- K-Classic, Italiano Bianco
- KAND, Ocet vinný bílý
- Bzenecký ocet, Vinný ocet kvasný z bílého vína

Vinné červené

- Casa Rinaldi, Aceto di vino rosso
- Varvello, Aceto di vino rosso
- Bzenecký ocet, Vinný ocet kvasný z červeného vína

Balzamikové

- Mengazzolim, Balzamikový ocet z Modeny IGP BIO
- Cascina San Giovanni, Aceto Balsamico di Modena IGP
- San Fabio, Aceto Balsamico di Modena IGP
- Ophellia, Balzamikový ocet

3.2.2 HPLC-MS/MS analýza

Popis použité HPLC-MS/MS metody, včetně chemikálií a standardů odpovídá kapitole 2.2.2, resp. kapitole 2.2.1. Vzorky octů byly centrifugovány v Eppendorf mikrokumávkách a následně filtrovány skrz PTFE (polytetrafluorethylenový) stříkačkový filtr. Takto upravené vzorky byly skladovány v lednici do doby analýzy.

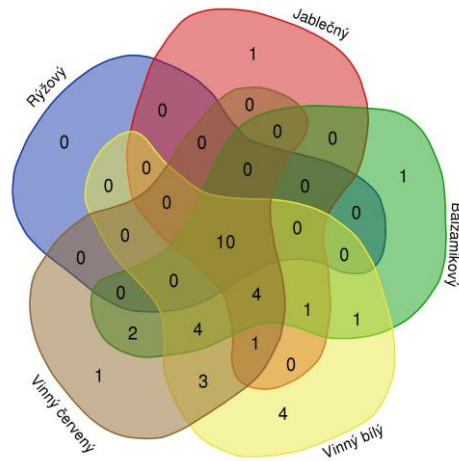
Každý vzorek (dvakrát ředěný deionizovanou vodou) byl nejprve proměřen HPLC-MS/MS metodou při záznamu *QT* a *QL* MRM přechodů. Na základě výsledků těchto analýz byla provedena identifikace látek a bylo zvoleno ředění jednotlivých vzorků. Vinné bílé, rýžové a lihové octy byly ředěny dvakrát, vinné červené, jablečné a balzamikové octy pětkrát. Pro kvantifikaci látek s vysokým obsahem byl každý vzorek dodatečně ředěn stokrát (vyjma octů lihových).

Po identifikaci látek byly z HPLC-MS/MS metody vyřazeny *QL* MRM přechody pro dosažení vyšších intenzit odezvy *QT* MRM přechodů. Aby bylo dosaženo limitace matricových efektů, byl pro kvantitativní analýzu použit přístup standardních přídavek 48 fenolických sloučenin na dvou koncentračních úrovních – 0,01 a 0,1 mg/l pro látky s minoritním obsahem, resp. 0,1 a 0,4 mg/l pro látky s vyšším obsahem. Veškeré vzorky, včetně vzorků se standardními přídávky byly HPLC-MS/MS metodou proměřeny ve třech opakováních.

3.3 VÝSLEDKY A DISKUZE

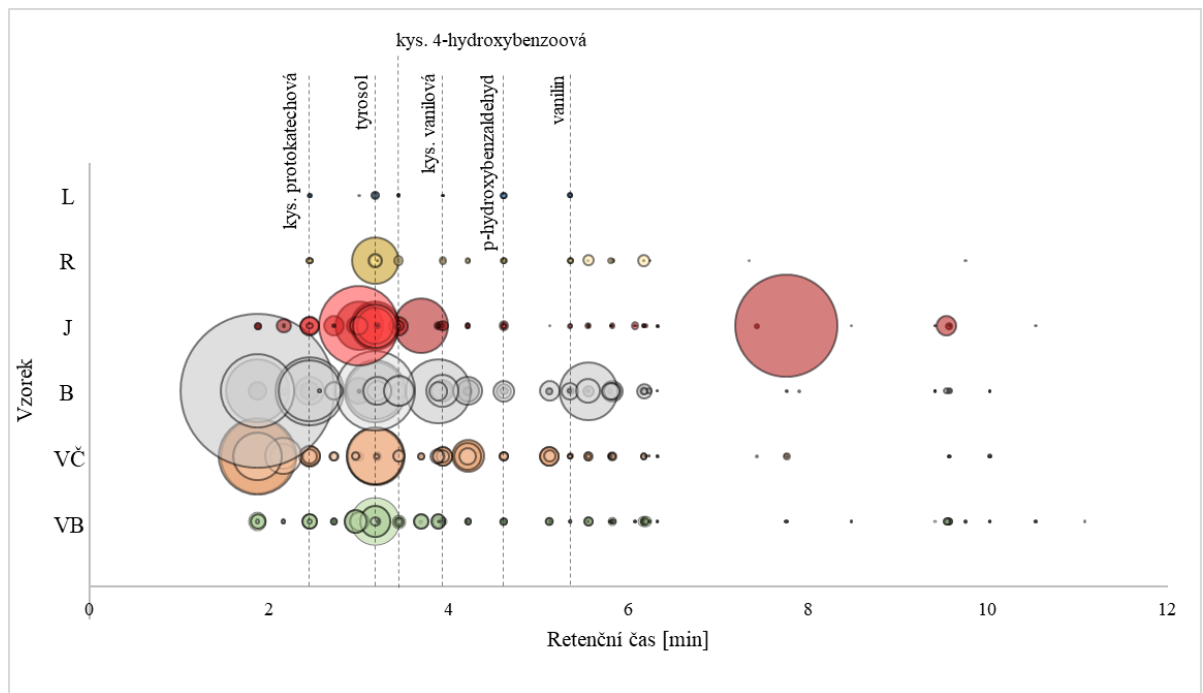
Byly provedeny HPLC-MS/MS analýzy vybraných vzorků octa. Na základě výsledků analýz lze konstatovat, že jednotlivé skupiny octů se od sebe výrazně odlišují zastoupením a množstvím fenolických látek. Nicméně, u všech vzorků byla zjištěna relativně vysoká koncentrace tyrosolu a v rámci daného vzorku patřil tyrosol ve většině případů k látkám s majoritním obsahem. Jeho přítomnost je charakteristická pro potravinářské produkty, které jsou zpracovány alkoholovým kvašením (víno, octy atd.), jelikož k jeho vzniku dochází v rámci Ehrlichovy metabolické dráhy postupnou enzymatickou přeměnou aminokyseliny L-tyrosinu působením kvasinek [96][97]. V rámci jednotlivých skupin byly zjištěny výrazné rozdíly v koncentraci tyrosolu, kdy se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,06 – 23,4 mg/l.

Ve všech typech octa byly dále identifikovány kyselina protokatechová, *p*-hydroxybenzoová, vanilová, *p*-hydroxybenzaldehyd a vanilin (obrázek 12). Tím však výčet společných látek charakteristických pro námi vybrané druhy octů končí, zejména z důvodu malé různorodosti lihových a rýžových octů, kde bylo identifikováno až 7 resp. 19 fenolických látek. Co do počtu bylo nejvíce fenolických látek identifikováno v rámci skupiny jablečných (35) a vinných bílých octů (35), následovaly octy vinné červené (30) a balzamikové (29).



Obrázek 11: Vennův diagram shrnující počet charakteristických látek (látek přítomných alespoň ve třech vzorcích daného typu octa) pro jednotlivé skupiny octů. Vzorky lihových octů nebyly do diagramu zahrnuty vzhledem k jejich nízkému počtu fenolických látek a pro zachování symetrie obrazce.

Z Vennova diagramu (obrázek 11) je patrné, že vyjma rýžových (a lihových) octů existuje alespoň jedna specifická látka pro každou skupinu. Nejvíce specifických látek pak obsahuje skupina vinných bílých octů. Zároveň z diagramu vyplývá, že 10 fenolických látek lze identifikovat v každém typu octa.

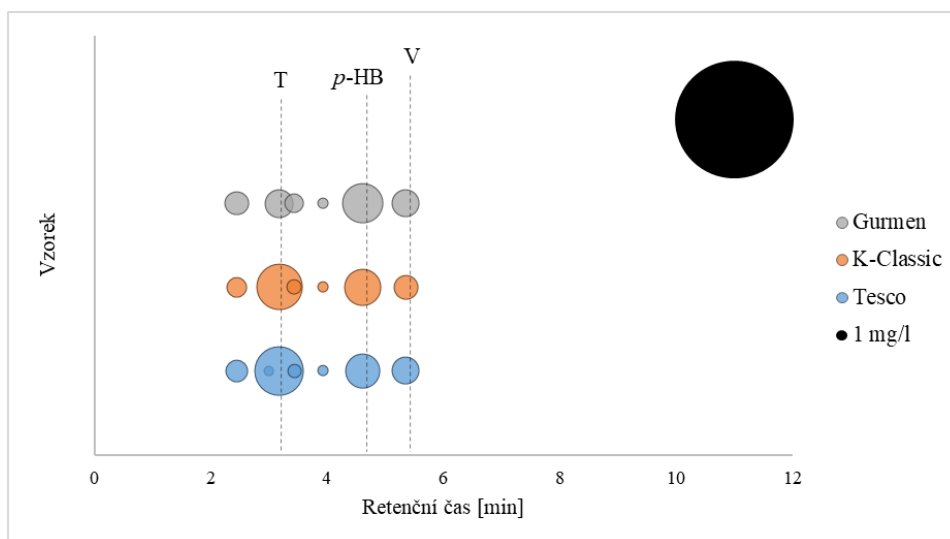


Obrázek 12: Výsledné chromatogramy analýz jednotlivých vzorků octa. Výsledky jsou prezentovány jako bublinový graf, kdy velikost bubliny určuje koncentraci dané látky. Každý řádek představuje konkrétní skupinu octa a zároveň na každém řádku dochází k překryvu 3 – 4 vzorků octa v rámci příslušné skupiny. Význam zkratk: L – lihový; R – rýžový; J – jablečný; B – balzamikový; VČ – vinný červený; VB – vinný bílý ocet.

Z hlediska obsahu fenolických látek dosahovala nejvyšších hodnot skupina balzamikových octů (průměrná celková koncentrace fenolů $\bar{c}_{\text{total}} = 71,1$ mg/l). Následovala skupina octů vinných červených ($\bar{c}_{\text{total}} = 39,6$ mg/l), jablečných ($\bar{c}_{\text{total}} = 38,4$ mg/l) a vinných bílých ($\bar{c}_{\text{total}} = 8,3$ mg/l). Nejnižších hodnot dle očekávání dosahovaly octy rýžové ($\bar{c}_{\text{total}} = 3,8$ mg/l) a lihové ($\bar{c}_{\text{total}} = 0,3$ mg/l).

3.3.1 Octy lihové

Vzhledem ke své charakteristice a způsobu výroby byl předpokládán zanedbatelný či nulový obsah fenolických sloučenin ve vzorcích lihového octa. Díky vysoké citlivosti a nízkým detekčním limitům metody HPLC-MS/MS byla zjištěna přítomnost malého množství vanilinu, tyrosolu, *p*-hydroxybenzaldehydu, kyseliny vanilové, 4-hydroxybenzoové a protokatechové (obrázek 13 a příloha 13). Jeden vzorek navíc obsahoval velmi malé množství kyseliny chlorgenové. V porovnání s ostatními octy jsou lihové octy velmi chudé co do počtu a obsahu fenolických látek.



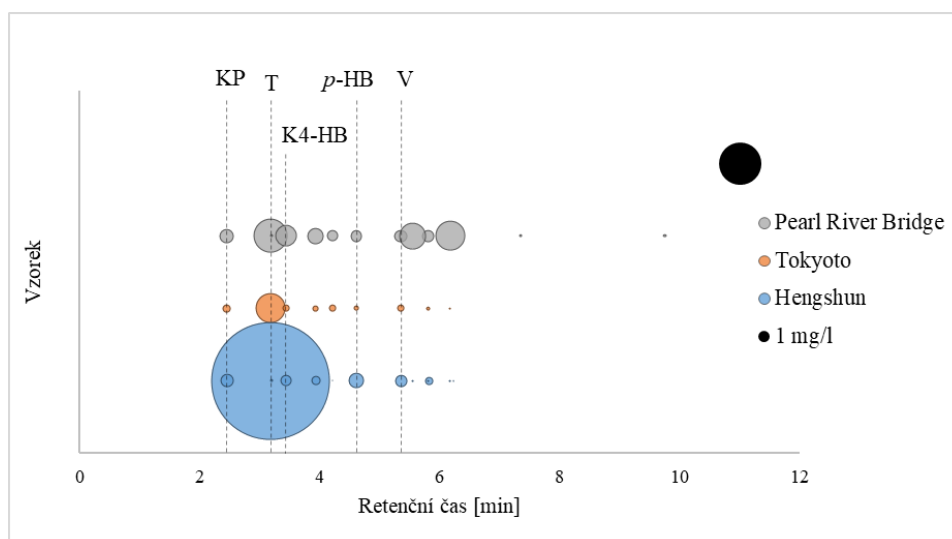
Obrázek 13: Chromatogramy analýz fenolických látek lihových octů, prezentované jako bublinové grafy, kdy velikost bubliny značí koncentraci látky. Význam zkratk: T – tyrosol, *p*-HB – *p*-hydroxybenzaldehyd, V – vanilin.

Lihové octy dosud nebyly předmětem žádné studie a dosažené výsledky tak nelze porovnat s žádnou dostupnou publikací. Jelikož rafinovaný líh v tuzemských podmínkách pochází nejčastěji z bramborového škrobu nebo cukerné melasy, lze se zaměřit na fenolický obsah v těchto matricích. Chen a kol. [98] pomocí ultrazvuku extrahovali fenolické látky z melasy a získané extrakty podrobili HPLC-DAD-MS/MS analýze. Jako významné fenolické sloučeniny autoři určili vanilin, kyselinu ferulovou, galovou, 4-hydroxybenzoovou, syringovou a katechin. Extrakci za pomoci ultrazvuku rovněž využili Riciputi a kol. [99],

kteří zjišťovali obsah fenolických látek ve vedlejších produktech brambor. Autoři uvádí chlorgenovou kyselinu a její izomery jako hlavní fenolické látky v těchto produktech. Ke stejnému závěru došli i Navarre a kol. [100]. Tyto skutečnosti by vysvětlovaly přítomnost malého množství kyseliny chlorgenové ve vzorku lihového octa Tesco. Nicméně z výsledků je patrné, že v průběhu průmyslové výroby lihového octa dochází ke značným ztrátám fenolických sloučenin.

3.3.2 Octy rýžové

Vysoká koncentrace tyrosolu byla zjištěna v případě vzorku rýžového octa Heng Shun (>7 mg/l), u dalších vzorků a ostatních látek identifikovaných v rýžových octech byla koncentrace menší než 1 mg/l. Kromě tyrosolu byly ve všech vzorcích identifikovány kyseliny ferulová, vanilová, *p*-hydroxybenzoová, protokatechová, syringová, *p*-hydroxybenzaldehyd, syringaldehyd, protokatechový aldehyd a vanilin (obrázek 14 a příloha 14). Tyto látky lze považovat za charakteristické pro rýžové octy, ale nelze z nich jednoznačně vyčlenit látku, která by posloužila pro odlišení rýžových octů od ostatních typů. V rýžovém octu značky Pearl River Bridge bylo nalezeno malé množství 4-vinylfenolu, což je látka specifická pro vinné bílé octy. Zároveň zde byla pod mezí kvantifikace identifikována kyselina galová, což by mohlo naznačovat, že k tomuto octu mohl být přidán vinný bílý ocet. Tento vzorek byl zároveň jediným octem vůbec, ve kterém byl nalezen koniferyl aldehyd a kyselina homovanilová.



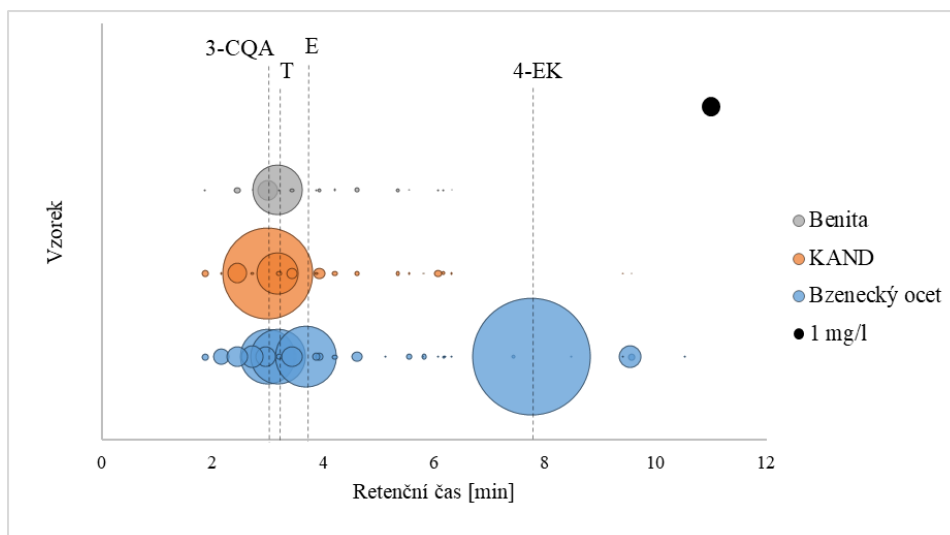
Obrázek 14: Chromatogramy analýz fenolických látek rýžových octů, prezentované jako bublinové grafy, kdy velikost bubliny značí koncentraci látky. Význam zkratk: KP – kyselina protokatechová, T – tyrosol, Kp-HB – kyselina *p*-hydroxybenzoová, *p*-HB – *p*-hydroxybenzaldehyd, V – vanilin.

Zhang a kol. [88] stanovili jako hlavní fenolické sloučeniny rýžových Zhenjiang octů katechin (36.74 ± 1.46 mg/l), kyselinu *p*-hydroxybenzoovou (24.74 ± 2.38 mg/l) a kyselinu vanilovou (15.22 ± 3.90 mg/l). Zatímco obě kyseliny byly identifikovány i v našich vzorcích na různých koncentračních úrovních, katechin nebyl identifikován v žádném vzorku rýžového octa. Zároveň u našich vzorků byl zjištěn výrazně nižší obsah fenolických látek. Důvodem těchto odlišností může být způsob výroby a zrání Zhenjiang octa po dobu 10 let. Autoři zmíněné studie se zaměřili i na rýžové octy, které zrají podstatně kratší dobu, pro tyto vzorky však neuvádí obsahy ani profil fenolických látek. Katechin byl identifikován jako jedna z hlavních fenolických sloučenin rýžového vína [101]. Pro objasnění nepřítomnosti katechinu u našich vzorků rýžového octa by bylo zapotřebí dalších studií.

3.3.3 Octy jablečné

V rámci skupiny jablečných octů byly zjištěny velké rozdíly mezi jednotlivými vzorky (obrázek 15 a příloha 15). Z pohledu fenolického profilu se jevil nejchudší vzorek od značky Benita s celkovou koncentrací fenolických látek 8,5 mg/l, naopak nejbohatší co do počtu a obsahu fenolů byl vzorek od značky Bzenecký ocet, u kterého byla celková koncentrace fenolů >75 mg/l. Za hlavní fenolické látky v jablečných octech lze na základě výsledků považovat tyrosol a kyselinu chlorgenovou, která může sloužit pro odlišení jablečných octů od ostatní typů octa. U všech tří vzorků byla koncentrace těchto dvou látek vyšší než 1 mg/l, vzorek jablečného octa značky KAND dokonce obsahoval přes 23 mg/l kyseliny chlorgenové. Další látkou charakteristickou pro jablečné octy byl rutin, který byl dále přítomen pouze u dvou vzorků octů vinných bílých. Pro odlišení jablečných octů od ostatní typů lze rovněž použít kyselinu galovou, která není typická pro rýžové a lihové octy a zároveň u octů vinných je její koncentrace výrazně vyšší než u octů jablečných.

U vzorku Bzeneckého octa byla zjištěna velmi vysoká koncentrace 4-ethylkatecholu (>38 mg/l), což je látka produkovaná převážně mikroorganismy a má negativní dopad na senzorické vlastnosti potravin [102]. 4-ethylkatechol byl dále identifikován u některých vzorků vinných octů (včetně balzamikových), avšak jeho koncentrace nedosahovala tak vysokých hodnot. Tato látka je zároveň charakteristická pro vína, kde je její koncentrace obvykle výrazně nižší než 1 mg/l [103].

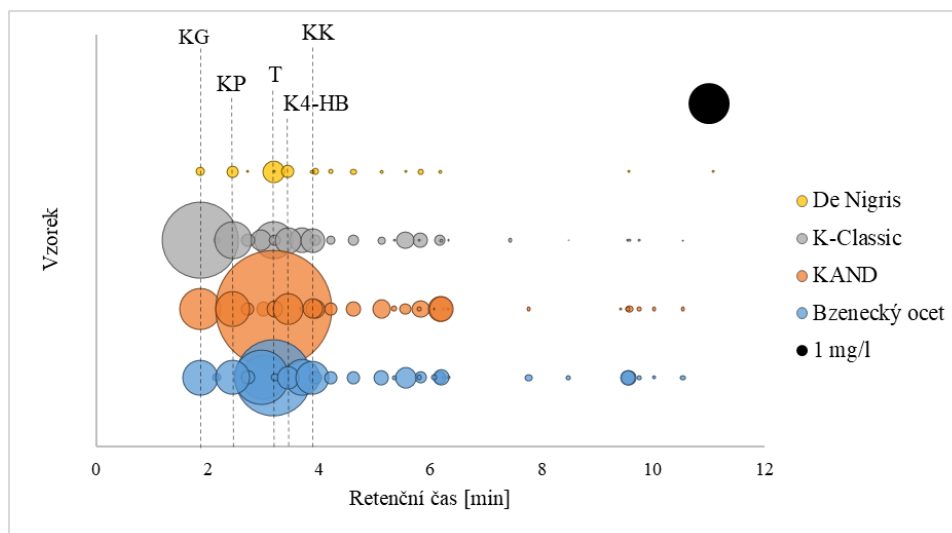


Obrázek 15: Chromatogramy analýz fenolických látek jablečných octů, prezentované jako bublinové grafy, kdy velikost bubliny značí koncentraci látky. Význam zkratek: 3-CQA – kyselina chlorgenová, T – tyrosol, E – epikatechin, 4-EK – 4-ethylkatechol.

Kelebek a kol. [86] ve své studii určili jako hlavní fenolickou látku jablečných octů kyselinu chlorgenovou, jejíž koncentrace se pohybovala v rozmezí 2,96 – 16,29 mg/l v rámci 8 vzorků, což je v souladu s našimi výsledky. Jako další významnou fenolické kyseliny autoři uvádí kyselinu protokatechovou, jejíž koncentrace byla u všech vzorků vyšší jak 1 mg/l. Kyselina protokatechová byla rovněž identifikována v naší práci, kdy u dvou vzorků její koncentrace přesahovala 1 mg/l. Hned v několika studiích [84][85][86] bylo nalezeno relativně vysoké množství katechinu na různých koncentračních úrovních v rozmezí 0 – 27,11 mg/l. Katechin byl v případě naší studie přítomen pouze u vzorku Bzenecký ocet, kdy jeho koncentrace byla mírně vyšší než 1 mg/l.

3.3.4 Octy vinné bílé

Vinné bílé octy jsou relativně dobrým zdrojem fenolických látek (obrázek 16 a příloha 16), avšak jak je patrné z výsledků, na trhu lze objevit i vzorky, jejichž obsah fenolů lze považovat za neuspokojivý (vzorek značky De Nigris). Jako hlavní fenolické látky ve vinných bílých octech byly identifikovány kyselina galová, *p*-hydroxybenzoová, kávová, protokatechová a tyrosol. Vyjma vzorku značky De Nigris, všechny vzorky bílých vinných octů obsahovaly 4-vinylfenol, který se zdá být látkou charakteristickou převážně pro tento typ octů. Od balzamikových a vinných červených octů se vinné bílé octy lišily zpravidla nižší koncentrací kyseliny galové.

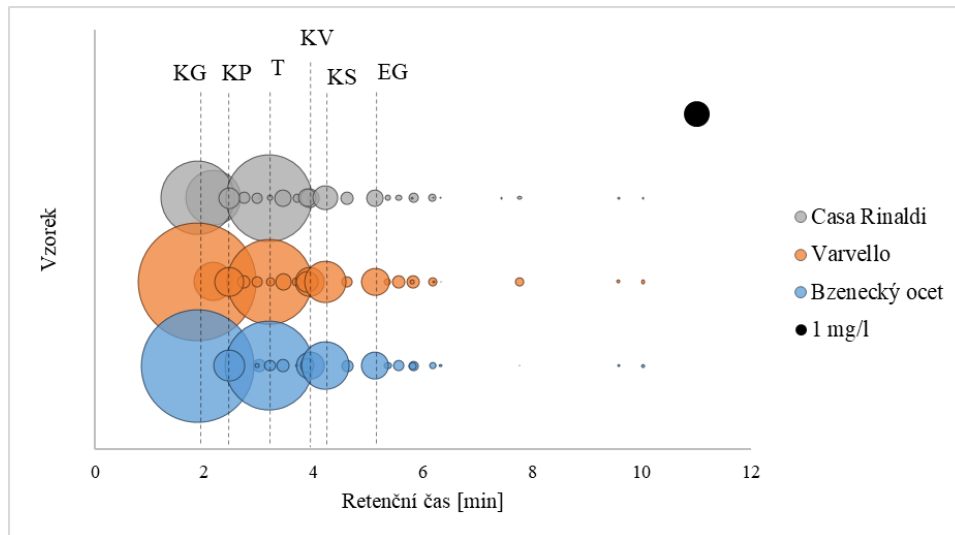


Obrázek 16: Chromatogramy analýz fenolických látek vinných bílých octů, prezentované jako bublinové grafy, kdy velikost bubliny značí koncentraci látky. Význam zkratk: KG - kyselina galová; KP - kyselina protocatechová, T - tyrosol, Kp-HB - kyselina p-hydroxybenzoová, KK – kyselina kávová.

Cejudo-Bastante a kol. [82] provedli analýzu vybraných fenolických sloučenin u 11 vzorků ochucených vinných bílých octů. Tyrosol a kyselinu galovou autoři označili za hlavní fenolické látky bílých vinných octů, což je v souladu s námi dosaženými výsledky. Kyselina galová nebyla neidentifikována v žádném ze tří vzorků vinného bílého octa ve studii Liu a kol. [104]. Naopak relativně vysoký obsah kyseliny galové tito autoři stanovili v případě octů vinných červených a balzamikových, u kterých bylo zjištěno, v rámci naší studie, výrazně vyšší množství kyseliny galové v porovnání s vinnými bílými octy.

3.3.5 Octy vinné červené

Z výsledků analýz vinných červených octů (obrázek 17 a příloha 17) je patrná dobrá shoda v profilu a množství fenolických látek individuálních vzorků. Za majoritní sloučeniny lze označit tyrosol a kyselinu galovou. Za zmínku stojí i další fenoly s vyšším obsahem v červených vinných octech – kyselina vanilová, protocatechová, syringová a ethyl galát.



Obrázek 17: Chromatogramy analýz fenolických látek vinných červených octů, prezentované jako bublinové grafy, kdy velikost bubliny značí koncentraci látky. Význam zkratk: KG - kyselina galová; KP - kyselina protokatechová, T - tyrosol, KV – kyselina vanilová, KS – kyselina syringová, EG – ethylgalát.

Vzorky značek Casa Rinaldi a Varvello obsahovali relativně vysoké množství pyrogallolu. Ten se přirozeně vyskytuje v některých rostlinách jako *Emblia officinalis* L. [105] nebo *Terminalia chebula* L. [106]. Nicméně je dobře známo, že pyrogallol vzniká mikrobiální či tepelnou degradací kyseliny galové, případně kyseliny tříslové, a tudíž jeho vyšší obsah ve vinných octech může souviset s procesem fermentace nebo vaření vinného moštu v případě balzamických octů [107][108]. Pyrogallol nebyl identifikován u všech vzorků vinných octů, naopak byl přítomen v některých jablečných octech, které neobsahují tak vysoké množství kyseliny galové, tudíž pro objasnění původu pyrogallolu v octech by bylo zapotřebí dalších studií. Ve všech vzorcích vinného červeného octa byl identifikován katechin a epikatechin, čímž se vinné červené octy odlišovaly od balzamických octů, u kterých nebyla přítomnost těchto dvou látek potvrzena v žádném z testovaných vzorků.

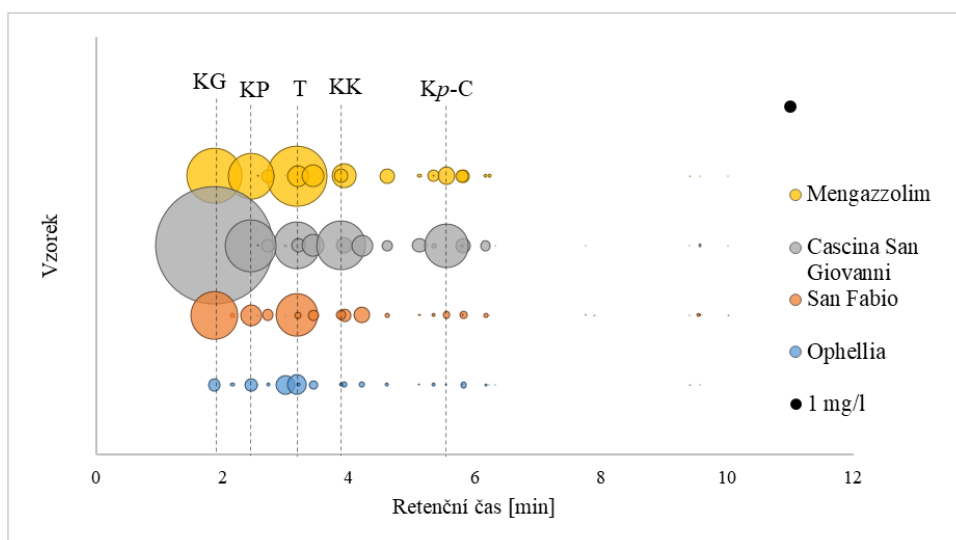
Cerezo a kol. [109] se zaměřili na vliv typu dřevěných sudů na kompozici fenolických sloučenin v průběhu produkce octa tradiční povrchovou metodou. Koncentrace kyseliny galové v octech zrajících v akátových, třešňových a dubových sudech se pohybovala okolo 30 mg/l, naopak výrazně vyšší hodnoty byly zjištěny u sudů z kaštanového dřeva a produkce octů v sudech z tohoto typu dřeva může výrazně přispívat k celkovému obsahu kyseliny galové. Množství tyrosolu nebylo výrazněji ovlivněno typem použitého sudu a jeho koncentrace se pohybovala v rozmezí 13,3 – 20,08 mg/l, což je v souladu s našimi výsledky. Cruz a kol. [81] provedli analýzu vybraných fenolických kyselin u 7 vzorků vinného červeného octa, nicméně kyselina galová nebyla předmětem jejich studie. Vyšších hodnot

koncentrací dosahovaly kyselina syringová ($\bar{c} = 5,17 \pm 1,37$ mg/l) a kyselina kávová ($\bar{c} = 3,43 \pm 1,26$ mg/l). Autoři dále identifikovali ve většině vzorků kyselinu protokatechovou, kyselinu chlorgenovou a kyselinu *p*-kumarovou. Z těchto kyselin dosahovaly v naší studii nejvyšších koncentrací kyselina syringová, protokatechová a kávová.

3.3.6 Octy balzamikové

Různorodost z hlediska koncentrace fenolických sloučenin vykazovala skupina balzamikových octů (obrázek 18 a příloha 18). Nejchudší, co do obsahu fenolů, byl vzorek značky Ophellia, který byl jako jediný původem z Řecka a nemusel splňovat požadavky pro výrobu balzamikových octů s chráněným označením původu. U dalších tří vzorků, které již pocházely z italské Modeny a nesly tak chráněné označení původu, byl zjištěn vysoký obsah fenolických látek v porovnání s ostatními skupinami octů, což pravděpodobně souvisí s jejich unikátním způsobem výroby a zrání v dřevěných sudech.

Za hlavní fenolické sloučeniny balzamikových octů lze označit kyselinu galovou, tyrosol a kyselinu protokatechovou. Vyšších hodnot koncentrací u některých vzorků dosahovaly rovněž kyselina kávová a kyselina *p*-kumarová. Specifickou látkou pro balzamikové octy byl eskulin, což je v podstatě eskuletin navázaný na molekulu glukózy. Na rozdíl od eskulinu, byla jeho volná forma (eskuletin) identifikována i v dalších vinných octech. Eskulin je pravděpodobně do balzamikových octů extrahován z dřevěných sudů během zrání octa, jelikož se jedná o jeden z hlavních kumarinů dubového dřeva [110].



Obrázek 18: Chromatogramy analýz fenolických látek vinných červených octů, prezentované jako bublinové grafy, kdy velikost bubliny značí koncentraci látky. Význam zkratk: KG - kyselina galová; KP - kyselina protokatechová, T - tyrosol, KK – kyselina kávová, Kp-C – kyselina *p*-kumarová.

Barnaba a kol. [51] ve své rozsáhlé studii určili u 8 vzorků balzamikového octa jako hlavní fenolické látky kyselinu galovou ($\bar{c} = 12,4 \pm 11,8$ mg/l), kyselinu protokatechovou ($\bar{c} = 6,11 \pm 7,14$ mg/l) a protokatechový aldehyd ($\bar{c} = 6,41 \pm 8,35$ mg/l). Nicméně tyrosol, který byl v naší práci vyhodnocen jako jedna z hlavních fenolických látek balzamikových octů, patřil v jejich studii k látkám s minoritním zastoupením s koncentrací nižší než 1 mg/l. Odlišného výsledku dosáhli Natera kol. [111], kde průměrná koncentrace tyrosolu 6 vzorků balzamikového octa byla stanovena na 109,4 mg/l. Tyto dvě porovnávané studie se rovněž rozcházejí v množství katechinu, kdy Barnaba a kol. určili průměrnou koncentraci katechinu v balzamikových octech $<0,051$ mg/l, zatímco Natera a kol. identifikovali katechin jako jednu z hlavních fenolických látek balzamikových octů s průměrnou koncentrací 28,5 mg/l. Katechin nebyl nalezen v naší práci v žádném ze vzorků balzamikového octa. Takové rozdíly mohou být způsobeny v první řadě odlišnostmi v rámci vybraných vzorků, ale také ve výkonnosti a spolehlivosti analytických metod.

3.4 SHRNU TÍ

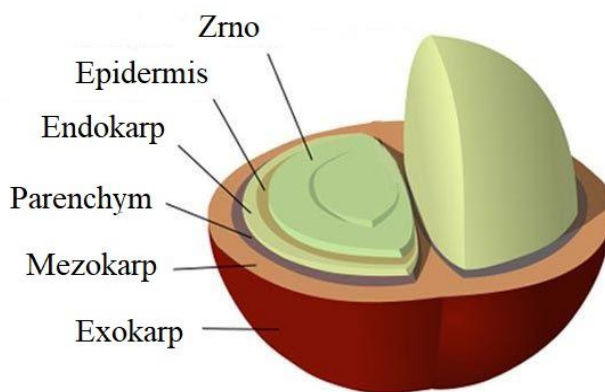
Třetí experimentální část se zabývala určením fenolického profilu různých druhů octa s ohledem na kvalitativní, tak i kvantitativní odlišnosti mezi jednotlivými skupinami. Za prakticky nulový lze označit obsah fenolických látek u lihových octů. Rýžové octy rovněž nelze považovat za dobrý zdroj těchto látek (v porovnání s ovocnými octy), avšak je potřeba brát v úvahu, že tato práce se soustředila na stanovení pouze vybraných fenolických sloučenin, a tudíž celkový reálný profil může být odlišný. U jablečných octů byly zjištěny rozdíly v rámci zakoupených vzorků, nicméně co do počtu i obsahu je lze považovat za dobrý zdroj fenolických látek. Pro vinné octy bylo charakteristické široké spektrum fenolických sloučenin a vysoký obsah zejména fenolických kyselin, především u octů balzamikových.

4 ZMĚNY FENOLICKÉHO PROFILU V PRŮBĚHU PRAŽENÍ KÁVOVÝCH ZRN

4.1 KÁVA A KÁVOVÉ ZRNO

Každodenní konzumace kávy se stala nedílnou součástí dne mnoha z nás. Kávu si po celém světě dopřávají lidé nejen kvůli její chuti a aroma, ale také pro její stimulační účinky. Tradiční způsob přípravy kávy spočívá v namletí kávových zrn a jejich zalití horkou vodou. Ve skutečnosti jsou kávová zrna semeny plodů (kávových třešní) kávovníku, který řadíme do rodu *Coffea*, přičemž největší význam mají kávovník arabský (*Coffea arabica* L.) a kávovník statný (*Coffea canephora* P.), z jejichž plodů jsou získávána kávová zrna arabika, resp. robusta [112].

Kávová třešeň (obrázek 19) je tvořena vnější slupkou (exokarp), tenkou vrstvou buničiny (mezokarp) a pektinovou vrstvou (parenchym). Uvnitř této struktury jsou uložena dvě kávová zrna, která jsou pokryta pergamenovým obalem (endokarp) a dodatečně další tenkou stříbřitou blankou (epidermis).



Obrázek 19: Struktura kávového zrna. Převzato a upraveno z [112].

Hlavními složkami zelených kávových zrn jsou rozpustné sacharidy (převážně sacharóza, ale i mono- a poly- sacharidy), nerozpustné sacharidy (celulóza, hemicelulóza), organické kyseliny (citronová, jablečná, chinová), fenolické sloučeniny (především kyselina chlorogenová a její izomery), dále minerály, lipidy a dusíkaté sloučeniny (volné aminokyseliny, bílkoviny a kofein). Zrna kávy arabika pak obsahují více lipidů, a naopak méně kofeinu než zrna kávy robusta [113].

4.1.1 Produkce a spotřeba

Podle ICO (Mezinárodní kávové organizace) bylo v minulých letech ročně vyprodukováno více jak 160 milionů pytlů kávových zrn (standardní váha jednoho pytle je 60 kg). Největší podíl na produkci má Jižní Amerika, kde je ročně vyprodukováno na 80 milionů pytlů, následuje Asie a Oceánie s roční produkcí okolo 50 milionů pytlů. Zhruba 20 milionů pytlů kávových zrn je vyprodukováno v oblasti Střední Ameriky a stejného počtu dosahuje produkce v Africe. Mezi největší konzumenty kávy patří Evropané (>50 milionů pytlů ročně), obyvatelé Asie a Oceánie (>40 milionů pytlů ročně) a Severní Ameriky (okolo 30 milionů pytlů ročně) [114]. Na základě dat ČSÚ (Český statistický úřad) byla roční spotřeba kávových zrn v tuzemsku mezi lety 2013 – 2022 obvykle vyšší jak 2 kg na jednoho obyvatele, tedy okolo 350 000 pytlů kávových zrn ročně [115].

4.1.2 Zpracování zelených kávových zrn

Zpracování kávových zrn začíná sběrem kávových třešní, které severně od rovníku probíhá mezi prosincem a únorem, na jih od rovníku pak mezi květnem a srpem. Plody jsou z plantáží transportovány do zpracovatelského závodu, kde mohou být dále zpracovány suchou nebo mokrou cestou [113].

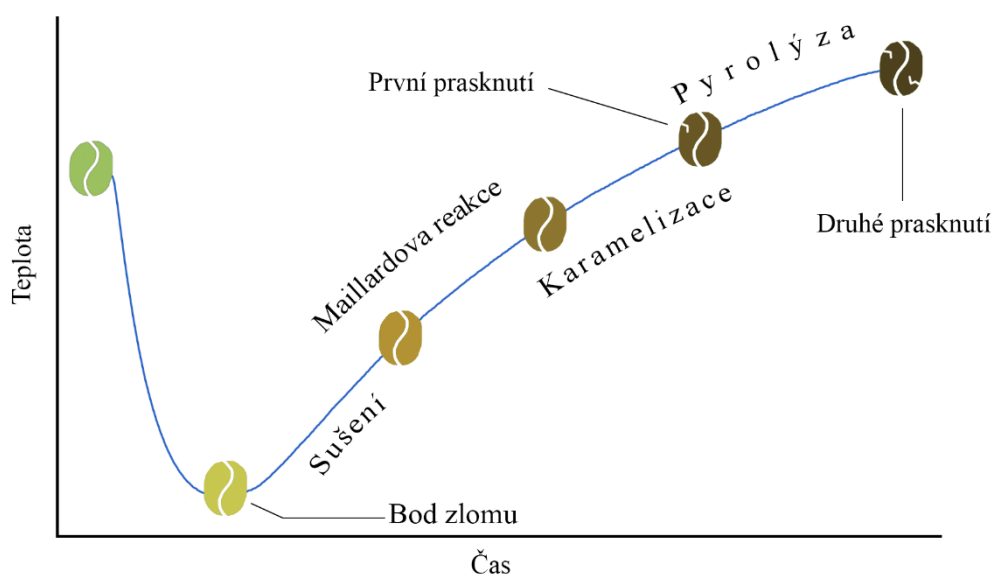
V případě suchého způsobu jsou třešně sušeny na slunci, dokud nedojde k oddělení vnější části plodu od endokarpu. Strojově jsou pak odděleny zbylé krycí vrstvy od samotných zrn, která jsou tříděna dle velikosti a balena do pytlů [113][116].

V případě mokrého způsobu dojde nejprve v rozvlákňovači k oddělení slupky a dužiny od semene, které zůstává pokryto parenchymem a dalšími vnitřními vrstvami. Slizová (pektinová) vrstva je enzymaticky odstraněna fermentací ve fermentačních nádržích. Následuje promytí vodou a sušení. Zrna, která jsou stále ještě pokryta pergamenovou vrstvou a stříbřitou blankou, jsou dále zpracována stejným způsobem, jako v případě suchého způsobu, tedy strojovým loupáním a balením do pytlů [113][117].

Suchý způsob je považován za přírodnější a šetrnější k přírodě, jelikož nedochází k vysoké spotřebě vody. Mokrá způsob je propracovanější, náročnější na vybavení, nevyžaduje tolik lidské pracovní síly, avšak spotřebovává velké množství vody [113]. Káva zpracovaná mokrou způsobem je obvykle považována za kvalitnější a vzhledem k dalším výhodám je v praxi upřednostňován tento způsob zpracování [116].

4.1.3 Pražení kávových zrn

Zelená kávová zrna zbavená veškerých obalových vrstev jsou transportována do pražírén po celém světě, kde dochází k jejich pražení. Pražení probíhá v pražičkách (nejčastěji v bubnovém uspořádání), které jsou v prvním kroku vyhřátý na teplotu 100 – 200 °C, v závislosti na nastaveném programu. Zelená kávová zrna jsou nasypána do bubnu, čímž dojde k rapidnímu poklesu teploty jeho stěn. Tento pokles trvá až do bodu zlomu, ve kterém dojde k ustanovení rovnováhy mezi teplotou stěn bubnu a teplotou kávových zrn. Následuje postupné zvyšování teploty až k hodnotám nad 200 °C. V první fázi pražení dochází ke snížení celkové hmotnosti zrna o zhruba 10 % v důsledku ztráty vody a ke změně barvy zrna ze zelené na žlutou. Tato fáze trvá obvykle okolo 2 – 5 minut. Samotné pražení začíná, když zrna dosáhnou teploty nad 180 °C. V tento moment dochází k celé řadě chemických reakcí, kdy největší význam mají Maillardova reakce a pyrolýza (obrázek 20) [118].



Obrázek 20: Obecná křivka pražení kávových zrn.

Maillardovy reakce jsou zodpovědné za vznik charakteristického aroma, chuti a barvy kávových zrn, resp. kávy. Jedná se o reakce aminokyselin a redukujících cukrů za vzniku melanoidů s typicky tmavým zbarvením. Pokud pražení trvá delší dobu, dochází rovněž ke karamelizaci cukrů [119].

Pyrolýza je definována jako degradace a dehydratace sacharózy vlivem vysoké teploty. Během pyrolýzy dochází k uvolnění oxidu uhličitého a vodních par, což má za následek zvýšení objemu a tlaku uvnitř zrna. Při překonání určitého tlaku dochází k tzv. prvnímu prasknutí, což je doprovázeno příslušným zvukovým jevem. V případě pokračujícího pražení

dochází k dalšímu uvolňování oxidu uhličitého až do tzv. druhého prasknutí. Káva pražená až do dosažení druhého prasknutí má značně hořkou chuť, proto je pražení obvykle ukončeno mezi prvním a druhým prasknutím [118].

Po ukončení pražení jsou kávová zrna ochlazena vzduchem nebo vodou, čímž dojde ke kondenzaci aromatických látek uvnitř zrna. Křivku pražení (také profil pražení) lze definovat jako závislost teploty na čase. Pražení může probíhat od 3 do 20 minut v závislosti na použité instrumentaci a zvoleném tvaru křivky [118]. Nejlepší pražírny mají vyvinuté vlastní unikátní profily, získané na základě senzoričkových a chemických analýz, čímž dosahují jedinečné chuti a aroma.

4.1.4 Fenolické látky kávových zrn

V literatuře lze dohledat hned několik studií, které se zabývaly stanovením obsahu fenolických látek v kávových zrnech, resp. v kávě. Tyto studie byly obvykle zaměřeny na charakterizaci kyseliny chlorgenové (a celé řady jejích izomerů), která je jednou z hlavních složek kávových zrn a je zodpovědná za převážnou část jejich antioxidační kapacity. Na druhou stranu lze dohledat jen relativně málo studií, které věnovaly pozornost ostatním fenolickým sloučeninám. Zaměření jednotlivých prací je různé, předmětem zájmu byla obvykle změna fenolického profilu v průběhu pražení kávy (tabulka 13), využití fenolických látek pro určení původu zelených kávových zrn [120][121][122] a porovnání různých technik pro extrakci fenolických sloučenin z kávových zrn [123][124][125][126][127]. Pro všechny tyto účely byla nejčastěji využita technika kapalinové chromatografie v módu reverzních fází ve spojení se spektrofotometrickými nebo hmotnostními detektory.

Tabulka 13: Vybrané studie, využívající techniku LC pro charakterizaci změn fenolického profilu v průběhu pražení kávových zrn.

Počet stupňů pražení	Detekce	Úprava vzorku	Analyty	Ref.
3 stupně	UV/Vis	extrakce vroucí vodou	Flavonoidy a nechlorgenové kyseliny (celkem 12 látek)	[128]
3 stupně	MS/MS	extrakce 70% etanolem + hydrolýza	Různé fenolické kyseliny a ostatní (celkem 23 látek)	[129]
Zelené + 3 stupně	DAD	extrakce vroucí vodou	Chlorgenové kyseliny (celkem 3 látky)	[130]
Zelené + 3 stupně	DAD	extrakce horkou vodou	Chlorgenové kyseliny (počet neuveden)	[131]
Zelené + 3 stupně	DAD	extrakce horkou vodou	Různé fenolické kyseliny (celkem 10 látek)	[132]
Zelené + 4 stupně	UV/Vis	extrakce vroucí vodou	Chlorgenové kyseliny (celkem 7 látek)	[133]
Zelené + 6 stupňů	DAD - MS	extrakce 40% metanolem + hydrolýza	Chlorgenové a další fenolické kyseliny (celkem 21 látek)	[134]

4.1.4.1 Chlorgenové kyseliny

Jako chlorgenové kyseliny (CGA) označujeme celou řadu izomerů, vzniklých esterifikací mezi hydroxyskořicovými kyselinami a kyselinou chinovou [135]. Jednotlivé izomery jsou obvykle děleny (na základě identity, pozice a počtu acylových zbytků) do 4 hlavních skupin – caffeoylchinové kyseliny (CQA), feruoylchinové kyseliny (FQA), *p*-coumaroylchinové kyseliny (*p*CoQA) a dicaffeoylchinové kyseliny (diCQA) [135][136], přičemž rozeznáváme více jak 70 možných struktur [137]. Významným zdrojem chlorgenových kyselin jsou kávová zrna, ovoce (např. jablka, švestky, třešně), zelenina (jako brambory, mrkev, rajčata) a některé léčivé byliny [131][133][138][139][140][141][142][143].

Bylo popsáno hned několik možných osudů chlorgenových kyselin v souvislosti s pražením kávových zrn. Takové procesy zahrnují kompletní destrukci; hydrolyzu (na výchozí hydroxyskořicové kyseliny a kyselinu chinovou); začlenění do melanoidinů; izomeraci; dehydrataci (za tvorby laktonů a derivátů kyseliny šikimové) a epimerizaci [144][145][146].

4.1.4.2 Ostatní fenolické kyseliny

Jednou z nejznámějších hydroxyskořicových kyselin je kyselina kávová, která je přirozenou složkou celé řady rostlin a rostlinných produktů [135]. Kyselina kávová vykazuje, podobně jako ostatní fenolické látky, antioxidační aktivitu, která je dokonce vyšší, než u příslušných chlorgenových kyselin [147].

Další dobře popsanou fenolickou sloučeninou je kyselina ferulová, jejíž přírodními zdroji jsou slupky ječmene, kukuřice či pšeničné otruby [148][149][150]. Kyselina ferulová může být biotransformována řadou mikroorganismů na další významné fenolické látky jako je vanilin, kyselina vanilová, kyselina kávová nebo kyselina *p*-kumarová [151].

Kyselinu kumarovou lze v přírodních zdrojích nalézt ve třech různých izomerech – *ortho*, *meta* a *para*. Nejčastěji se tato kyselina vyskytuje jako kyselina *p*-kumarová, jejímž zdrojem jsou např. obilniny, hrušky nebo široká škála hub [152][153][154]. Všechny tři izomery pak byly identifikovány v borůvkách s následujícím zastoupením – kyselina *p*-kumarová > kyselina *m*-kumarová > kyselina *o*-kumarová [155].

Kyselina kávová, kyselina ferulová a kyselina *p*-kumarová jsou zapojeny do biosyntézy ligninu, jakožto jedné z hlavních strukturních komponent rostlinné biomasy [156]. Zároveň se jedná o prekurzory biosyntézy chlorgenových kyselin, a proto je lze identifikovat v kávových zrnech s relativně vysokým obsahem, i když v porovnání s chlorgenovými kyselinami jde spíše o látky s minoritním zastoupením [134].

4.1.4.3 Hydroxybenzaldehydy

Jednou ze základních látek ze skupiny hydroxybenzaldehydů je *p*-hydroxybenzaldehyd, nacházející se v rostlinách, zejména pak ve *Vanilla planifolia* L., kde je jeho biotransformace spojena s vanilinem, jednou z hlavních složek této rostliny [157][158].

Vanilin je charakteristickou složkou rostlin rodu orchidejí, které jsou rovněž známy pod názvem vanilkovníky. Nicméně, vanilin lze najít v menším množství i v řadě dalších rostlin a rostlinném materiálu, včetně kávových zrn. Vanilin nachází široké uplatnění v potravinářském průmyslu, zejména díky svému příjemnému aroma [158][159].

Dalším běžným fenolickým aldehydem je protokatechový aldehyd, který je jedním z meziproduktů biosyntézy vanilinu z kyseliny skořicové [160]. Přírodními zdroji tohoto aldehydu mohou být kakaové boby, konopí nebo *Salvia miltiorrhiza* L. [161][162][163].

4.1.4.4 Alkylfenoly

4-methylkatechol je známým metabolitem kvercetinu a můžeme se s ním shledat u řady potravin a nápojů jako je např. víno, lihoviny nebo octy [51]. Strukturálně příbuznou látkou je 4-ethylkatechol, která je vzhledem ke svému nepříjemnému aroma nechtěnou složkou potravin a je příčinou chuťových defektů při produkci vína [164][165][166]. Pražením kávových zrn dochází ke vzniku těchto dvou alkylfenolů z kyseliny kávové a zbytků kyseliny chlorgenové [167].

4-vinylfenol je těkavá fenolická látka běžně přítomná ve vínech, kde je syntetizována z kyseliny *p*-kumarové působením kvasinek [168]. Tato látka byla identifikována v pražených arašidech a arašídovém oleji [169][170]. Zároveň bylo zjištěno zvýšení obsahu tohoto alkylfenolu v průběhu zahřívání ostružin [171].

4.2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem poslední experimentální části bylo využít optimalizovanou a validovanou metodu (kapitola 2.2.2) pro identifikaci látek ve vzorcích zelených a pražených kávových zrn a následně modifikovat tuto metodu tak, aby byly zaznamenávány pouze kvantifikační MRM přechody identifikovaných látek. Kvantifikační metodou pak byly proměřeny vzorky kávových zrn arabika a robusta v různých stádiích pražení. Dále bylo cílem vyvinutou metodu revalidovat pro vzorky kávy v rámci správnosti, resp. návratnosti standardních přídavek a určit velikost matricových efektů.

4.2.1 Vzorky kávových zrn

Kávová zrna v různých stádiích pražení byla získána ve spolupráci s pardubickou pražírnou ZRNO44. Zrna kávy arabika (původem z Brazílie) byla během pražení odebírána v následujících intervalech – zelená zrna; 4; 6; 8; 10 a 12 minut. Zrna kávy robusta (původem z Indie) byla odebírána v intervalech pražení – zelená zrna; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 16 a 17 minut. U obou vzorků lze považovat jako finální dobu pražení 12 minut, vzorek kávy robusta byl pražen cíleně delší dobu pro objasnění dalšího osudu fenolických látek při přepražení kávových zrn. Obdržené vzorky byly rovněž využity pro sledování změn obsahu vybraných furanických látek, což bylo předmětem diplomové práce M. Zimové [172], na které se autor této disertační práce podílel jako konzultant.

4.2.2 Úprava vzorků

Obdržené vzorky kávových zrn byly namlety pomocí elektrického kávového mlýnku ETA Magico (Praha, Česká republika). Namletá kávová zrna byla přesypána skrz běžné kuchyňské síto, čímž byl získán materiál o velikosti menší než oko síta. Namleté a přesívané vzorky byly dále sušeny ve tmě a při pokojové teplotě.

Z takto upravených vzorků byly fenolické sloučeniny extrahovány pomocí metody extrakce v ultrazvukové lázni. 0,5 g namletých kávových zrn bylo extrahováno 20 ml rozpouštědla, kterým byl 50% (v/v) metanol. Extrakce probíhala za kontrolované teploty 40 °C a po dobu 10 minut. Získané extrakty byly centrifugovány a filtrovány skrz PTFE stříkačkové filtry a skladovány v lednici do doby analýzy.

4.2.3 HPLC-MS/MS stanovení ostatních fenolických sloučenin

Popis metody pro identifikaci látek, včetně použitých chemikálií a standardů odpovídá kapitole 2.2.2, resp. kapitole 2.2.1. Pro kvantifikaci ostatních fenolických látek byly u výchozí metody vyřazeny MRM přechody látek, které nebyly identifikovány u zelených, resp. pražených kávových zrn. Dále byly vyřazeny *QL* MRM přechody identifikovaných látek.

Stanovení ostatních fenolických sloučenin probíhalo bez ředění příslušných extraktů a s přidavkem kyseliny *m*-kumarové o koncentraci 0,1 mg/l jako vnitřního standardu. Každý extrakt byl proměřen HPLC-MS/MS metodou ve třech opakování. Kvantitativní vyhodnocení ostatních fenolických sloučenin probíhalo na základě kalibrační křivky (v rozsahu 0,001 – 1 mg/l, počet bodů = 7), získané přídatky směsi standardních látek k extraktu kávových zrn robusta (8 min) a odečtením příslušných ploch píků od ploch pro samotný extrakt bez přídatku.

4.2.4 HPLC-MS/MS stanovení chlorgenových kyselin

Standardy kyseliny kryptochlorgenové (4-CQA, $\geq 98\%$) a kyseliny neochlorgenové (5-CQA, $\geq 98\%$) byly dodatečně zakoupeny od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Původ a čistota standardu kyseliny chlorgenové (3-CQA) odpovídá kapitole 2.2.1.

Analýza chlorgenových kyselin byla uskutečněna za využití stejné instrumentace a mobilní fáze jako analýza ostatních fenolických sloučenin. Pro separaci chlorgenových kyselin byla použita kolona Luna Omega PS C18 (150 × 3 mm, velikost částic 3 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Analýza byla provedena v módu gradientové eluce s následujícím profilem gradientu: 0 min – 10 % B; 6 min – 34 % B; 6,01 min – 100 % B; 9 min – 100 % B. Po ukončení analýzy proběhlo ustálení podmínek na počáteční hodnoty 10 % B po dobu 4 minut. Další parametry jako teplota, dávkovaný objem a průtok mobilní fáze odpovídají kapitole 2.2.2. Detekce 4-CQA a 5-CQA probíhal při záznamu stejných MRM přechodů a detekčních parametrů jako v případě 3-CQA.

Extrakty byly před samotnou HPLC-MS/MS 1000× ředěny 50% (v/v) metanolem a byl k nim přidán přídatek vnitřního standardu kyseliny galové o koncentraci 0,1 mg/l. Vzhledem k vysokému ředění a předpokladu zanedbatelných matricových efektů bylo kvantitativní vyhodnocení chlorgenových kyselin založeno na metodě externí kalibrační křivky připravené v 50% (v/v) metanolu.

4.3 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.3.1 Volba extrakčních podmínek

Pro extrakci fenolických sloučenin z namletých a sušených kávových zrn byla zvolena metoda extrakce v ultrazvukové lázni. Při tvorbě této metody se vycházelo z již dříve dostupných a optimalizovaných postupů s určitými úpravami [173][174]. Navržená metoda extrakce (kapitola 4.2.2) nebyla dále optimalizována, jelikož cílem této práce nebylo získat maximální možný výtěžek extrakce, nýbrž objasnit změny ve fenolickém profilu kávových zrn v průběhu jejich pražení.

4.3.2 Úprava a revalidace HPLC-MS/MS metody

Kromě volby extrakční metody bylo před vlastní analýzou vzorků potřeba upravit výchozí HPLC-MS/MS metodu (kapitola 2.2.2) a revalidovat ji v rámci návratnosti přídavek a matricových efektů. Pro tyto účely byla provedena identifikace látek u zelených a vybraných pražených kávových zrn výchozí HPLC-MS/MS metodou při záznamu všech

48 látek, včetně jejich kvalifikačních MRM přechodů. Na základě výsledků těchto analýz byly z výchozí metody vyřazeny MRM přechody látek, které nebyly identifikovány v žádném ze vzorků. Pro dosažení vyšší intenzity odezvy detekce a pro zjednodušení výsledných chromatogramů byly z výchozí metody rovněž odstraněny *QL* MRM přechody látek identifikovaných ve vybraných vzorcích.

Takto upravenou kvantifikační metodou byla proměřena externí kalibrační křivka standardů v rozpouštědle, kterým byl 50% (v/v) metanol. Při stejném koncentračním rozsahu byla proměřena interní kalibrační křivka, získaná konkrétními přídávky směsi standardů ke vzorku robusta (8 min) a odečtením plochy příslušného píku od průměrné plochy píku ($n = 3$) ve vzorku bez přídávku. Na základě poměru směrnic externí/interní kalibrační křivky byly určeny hodnoty matricových efektů (tabulka 14), které se pohybovaly v rozmezí 58,51 – 118,47 % s průměrnou hodnotou 90,43 %. Největšími matricovými efekty byl zatíženy pyrogallol, naopak u řady látek lze matricové efekty považovat za zanedbatelné.

Tabulka 14: Porovnání návratnosti identifikovaných látek v kávových zrnech za využití metody externí a interní kalibrace a velikost matricových efektů.

Látka	Návratnost - externí kalibrace (0,3 mg/l) [%]	Návratnost - interní kalibrace (0,3 mg/l) [%]	Matricové efekty [%]
4-ethylcatechol	78.83	85.31	92.41
4-methylcatechol	97.95	101.64	96.37
4-vinylfenol	108.37	91.48	118.47
Ethylester kyseliny kávové	98.87	106.75	92.61
Koniferyl aldehyd	76.49	98.63	77.55
Kyselina ferulová	91.73	101.80	90.11
Kyselina gentisová	67.11	96.12	69.82
Kyselina kávová	86.67	100.49	86.25
Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	101.45	102.15	99.32
Kyselina <i>p</i> -kumarová	95.01	102.27	92.90
Kyselina protocatechová	80.10	102.16	78.40
Kyselina salicylová	121.85	105.88	115.08
Kyselina syringová	75.90	97.93	77.51
Kyselina <i>trans</i> -skořicová	105.65	98.79	106.95
Kyselina vanilová	92.24	103.43	89.18
Kyselina veratrová	86.40	96.91	89.16
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyd	102.70	106.43	96.50
Protocatechový aldehyd	94.51	105.88	89.26
Pyrogallol	64.75	110.65	58.51
Skopoletin	89.85	102.93	87.29
Syringaldehyd	94.05	99.93	94.12
Vanilin	90.48	98.61	91.76

Interní kalibrační křivka byla dále využita pro určení správnosti metody, resp. návratnosti standardních přídavek (tabulka 14). Toto bylo provedeno dosažením průměrné plochy píku standardního přídávku ($n = 3$) na úrovni 0,3 mg/l do výsledné interní kalibrace. Byly získány návratnosti metody v rozmezí 85,31 – 110,65 %, kdy průměrná hodnota návratnosti činila 100,74 %. Návratnost menší než 90 %, resp. vyšší než 110 % byla zjištěna pouze v případě 4-vinylfenolu, resp. pyrogallolu. Plochy standardních přídavek (0,3 mg/l) ve vzorku robusta (8 min) byly rovněž využity pro ověření návratnosti externí kalibrace v rozpouštědle. Získané návratnosti metody externí kalibraci se pohybovaly v rozmezí 64,75 – 121,85 % s průměrnou hodnotou 90,95 %. Na základě těchto skutečností byla interní kalibrační křivka, získaná standardními přídávky ke vzorku robusta (8 min), využita pro kvantifikaci fenolických sloučenin našich vzorků.

4.3.3 Změny v profilu fenolických látek v průběhu pražení kávových zrn

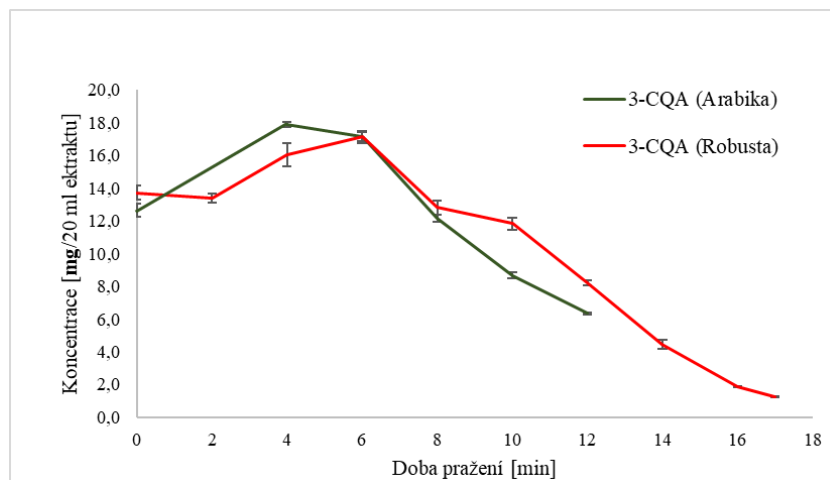
Extrakty kávových zrn byly proměřeny upravenou HPLC-MS/MS metodou. Z původního počtu 48 látek bylo v kávových zrnech identifikováno 25 fenolických sloučenin, přičemž z tohoto počtu nebyl u zelených kávových zrn identifikován pouze pyrogallol a 4-methylcatechol. Tyto dvě látky vznikaly až v průběhu pražení nebo byl jejich obsah na počátku pražení pod mezí detekce metody. Naopak v průběhu pražení nedocházelo ke kompletnímu zániku žádné ze sledovaných látek.

4.3.3.1 Chlorgenové kyseliny

Jako hlavní fenolická sloučenina kávových zrn byla v této práci identifikována kyselina chlorgenová, následovaná kyselinou neochlorgenovou a kyselinou kryptochlorgenovou, což bylo v minulosti prokázáno v rámci hned několika studií [130][131][133][134].

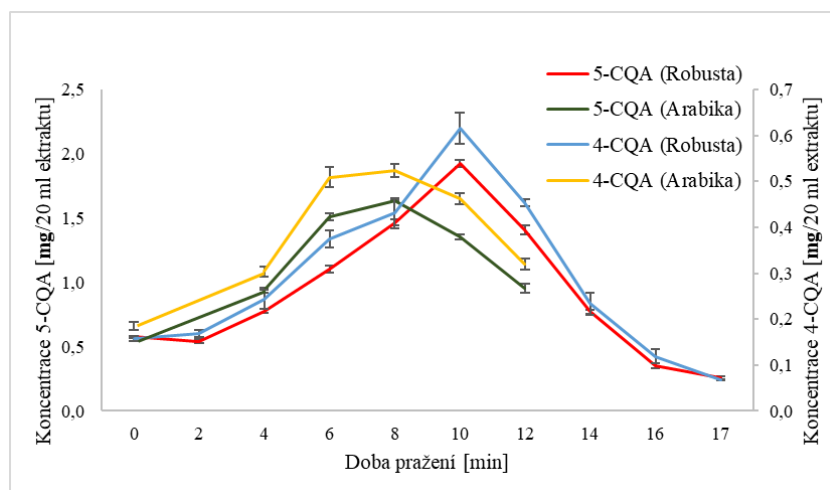
V průběhu pražení docházelo z počátku ke zvyšování koncentrace kyseliny chlorgenové (obrázek 21) až do dosažení doby pražení 6 minut. Poté obsah, resp. koncentrace 3-CQA začala klesat. Po uplynutí doby pražení 12 minut došlo ke snížení množství 3-CQA o 49,9 % u vzorku kávových zrn arabika, resp. o 40,3 % v případě kávových zrn robusta. Autoři studií zabývajících se změnou obsahu 3-CQA dospěli ke stejnému výsledku, nicméně obsah chlorgenových kyselin obvykle klesal ihned u 1. sledovaného stupně pražení. To mohlo být způsobeno odlišným návrhem experimentů, kdy autoři stanovovali obsah chlorgenových kyselin u zelených kávových zrn a následně až po obdržení prvního, tzv. lehkého pražení, což by v našem případě odpovídalo času pražení >8 minut. Navíc podobného výsledku dosáhli Hečimović a kol. [130], kteří u 2 ze 4 zkoumaných vzorků zjistili nejprve zvýšení obsahu

chlorgenových kyselin při dosažení úrovně lehkého pražení v porovnání s původními zelenými kávovými zrny. Tento nárůst obsahu by mohl být způsoben např. uvolněním chlorgenových kyselin z vázaných forem či buněčných struktur vlivem vysoké teploty.



Obrázek 21: Změny obsahu, resp. koncentrace kyseliny chlorgenové v průběhu pražení kávových zrn ($n = 3$).

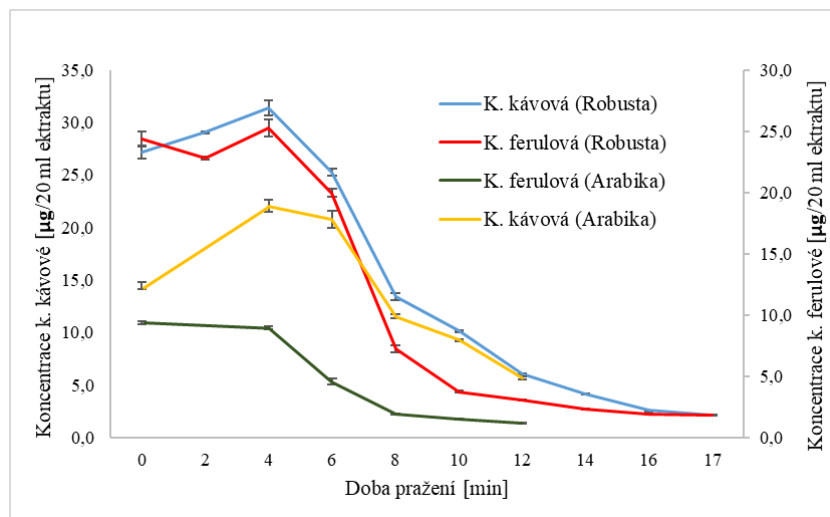
Podobné změny byly zaznamenány i v případě 4-CQA a 5-CQA (obrázek 22) jejichž koncentrace v extraktech se zvyšovala až do dosažení 8 minut pražení v případě vzorku arabika, resp. 10 minut u vzorku robusta. Delší doba růstu koncentrace těchto látek než v případě 3-CQA by mohla být vysvětlena izomerizací právě kyseliny chlorgenové, jakožto hlavní fenolické látky kávových zrn. Právě z tohoto důvodu se množství 4-CQA a 5-CQA nijak výrazně nelišilo u zelených kávových zrn a ve finálním produktu.



Obrázek 22: Změny obsahu, resp. koncentrace kyseliny neochlorgenové (5-CQA) a kyseliny kryptochlorgenové (4-CQA) v průběhu pražení kávových zrn ($n = 3$).

4.3.3.2 Ostatní fenolické kyseliny

Dalšími významnými fenolickými kyselinami kávových zrn, jejichž obsah se mění v důsledku pražení, byly prekurzory biosyntézy chlorogenových kyselin – kyselina kávová, kyselina ferulová (obrázek 23) a kyselina *p*-kumarová. Byl zjištěn výrazně vyšší obsah těchto kyselin u vzorku kávových zrn robusta. V průběhu pražení docházelo nejprve k mírnému růstu jejich koncentrace, podobně jako v případě 3-CQA. Po určitém čase byly tyto kyseliny degradovány vysokou teplotou, případně dalšími procesy.



Obrázek 23: Změny obsahu, resp. koncentrace kyseliny kávové a kyseliny ferulové v průběhu pražení kávových zrn ($n = 3$).

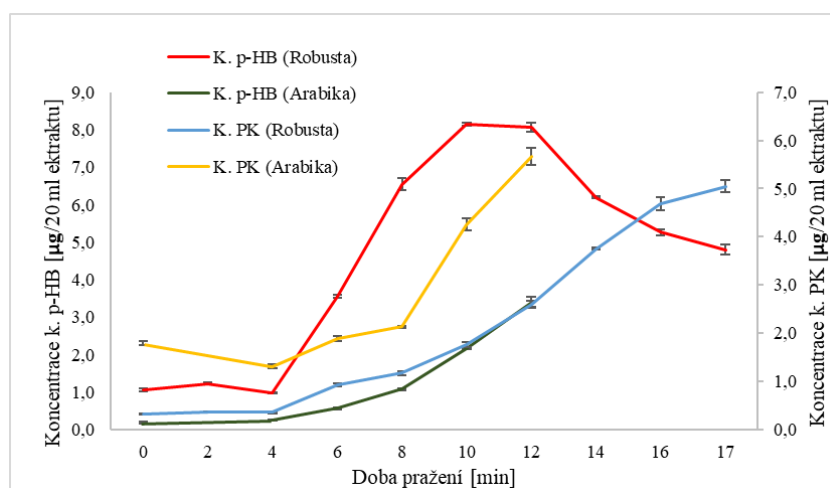
Perrone a kol. [134] se ve své studii zaměřili (mimo jiné) na změnu obsahu kyseliny kávové a kyseliny ferulové v průběhu pražení kávových zrn. U kyseliny kávové autoři zjistili ustavičné snižování jejího obsahu mezi 6. a 12. minutou pražení, a to o 60,9 – 78,3 % u 4 vzorků, což je v souladu s našimi výsledky při porovnání 6. a 12. minuty pražení (pokles o 76 % u vzorku arabika a o 72,7 % u vzorku robusta). Rozdílných výsledků dosáhli autoři v případě kyseliny ferulové, jejíž obsah v kávových zrnech byl výrazně menší než u kyseliny kávové, a navíc k degradaci kyseliny ferulové docházelo až v pozdních fázích pražení. Zcela odlišných výsledků dosáhli Somporn a kol. [132], v jejichž studii byl obsah kyseliny kávové a kyseliny ferulové na podobné úrovni, nicméně v průběhu pražení docházelo spíše ke zvyšování obsahu těchto látek.

V rámci této disertační práce byly dále identifikovány i kyseliny, jejichž obsah byl ve finálním produktu výrazně vyšší než u původních zelených kávových zrn. Jednou z takových kyselin byla kyselina *p*-hydroxybenzoová (obrázek 24), jejíž koncentrace se zvyšovala od 4. minuty pražení v obou vzorcích. V případě vzorku kávových zrn robusta docházelo od

12. minuty vlivem pokračujícího pražení k její degradaci. Při porovnání zelených kávových zrn a pražených zrn (12 min) došlo ke zvýšení obsahu kyseliny *p*-hydroxybenzoové o 1709 % u vzorku arabika, resp. o 662 % u vzorku kávových zrn robusta.

Další kyselinou, u které se zvyšovalo její množství v průběhu pražení, byla kyselina protokatechová (obrázek 24). Podobně jako u kyseliny *p*-hydroxybenzoové, koncentrace kyseliny protokatechové začala stoupat od 4. minuty pražení a to o 216 % u arabiky a o 707 % u robusty při porovnání zelených a pražených (12 min) kávových zrn. Růst množství kyseliny protokatechové a *p*-hydroxybenzoové je v souladu s výsledky dosaženými Sompornem a kol. [132].

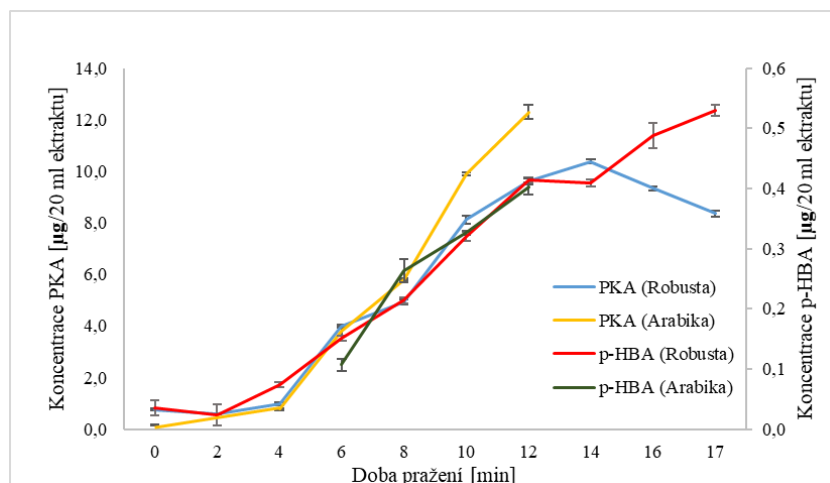
Jako další fenolické kyseliny zelených a pražených kávových zrn byly na relativně nízkých koncentračních hladinách v této práci identifikovány kyselina salicylová, kyselina gentisová, kyselina vanilová, kyselina veratrová, kyselina syringová a kyselina *trans*-skořicová.



Obrázek 24: Změny obsahu, resp. koncentrace kyseliny *p*-hydroxybenzoové (K. *p*-HB) a kyseliny protokatechové (K. PK) v průběhu pražení kávových zrn ($n = 3$).

4.3.3.3 Hydroxybenzaldehydy

Za jako hlavní fenolický aldehyd kávových zrn lze na základě dosažených výsledků považovat protokatechový aldehyd (obrázek 25), jehož koncentrace v extraktech se k 12. minutě pražení zvýšila o 6808 % v případě vzorku arabika, resp. o 1160 % u vzorku kávových zrn robusta, u kterého docházelo následně k poklesu koncentrace při déle trvajícím pražení.

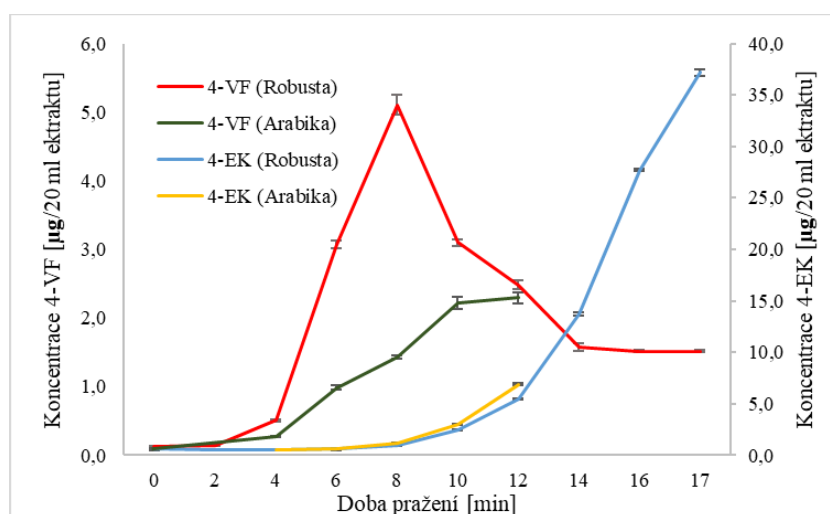


Obrázek 25: Změny obsahu, resp. koncentrace protokatechového aldehydu (PKA) a *p*-hydroxybenzaldehydu (*p*-HBA) v průběhu pražení kávových zrn ($n = 3$).

Dalším fenolickým aldehydem, jehož obsah v průběhu pražení strmě rostl byl *p*-hydroxybenzaldehyd (obrázek 25), nicméně koncentrace této látky v extraktech byla v porovnání s protokatechovým aldehydem velmi nízká. Růst obsahu těchto dvou aldehydů v průběhu pražení kávových zrn odpovídá dosaženým výsledkům jejich analogických kyselin, jak je zmíněno v kapitole 4.3.3.2. Dalšími identifikovanými aldehydy v kávových zrnech byly vanilin a syringaldehyd, jejichž obsah se v průběhu pražení spíše zvyšoval.

4.3.3.4 Alkylfenoly

V průběhu pražení zelených kávových zrn docházelo k výraznému zvýšení množství sledovaných alkylfenolů, konkrétně 4-vinylfenolu, 4-ethylcatecholu (obrázek 26) a 4-methylcatecholu.



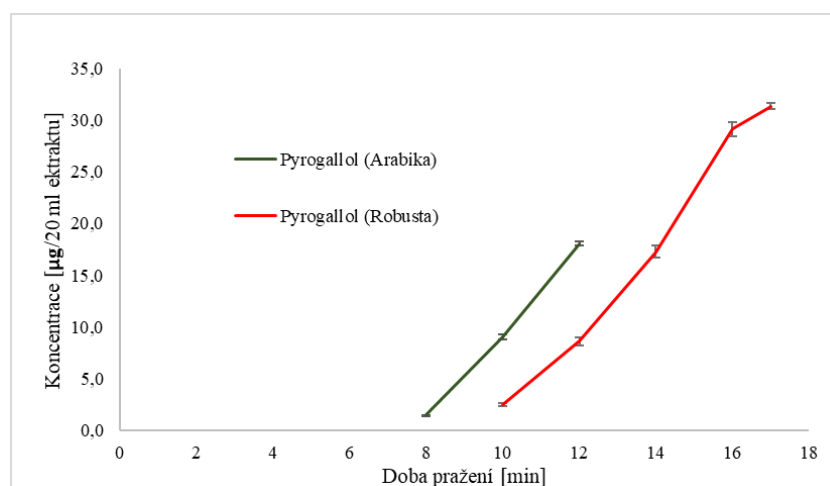
Obrázek 26: Změny obsahu, resp. koncentrace 4-vinylfenolu (4-VF) a 4-ethylcatecholu (4-EK) v průběhu pražení kávových zrn ($n = 3$).

4-vinylfenol byl již diskutován ve spojitosti s víny a vinnými octy v rámci kapitoly 3.3.4. V průběhu pražení bylo zaznamenáno zvýšení obsahu této látky zhruba o 2000 % u obou vzorků při porovnání zelených a pražených (12 min) kávových zrn. V případě vzorku robusta bylo dosaženo maxima již v 8. minutě pražení, pak koncentrace v extraktech začala klesat.

Fenolická sloučenina s názvem 4-ethylcatechol byla diskutována v rámci kapitoly 3.3.3, kde byl zmíněn její negativní vliv na sensorické vlastnosti potravin. U vzorku kávových zrn robusta došlo ke zvýšení jejího obsahu o 835 % ke 12. minutě pražení, nicméně pokud pražení probíhalo po delší dobu (17 min), množství 4-ethylcatecholu se zvýšilo až o více jak 6000 %, kdy při takovém množství již lze předpokládat citelný podíl na sensorických vlastnostech kávy. Při přepočtu koncentrace v extraktu kávových zrn robusta (17 min) na navážku a objem běžného expressa (7 g kávových zrn a 20 ml vody) a za předpokladu stejné extrakční účinnosti by koncentrace této látky v kávě činila 26 mg/l, což je výrazně vyšší hodnota, než která byla běžně pozorována u vzorků červeného vína [103].

4.3.3.5 Další fenolické látky

Významné změny během pražení kávových zrn byly pozorovány v případě pyrogallolu (obrázek 27). Pyrogallol byl vzhledem ke svému relativně vysokému limitu stanovení poprvé kvantifikován v 8. (arabika), resp. 10. minutě (robusta). Od této doby jeho obsah strmě rostl až do ukončení pražení v 12., resp. 17. minutě. Jeho koncentrace v extraktech po ukončení pražení byla srovnatelná s počáteční koncentrací kyseliny kávové či kyseliny ferulové u zelených kávových zrn. Prakticky lze vyloučit vznik pyrogallolu tepelnou degradací kyseliny galové, jelikož tato kyselina nebyla identifikována v žádném z testovaných vzorků.



Obrázek 27: Změny obsahu, resp. koncentrace pyrogallolu v průběhu pražení kávových zrn ($n = 3$).

Dalšími fenolickými látkami, které byly identifikovány v kávových zrnech, byly skopoletin koniferyl aldehyd a ethylester kyseliny kávové, jejichž obsah v průběhu pražení spíše rostl nebo nedosahoval výrazných změn. Jednalo se však o látky s minoritním zastoupením v kávových zrnech.

4.4 SHRNU TÍ

Ve čtvrté experimentální části byly sledovány změny v koncentraci fenolických sloučenin v průběhu pražení kávových zrn. Pro úpravu vzorků byla zvolena technika extrakce v ultrazvukové lázni. Získané metanolicke extrakty byly následně proměřeny upravenou HPLC-MS/MS metodou (resp. metodami). Na základě výsledků z této části lze tvrdit, že během procesu pražení může docházet ke snižování, ale také i ke zvyšování množství individuálních fenolických sloučenin. Prakticky od počátku pražení docházelo ke snižování množství kyseliny chlorgenové, kyseliny kávové a kyseliny ferulové. V případě kyseliny neochlorgenové a kyseliny kryptochlorgenové byl pozorován nejprve růst koncentrace v průběhu pražení a později její pokles. Během pražení kávových zrn také docházelo k více či méně strmému růstu koncentrace některých minoritních fenolických kyselin, aldehydů, alkyfenolů a pyrogallolu.

ZÁVĚR

Disertační práce přináší ucelený pohled na problematiku stanovení fenolických sloučenin v odlišných matricích rostlinného typu. Práce je členěna do čtyř na sebe navazujících kapitol, přičemž v každé této kapitole byla nejprve vypracována stručná rešerše, která napomáhá k lepšímu pochopení dané problematiky. Teoretické části práce řeší úvod do fenolických sloučenin včetně jejich klasifikace, moderní trendy v oblasti kapalinové chromatografie a spojení této techniky s hmotnostní spektrometrií, výrobu a stručné představení octů populárních ve střední Evropě a v neposlední řadě také uvedení do procesu pražení kávových zrn.

První experimentální část popisuje retenční chování vybraných zástupců fenolických sloučenin a hodnotí testované kolony z hlediska účinnosti a vhodnosti pro jejich použití při analytickém stanovení takových látek. Na základě výsledků první experimentální části byla zvolena kolona, která byla využita v druhé experimentální části, která se zabývá vývojem, optimalizací a validací HPLC-MS/MS metody pro stanovení 48 fenolických sloučenin. Vytvořená metoda byla následně použita pro určení fenolického profilu šesti různých druhů octa. Výsledky z této části poukazují na podobnosti a odlišnosti v rámci různých typů octa a porovnávají dosažené výsledky s již publikovanými pracemi. Tato část představuje rozšíření, k již publikované práci, jejímž cílem bylo určit fenolické profily balzamikových octů různé kvality. Poslední experimentální část přináší rozšířený pohled na osudy fenolických látek během procesu pražení kávových zrn. Zatímco dosud publikované práce se zaměřovaly zejména na stanovení chlorgenových kyselin, tato disertační práce rozšiřuje a objasňuje změny v množství fenolických sloučenin s minoritním zastoupením v kávových zrnech.

Dosažené výsledky ze čtvrté části budou využity pro tvorbu publikace, jejíž součástí budou změny v koncentracích nejen fenolických sloučenin, ale také vybraných furanických látek, aminokyselin, sacharidů, organických kyselin a těkavých organických látek, přičemž některé z těchto skupin byly již řešeny (v souvislosti s kávovými zrny) v rámci diplomových prací, na kterých se autor této disertační práce podílel jako konzultant. Cílem práce (resp. prací) bude objasnit změny v množství těchto látek v souvislosti s různými průběhy (parametry) křivky pražení, skladováním pražených kávových zrn a s určením geografického původu na základě analýz velkého množství vzorků zelených kávových zrn.

ZDROJE

- [1] ROCCHETTI, Gabriele; GREGORIO, R. P.; LORENZO, J. M.; BARBA, F. J.; OLIVEIRA, P. G. a kol. Functional implications of bound phenolic compounds and phenolics–food interaction: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2022, 21, 2, 811-842. DOI: 10.1111/1541-4337.12921.
- [2] DE LA ROSA, L. A.; MORENO-ESCAMILLA, J. O.; RODRIGO-GARCÍA, J. a ALVAREZ-PARRILLA, E. Phenolic Compounds. Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables. *Elsevier*, 2019, 253-271. DOI: 10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9.
- [3] BABENKO, L. M.; SMIRNOV, O. E.; ROMANENKO, K. O.; TRUNOVA, O. K. a KOSAKIVSKA, I. V. Phenolic compounds in plants: biogenesis and functions. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2019, 91, 3, 5-18. DOI: 10.15407/ubj91.03.005.
- [4] ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. a SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*. 2014, 152, 46-55. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.11.093.
- [5] VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Phenolic Compound Biochemistry. *Dordrecht: Springer Netherlands*, 2006. DOI: 10.1007/978-1-4020-5164-7.
- [6] TSIMOGIANNIS, D. a OREOPOULOU, V. Classification of Phenolic Compounds in Plants. Polyphenols in Plants. *Elsevier*, 2019, 263-284. DOI: 10.1016/B978-0-12-813768-0.00026-8.
- [7] PERVEEN, S. a AL-TAWEEL, A. M. Phenolic Compounds from the Natural Sources and Their Cytotoxicity. SOTO-HERNÁNDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M. a GARCIA-MATEOS, M. R. (ed.). Phenolic Compounds – Natural Sources, Importance and Applications. *InTech*, 2017. DOI: 10.5772/66898.
- [8] KUMAR, N. a GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*. 2019, 24. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00370.
- [9] MUÑOZ, C.; HOFFMANN, T.; ESCOBAR, N. M.; LUDEMANN, F.; BOTELLA, M. A. a kol. The Strawberry Fruit Fra a Allergen Functions in Flavonoid Biosynthesis. *Molecular Plant*. 2010, 3, 1, 113-124. DOI: 10.1093/mp/ssp087.
- [10] FRAGA, C. G. (ed.). Plant Phenolics and Human Health. *Wiley*, 2009. DOI: 10.1002/9780470531792.
- [11] KAURINOVIC, B. a VASTAG, D. Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants. SHALABY, E. (ed.). Antioxidants. *IntechOpen*, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.83731.
- [12] LIMA, M. C.; PAIVA DE SOUSA, C.; FERNANDEZ-PRADA, C.; HAREL, J.; DUBREUIL, J. D. a kol. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*. 2019, 130, 259-270. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.03.025.
- [13] RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M. a kol. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 2000, 56, 1, 3-12. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00218-X.
- [14] LEYVA-JIMENEZ, F. J.; LOZANO-SANCHEZ, J.; BORRAS-LINARES, I.; CADIZ-GURREA, M. L. a MAHMOODI-KHALEDI, E. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. *Food Science and Technology*. 2019, 101, 236-245. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.11.015.
- [15] SILVA, V.; IGREJAS, G.; FALCO, V.; SANTOS, T. P.; TORRES, C. a kol. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*. 2018, 92, 516-522. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.05.031.
- [16] GHASEMIAN, M.; OWLIA, S. a OWLIA, M. B. Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2016, 2016, 1-11. DOI: 10.1155/2016/9130979.
- [17] KUMAR, V.; ABBAS, A. a ASTER (ed.). Robbins Basic Pathology. 10. *Elsevier*, 2017. ISBN 0323353177.

- [18] AMBRIZ-PÉREZ, D. L.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIERREZ-GRIJALVA, E. P.; HEREDIA, J. B. a YILDIZ, F. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*. 2016, 2, 1. DOI: 10.1080/23311932.2015.1131412.
- [19] CUONG, T. D.; HUNG, T. M.; LEE, J. S.; WEON, K. Y.; WOO, M. H. a kol. Anti-inflammatory activity of phenolic compounds from the whole plant of *Scutellaria indica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015, 25, 5, 1129-1134. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.12.055.
- [20] TSVET, M. S. On a new category of adsorption phenomena and on its application to biochemical analysis. *Proceedings of the Warsaw Society of Naturalists*. 1905, 14, 6, 20-39.
- [21] TOUCHSTONE, J. C. History of Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. 1993, 16, 8, 1647-1665. DOI: 10.1080/10826079308021679.
- [22] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. a ČESLA, P. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: *Česká chromatografická škola*, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [23] NAZARIO, C. E. D.; SILVA, M. R.; FRANCO, M. S. a LANÇAS, F. M. Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: An overview. *Journal of Chromatography A*. 2015, 1421, 18-37. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.08.051.
- [24] LYNCH, K. B.; CHEN, A. a LIU, S. Miniaturized high-performance liquid chromatography instrumentation. *Talanta*. 2018, 177, 94-103. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.09.016.
- [25] SAITO, Y.; JINNO, K. a GREIBROKK, T.. Capillary columns in liquid chromatography: between conventional columns and microchips. *Journal of Separation Science*. 2004, 27, 17-18, 1379-1390. DOI: 10.1002/jssc.200401902.
- [26] FAURE, K. Liquid chromatography on chip. *Electrophoresis*. 2010, 31, 15, 2499-2511. DOI: 10.1002/elps.201000051.
- [27] HAGHIGHI, F.; TALEBPOUR, Z. a NEZHAD, A. S. Towards fully integrated liquid chromatography on a chip: Evolution and evaluation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2018, 105, 302-337. DOI: 10.1016/j.trac.2018.05.002.
- [28] CHESTER, T. L. Recent Developments in High-Performance Liquid Chromatography Stationary Phases. *Analytical Chemistry*. 2013, 85, 2, 579-589. DOI: 10.1021/ac303180y.
- [29] GONZÁLEZ-RUIZ, V.; OLIVES, A. I. a MARTÍN, M. A. Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015, 64, 17-28. DOI: 10.1016/j.trac.2014.08.008.
- [30] CABRERA, K. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science*. 2004, 27, 10-11, 843-852. DOI: 10.1002/jssc.200401827.
- [31] KOBAYASHI, H.; IKEGAMI, T.; KIMURA, H.; HARA, T.; TOKUDA, D. a kol. Properties of Monolithic Silica Columns for HPLC. *Analytical Sciences*. 2006, 22, 4, 491-501. DOI: 10.2116/analsci.22.491.
- [32] ZHANG, L.; DAI, Q.; QIAO, X.; YU, C.; QIN, X. a kol. Mixed-mode chromatographic stationary phases: Recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016, 82, 143-163. DOI: 10.1016/j.trac.2016.05.011.
- [33] CACCIOLA, F.; DUGO, P. a MONDELLO, L. Multidimensional liquid chromatography in food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2017, 96, 116-123. DOI: 10.1016/j.trac.2017.06.009.
- [34] DUGO, P.; CACCIOLA, F.; KUMM, T.; DUGO, G. a MONDELLO, L. Comprehensive multidimensional liquid chromatography: Theory and applications. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1184, 1-2, 353-368. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.06.074.
- [35] CACCIOLA, F.; DONATO, P.; SCIARRONE, D.; DUGO, P. a MONDELLO, L. Comprehensive Liquid Chromatography and Other Liquid-Based Comprehensive Techniques Coupled to Mass Spectrometry in Food Analysis. *Analytical Chemistry*. 2017, 89, 1, 414-429. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04370.
- [36] TAYLOR, L. T. Supercritical Fluid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2010, 82, 12, 4925-4935. DOI: 10.1021/ac101194x.

- [37] KHODDAMI, A.; WILKES, M. a ROBERTS, T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 2013, 18, 2, 2328-2375. DOI: 10.3390/molecules18022328.
- [38] STEEVENSZ, A. J.; MACKINNON, S. L.; HANKINSON, R.; CRAFT, C.; CONNAN, S. a kol. Profiling Phlorotannins in Brown Macroalgae by Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*. 2012, 23, 5, 547-553. DOI: 10.1002/pca.2354.
- [39] SENTKOWSKA, A.; BIESAGA, M. a PYRZYNSKA, K. Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography for the Quantification of Flavonoids in Genista tinctoria Extract. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2016, 2016, 1-9. DOI: 10.1155/2016/3789348.
- [40] CACCIOLA, F.; JANDERA, P.; HAJDÚ, Z.; ČESLA, P. a MONDELLO, L. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with parallel gradients for separation of phenolic and flavone antioxidants. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1149, 1, 73-87. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.119.
- [41] KULA, M.; GŁÓD, D. a KRAUZE-BARANOWSKA, M. Two-dimensional liquid chromatography (LC) of phenolic compounds from the shoots of Rubus idaeus ‘Glen Ample’ cultivar variety. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, 121, 99-106. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.12.047.
- [42] JANDERA, P. a HÁJEK, T. A New Definition of the Stationary Phase Volume in Mixed-Mode Chromatographic Columns in Hydrophilic Liquid Chromatography. *Molecules*. 2021, 26, 16. DOI: 10.3390/molecules26164819.
- [43] ARDREY, R. E. Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction. *Analytical Techniques in the Sciences*. New York: Wiley, 2003. DOI: 10.1002/0470867299.
- [44] PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G. J. E. a KOMAITIS, M. RP-HPLC Analysis of the Phenolic Compounds of Plant Extracts. Investigation of Their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, 4, 1190-1195. DOI: 10.1021/jf040083t.
- [45] XU, C. C.; WANG, B.; PU, Y. Q.; TAO, J. S. a ZHANG, T. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 2017, 15, 10, 721-731. DOI: 10.1016/S1875-5364(17)30103-6.
- [46] SKENDI, A.; IRAKLI, M. a CHATZOPOULOU, P. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2017, 6, 62-69. DOI: 10.1016/j.jarmap.2017.02.001.
- [47] PROESTOS, C.; SERELI, D. a KOMAITIS, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chemistry*. 2006, 95, 1, 44-52. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.12.016.
- [48] PINELLI, P.; IERI, F.; VIGNOLINI, P.; BACCI, L.; BARONTI, S. a kol. Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibers of *Urtica dioica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56, 19, 9127-9132. DOI: 10.1021/jf801552d.
- [49] SONG, J. G.; CAO, C.; LI, J.; XU, Y. J. a LIU, Y.. Development and Validation of a QuEChERS-LC-MS/MS Method for the Analysis of Phenolic Compounds in Rapeseed Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019, 67, 14, 4105-4112. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00029.
- [50] MYRTSI, E. D.; KOULOCHERI, S. D.; ILIOPOULOS, V. a HAROUTOUNIAN, S. A. High-Throughput Quantification of 32 Bioactive Antioxidant Phenolic Compounds in Grapes, Wines and Vinification Byproducts by LC–MS/MS. *Antioxidants*. 2021, 10, 8. DOI: 10.3390/antiox10081174.
- [51] BARNABA, C.; DELLACASSA, E.; NICOLINI, G.; NARDIN, T.; MALACARNE, M. a kol. Identification and quantification of 56 targeted phenols in wines, spirits, and vinegars by online solid-phase extraction – ultrahigh-performance liquid chromatography – quadrupole-orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2015, 1423, 124-135. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.10.085.
- [52] NOVÁKOVÁ, L.; DOUŠA, M. a ČESLA, P. Moderní HPLC separace v teorii a praxi II. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: *Česká chromatografická škola*, 2021. ISBN 978-80-270-8560-6.
- [53] BOURGEOIS, J. F. a BARJA, F. The history of vinegar and of its acetification systems. *Archives Des Sciences Journal*. 2009, 62, 2, 147-160.
- [54] EUROPEAN COMMISSION. Rules on the quality of vinegar and diluted acetic acid. 2021.

- [55] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Vinegar, Definitions. Rok vydání neuveden.
- [56] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES. Ordinance on the marketing of vinegar and vinegar essence. 2017.
- [57] SOLIERI, L. a GIUDICI, P. (ed.). Vinegars of the World Milano: *Springer Milan*, 2009. ISBN 978-88-470-0865-6.
- [58] SHIMELIS, E. Vinegar Production Technology – An Overview. *Beverage and Food World*. 2012, 29-32.
- [59] GRÉGROVÁ, A.; ČÍŽKOVÁ, H.; MAZÁČ, J. a VOLDŘICH, M. Hodnocení autenticity kvasného lihového octa (část I): Způsoby výroby a metody analýzy. *Kvasný průmysl*. 2012, 58, 10, 309-312.
- [60] LUZÓN-QUINTANA, L. M.; CASTRO, R. a DURÁN-GUERRERO, E. Biotechnological Processes in Fruit Vinegar Production. *Foods*. 2021, 10, 5. DOI: 10.3390/foods10050945.
- [61] HAILU, S.; ADMASSU, S. a JHA, Y. K. Vinegar production technology—An overview. *Beverage Food World*. 2012, 2, 29-32.
- [62] GULLO, M.; VERZELLONI, E. a CANONICO, M. Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: Process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry*. 2014, 49, 10, 1571-1579. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.07.003.
- [63] KADLEC, P. Technologie potravin II. Praha: *VŠCHT*, 2002. ISBN 978-80-7080-510-7.
- [64] Vyhláška č. 248/2018 Sb.: O požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí, část šestá. 2018.
- [65] GRÉGROVÁ, A.; ČÍŽKOVÁ, H.; MAZÁČ, J. a VOLDŘICH, M. Hodnocení autenticity kvasného lihového octa (část II): Analýza vzorků z tržní sítě. *Kvasný průmysl*. 2012, 58, 11, 350-354.
- [66] European Cider Trends 2021. *The European Cider & Fruit Wine Association*. 2021.
- [67] LEA, A. G. H. Cider Vinegar. DOWNING, D. L. (ed.). Processed Apple Products. New York, NY: *Springer US*, 1989, 279-301. ISBN 978-1-4684-8227-0.
- [68] MARTINI, N. Apple cider vinegar. *Journal of Primary Health Care*. 2021, 13, 2, 191-192. DOI: 10.1071/HC19561.
- [69] TRIPATHI, S. a MAZUMDER, P. M.. Apple Cider Vinegar (ACV) and their Pharmacological Approach towards Alzheimer's Disease (AD): A Review. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2020, 54, 2, 67-74. DOI: 10.5530/ijper.54.2s.62.
- [70] TAWEEKASEMSOMBUT, S.; TINOI, J.; MUNGKORNASAWAKUL, P. a CHANDET, N. Thai Rice Vinegars: Production and Biological Properties. *Applied Sciences*. 2021, 11, 13. DOI: 10.3390/app11135929.
- [71] NANDA, K.; TANIGUCHI, M.; UJIKE, S.; ISHIHARA, N.; MORI, H. a kol. Characterization of Acetic Acid Bacteria in Traditional Acetic Acid Fermentation of Rice Vinegar (Komesu) and Unpolished Rice Vinegar (Kurosu) Produced in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67, 2, 986-990. DOI: 10.1128/AEM.67.2.986-990.2001.
- [72] HSIEH, C. W.; LU, Y. R.; LIN, S. M.; LAI, T. Y. a CHIOU, R. Y. Y. Stability of Monacolin K and Citrinin and Biochemical Characterization of Red-Koji Vinegar during Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61, 30, 7276-7283. DOI: 10.1021/jf401542q.
- [73] NANDA, K.; MIYOSHI, N.; NAKAMURA, Y.; SHIMOJI, Y.; TAMURA, Y. a kol. Extract of Vinegar "Kurosu" from Unpolished Rice Inhibits the Proliferation of Human Cancer Cells. *Journal of experimental and clinical cancer research*. 2004, 23, 1, 69-75.
- [74] NISHIDAI, S.; NAKAMURA, Y.; TORIKAI, K.; YAMAMOTO, M.; ISHIHARA, N. a kol. Kurosu, a Traditional Vinegar Produced from Unpolished Rice, Suppresses Lipid Peroxidation in Vitro and in Mouse Skin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2014, 64, 9, 1909-1914. DOI: 10.1271/bbb.64.1909.
- [75] EUROPEAN COMMISSION. COMMISSION REGULATION (EC) No 583/2009 of 3 July 2009 entering a name in the register of protected designations of origin and protected geographical indications [Aceto Balsamico di Modena (PGI)]. 2009.

- [76] GIUDICI, P.; LEMMETTI, F. a MAZZA, S. Balsamic Vinegars. *Springer International Publishing*, 2015. ISBN 978-3-319-13757-5.
- [77] TESFAYE, W.; MORALES, M. L.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. a TRONCOSO, A. M. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*. 2002, 13, 1, 12-21. DOI: 10.1016/S0924-2244(02)00023-7.
- [78] MORALES, L.; GONZÁLEZ, G.; CASAS, J. a TRONCOSO, A. Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: influence of acetification and aging. *European Food Research and Technology*. 2001, 212, 6, 676-682. DOI: 10.1007/s002170100301.
- [79] SAYGI, K. Ö. Determination of Some Phenolic Compounds from Commercial Wine Vinegar Samples in Turkey by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of New Results in Science*. 2017, 6, 2, 41-46.
- [80] BUDAK, H. N. a GUZEL-SEYDIM, Z. B. Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010. DOI: 10.1002/jsfa.4047.
- [81] CRUZ, M.; CORREIA, A. C.; GONÇALVES, F. J. a JORDÃO, A. M. Phenolic composition and total antioxidant capacity analysis of red wine vinegars commercialized in Portuguese market. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 2018, 33, 2, 102-115. DOI: 10.1051/ctv/20183302102.
- [82] CEJUDO-BASTANTE, M. J.; DURÁN-GUERRERO, E.; NATERA-MARÍN, R.; CASTRO-MEJÍAS, R. a GARCÍA-BARROSO, C. Characterisation of commercial aromatised vinegars: phenolic compounds, volatile composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, 93, 6, 1284-1302. DOI: 10.1002/jsfa.5885.
- [83] LANCELLOTTI, L.; ULRICI, A.; SIGHINOLFI, S. a MARCHETTI, A. Chemical Characterization Of Commercial Balsamic Vinegar Glaze. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2020, 94. DOI: 10.1016/j.jfca.2020.103620.
- [84] BAKIR, S.; TOYDEMİR, G.; BOYACIOĞLU, D.; BEEKWILDER, J. a CAPANOĞLU, E. Fruit Antioxidants during Vinegar Processing: Changes in Content and in Vitro Bio-Accessibility. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016, 17, 10. DOI: 10.3390/ijms17101658.
- [85] COSMULESCU, S.; STOENESCU, A. M.; TRANDAFIR, I. a TUȚULESCU, F. Comparison of Chemical Properties between Traditional and Commercial Vinegar. *Horticulturae*. 2022, 8, 3. DOI: 10.3390/horticulturae8030225.
- [86] KELEBEK, H.; KADIROĞLU, P.; DEMIRCAN, N. B. a SELLI, S. Screening of bioactive components in grape and apple vinegars: Antioxidant and antimicrobial potential. *Journal of the Institute of Brewing*. 2017, 123, 3, 407-416. DOI: 10.1002/jib.432.
- [87] EL ABDALI, Y.; SAGHROUCHNI, H.; KARA, M.; MSSILLOU, I.; ALLALI, A. a kol. Exploring the Bioactive Compounds in Some Apple Vinegar Samples and Their Biological Activities. *Plants*. 2023, 12, 22. DOI: 10.3390/plants12223850.
- [88] ZHANG, B.; XIA, T.; DUAN, W.; ZHANG, Z.; LI, Y. a kol. Effects of Organic Acids, Amino Acids and Phenolic Compounds on Antioxidant Characteristic of Zhenjiang Aromatic Vinegar. *Molecules*. 2019, 24, 20. DOI: 10.3390/molecules24203799.
- [89] BAKIR, S.; DEVECIOĞLU, D.; KAYACAN, S.; TOYDEMİR, G.; KARBANCIOĞLU-GULER, F. a kol. Investigating the antioxidant and antimicrobial activities of different vinegars. *European Food Research and Technology*. 2017, 243, 12, 2083-2094. DOI: 10.1007/s00217-017-2908-0.
- [90] NAGASHIMA, M. a SAITO, K. Antioxidant activity of the new black vinegar "IZUMI.". *The journal of nutrition, health & aging*. 2010, 14, 10, 845-849. DOI: 10.1007/s12603-010-0138-2.
- [91] XU, Q.; TAO, W. a AO, Z. Antioxidant activity of vinegar melanoidins. *Food Chemistry*. 2007, 102, 3, 841-849. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.06.013.
- [92] BUDAK, H. N. Alteration of Antioxidant Activity and Total Phenolic Content during the Eight-Week Fermentation of Apple Cider Vinegar. *Horticultural Studies*. 2021, 38, 1, 39-45. DOI: 10.16882/hortis.882469.

- [93] UBEDA, C.; HIDALGO, C.; TORIJA, M. J.; MAS, A.; TRONCOSO, A. M. a kol. Evaluation of antioxidant activity and total phenols index in persimmon vinegars produced by different processes. *Food Science and Technology*. 2011, 44, 7, 1591-1596. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.03.001.
- [94] KARA, M.; ASSOUGUEM, A.; FADILI, M. E.; BENMESSAOUD, S.; ALSHAWWA, S. Z. a kol. Contribution to the Evaluation of Physicochemical Properties, Total Phenolic Content, Antioxidant Potential, and Antimicrobial Activity of Vinegar Commercialized in Morocco. *Molecules*. 2022, 27, 3.. DOI: 10.3390/molecules27030770.
- [95] JANG, Y. K.; LEE, M. Y.; KIM, H. Y.; LEE, S.; YEO, S. H. a kol. Comparison of Traditional and Commercial Vinegars Based on Metabolite Profiling and Antioxidant Activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, 25, 2, 217-226. DOI: 10.4014/jmb.1408.08021.
- [96] RUAN, X.; ZHANG, S.; SONG, W.; LIU, J.; CHEN, X. a kol. Efficient synthesis of tyrosol from L-tyrosine via heterologous Ehrlich pathway in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2022, 47, 18-30. DOI: 10.1016/j.cjche.2021.05.026.
- [97] ROMBOLI, Y.; MANGANI, S.; BUSCIONI, G.; GRANCHI, L. a VINCENZINI, M. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida zemplinina* on quercetin, vitisin A and hydroxytyrosol contents in Sangiovese wines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2015, 31, 7, 1137-1145. DOI: 10.1007/s11274-015-1863-9.
- [98] CHEN, M.; ZHAO, Y. a YU, S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*. 2015, 172, 543-550. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.110.
- [99] RICIPUTI, Y.; DIAZ-DE-CERIO, E.; AKYOL, H.; CAPANOGLU, E.; CERRETANI, L. a kol. Establishment of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from industrial potato by-products using response surface methodology. *Food Chemistry*. 2018, 269, 258-263. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.154.
- [100] NAVARRE, D. A.; PILLAI, S. S.; SHAKYA, R. a HOLDEN, M. J. HPLC profiling of phenolics in diverse potato genotypes. *Food Chemistry*. 2011, 127, 1, 34-41. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.12.080.
- [101] HUANG, Y.; LU, W. W.; CHEN, B.; WU, M. a LI, S. G. Determination of 13 Phenolic Compounds in Rice Wine by High-Performance Liquid Chromatography. *Food Analytical Methods*. 2015, 8, 4, 825-832. DOI: 10.1007/s12161-014-9939-y.
- [102] BURON, N.; GUICHARD, H.; COTON, E.; LEDAUPHIN, J. a BARILLIER, D. Evidence of 4-ethylcatechol as one of the main phenolic off-flavour markers in French ciders. *Food Chemistry*. 2011, 125, 2, 542-548. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.046.
- [103] MILHEIRO, J.; FILIPE-RIBEIRO, L.; VILELA, A.; COSME, F. a NUNES, F. M. 4-Ethylphenol, 4-ethylguaiaicol and 4-ethylcatechol in red wines: Microbial formation, prevention, remediation and overview of analytical approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019, 59, 9, 1367-1391. DOI: 10.1080/10408398.2017.1408563.
- [104] LIU, Q.; TANG, G. Y.; ZHAO, C. N.; GAN, R. Y. a LI, H. B. Antioxidant Activities, Phenolic Profiles, and Organic Acid Contents of Fruit Vinegars. *Antioxidants*. 2019, 8, 4. DOI: 10.3390/antiox8040078.
- [105] NICOLIS, E.; LAMPONENTI, I.; DECHECCHI, M. C.; BORGATTI, M.; TAMANINI, A. a kol. Pyrogallol, an active compound from the medicinal plant *Emblica officinalis*, regulates expression of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells. *International Immunopharmacology*. 2008, 8, 12, 1672-1680. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.08.001.
- [106] SINGH, G. a KUMAR, P. Extraction, gas chromatography-mass spectrometry analysis and screening of fruits of *Terminalia chebula* Retz. for its antimicrobial potential. *Pharmacognosy Research*. 2013, 5, 3. DOI: 10.4103/0974-8490.112421.
- [107] ARMSTRONG, S. M. a PATEL, T. R. Microbial degradation of phloroglucinol and other polyphenolic compounds. *Journal of Basic Microbiology*. 1994, 34, 2, 123-135. DOI: 10.1002/jobm.3620340208.
- [108] BOLES, J. S.; CRERAR, D. A.; GRISSOM, G. a KEY, T. C. Aqueous thermal degradation of gallic acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1988, 52, 2, 341-344. DOI: 10.1016/0016-7037(88)90089-0.

- [109] CERESO, A. B.; TESFAYE, W.; TORIJA, M. J.; MATEO, E.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. a kol. The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods. *Food Chemistry*. 2008, 109, 3, 606-615. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.01.013.
- [110] PÉREZ-JUAN, P. M. a LUQUE DE CASTRO, M. D. Use of Oak Wood to Enrich Wine with Volatile Compounds. Processing and Impact on Active Components in Food. *Elsevier*, 2015, 471-481. ISBN 9780124046993.
- [111] NATERA, R.; CASTRO, R.; MARÍA DE VALME G. M.; HERNÁNDEZ, M. J. a GARCÍA-BARROSO, C. Chemometric Studies of Vinegars from Different Raw Materials and Processes of Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51, 11, 3345-3351. DOI: 10.1021/jf021180u.
- [112] FARAH, A. a FERREIRA DOS SANTOS, T. The Coffee Plant and Beans. Coffee in Health and Disease Prevention. *Elsevier*, 2015, 5-10. ISBN 9780124095175.
- [113] Coffee, Tea, Cocoa. Food Chemistry. Berlin, *Springer Berlin Heidelberg*, 2009, 938-970. ISBN 978-3-540-69933-0.
- [114] Coffee report and outlook. International Coffee Organization, 2023.
- [115] Spotřeba potravin a nealkoholických nápojů (na obyvatele za rok). Český statistický úřad, 2023.
- [116] KLEINWÄCHTER, M.; BYTOF, G. a SELMAR, D. Coffee Beans and Processing. Coffee in Health and Disease Prevention. *Elsevier*, 2015, 73-81. ISBN 9780124095175.
- [117] SERA, T.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. a ROUSSOS, S. (ed.). Coffee Biotechnology and Quality. *Dordrecht: Springer Netherlands*, 2000. ISBN 978-90-481-5565-1.
- [118] LOUZADA PEREIRA, L. a RIZZO MOREIRA, T. (ed.). Quality Determinants In Coffee Production. Food Engineering Series. *Springer International Publishing*, 2021. ISBN 978-3-030-54436-2.
- [119] STAROWICZ, M. a ZIELIŃSKI, H. How Maillard Reaction Influences Sensorial Properties (Color, Flavor and Texture) of Food Products?. *Food Reviews International*. 2019, 35, 8, 707-725. DOI: 10.1080/87559129.2019.1600538.
- [120] MEHARI, B.; CHANDRAVANSI, B. S.; REDI-ABSHIRO, M.; COMBRINCK, S.; MCCRINDLE, R. a kol. Polyphenol contents of green coffee beans from different regions of Ethiopia.. *International Journal of Food Properties*. 2021, 24, 1, 17-27. DOI: 10.1080/10942912.2020.1858866.
- [121] ALONSO-SALCES, R. M.; SERRA, F.; RENIERO, F. a HÉBERGER, K. Botanical and Geographical Characterization of Green Coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*): Chemometric Evaluation of Phenolic and Methylxanthine Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, 57, 10, 4224-4235. DOI: 10.1021/jf8037117.
- [122] MEHARI, B.; REDI-ABSHIRO, M.; CHANDRAVANSI, B. S.; COMBRINCK, S.; ATLABACHEW, M. a kol. Profiling of phenolic compounds using UPLC–MS for determining the geographical origin of green coffee beans from Ethiopia. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016, 45, 16-25. DOI: 10.1016/j.jfca.2015.09.006.
- [123] MUSSATTO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S. a TEIXEIRA, J. A. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*. 2011, 83, 173-179. DOI: 10.1016/j.seppur.2011.09.036.
- [124] SEO, H. S. a PARK, B. H. Phenolic compound extraction from spent coffee grounds for antioxidant recovery. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2019, 36, 2, 186-190. DOI: 10.1007/s11814-018-0208-4.
- [125] OKUR, I.; SOYLER, B.; SEZER, P.; OZTOP, M. H. a ALPAS, H. Improving the Recovery of Phenolic Compounds from Spent Coffee Grounds (SCG) by Environmentally Friendly Extraction Techniques. *Molecules*. 2021, 26, 3. DOI: 10.3390/molecules26030613.
- [126] SILVA, M. O.; HONFOGA, J. N. B.; MEDEIROS, Lorena Lucena de; MADRUGA, Marta Suely a BEZERRA, Taliana Kênia Alencar. Obtaining Bioactive Compounds from the Coffee Husk (*Coffea arabica* L.) Using Different Extraction Methods. *Molecules*. 2021, 26, 1. DOI: 10.3390/molecules26010046.

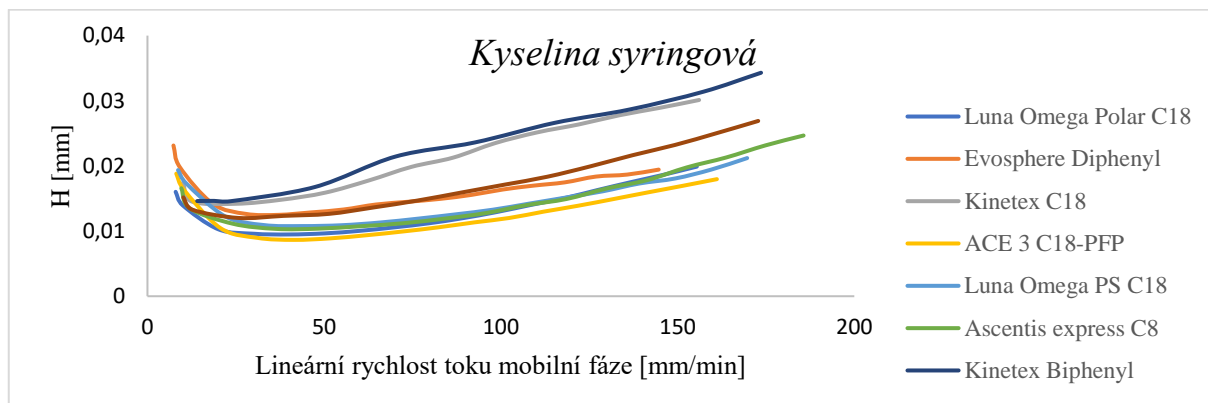
- [127] SOLOMAKOU, N.; LOUKRI, A.; TSAFRAKIDOU, P.; MICHAELIDOU, A. M.; MOURTZINOS, I. A kol. Recovery of phenolic compounds from spent coffee grounds through optimized extraction processes. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 2022, 25. DOI: 10.1016/j.scp.2021.100592.
- [128] KRÓL, K.; GANTNER, M.; TATARAK, A. a HALLMANN, E. The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *European Food Research and Technology*. 2020, 246, 1, 33-39. DOI: 10.1007/s00217-019-03388-9.
- [129] WU, H.; LU, P.; LIU, Z.; SHARIFI-RAD, J. a SULERIA, H. A. R. Impact of roasting on the phenolic and volatile compounds in coffee beans. *Food Science & Nutrition*. 2022, 10, 7, 2408-2425. DOI: 10.1002/fsn3.2849.
- [130] HEČIMOVIĆ, I.; BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; HORŽIĆ, D. a KOMES, D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chemistry*. 2011, 129, 3, 991-1000. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.059.
- [131] AWWAD, S.; ISSA, R.; ALNSOUR, L.; ALBALS, D. a AL-MOMANI, I. Quantification of Caffeine and Chlorogenic Acid in Green and Roasted Coffee Samples Using HPLC-DAD and Evaluation of the Effect of Degree of Roasting on Their Levels. *Molecules*. 2021, 26, 24. DOI: 10.3390/molecules26247502.
- [132] SOMPORN, C.; KAMTUO, A.; THEERAKULPISUT, P. a SIRIAMORNPUN, S. Effects of roasting degree on radical scavenging activity, phenolics and volatile compounds of Arabica coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor). *International Journal of Food Science & Technology*. 2011, 46, 11, 2287-2296. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02748.x.
- [133] TRUGO, L. C. a MACRAE, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*. 1984, 15, 3, 219-227. DOI: 10.1016/0308-8146(84)90006-2.
- [134] PERRONE, D.; FARAH, A. a DONANGELO, C. M. Influence of Coffee Roasting on the Incorporation of Phenolic Compounds into Melanoidins and Their Relationship with Antioxidant Activity of the Brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, 60, 17, 4265-4275. DOI: 10.1021/jf205388x.
- [135] CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Science of Food and Agriculture*. 1999, 79, 3, 362-372. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<362::AID-JSFA256>3.0.CO;2-D.
- [136] CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S. a KUHNERT, N. Hierarchical Scheme for LC-MS n Identification of Chlorogenic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51, 10, 2900-2911. DOI: 10.1021/jf026187q.
- [137] UPADHYAY, R. a MOHAN RAO, L. J. An Outlook on Chlorogenic Acids—Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013, 53, 9, 968-984. DOI: 10.1080/10408398.2011.576319.
- [138] VINSON, J. A.; CHEN, X. a GARVER, D. D. Determination of Total Chlorogenic Acids in Commercial Green Coffee Extracts. *Journal of Medicinal Food*. 2019, 22, 3, 314-320. DOI: 10.1089/jmf.2018.0039.
- [139] MARKS, S. C; MULLEN, W. a CROZIER, A. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007, 87, 4, 719-728. DOI: 10.1002/jsfa.2778.
- [140] CHUN, O. K.; KIM, D. O.; MOON, H. Y.; KANG, H. G. a LEE, C. Y. Contribution of Individual Polyphenolics to Total Antioxidant Capacity of Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51, 25, 7240-7245. DOI: 10.1021/jf0343579.
- [141] CRUPI, P.; BLEVE, G.; TUFARIELLO, M.; CORBO, F.; CLODOVEO, M. L. a kol. Comprehensive identification and quantification of chlorogenic acids in sweet cherry by tandem mass 7spectrometry techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2018, 73, 103-111. DOI: 10.1016/j.jfca.2018.06.013.
- [142] MATTILA, P. a HELLSTRÖM, J. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007, 20, 3-4, 152-160. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.05.007.
- [143] MARQUES, V. a FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry*. 2009, 13, 4, 1370-1376. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.086.

- [144] JAISWAL, R.; MATEI, M. F.; GOLON, A.; WITT, M. a KUHNERT, N. Understanding the fate of chlorogenic acids in coffee roasting using mass spectrometry based targeted and non-targeted analytical strategies. *Food & Function*. 2012, 3, 9. DOI: 10.1039/c2fo10260a.
- [145] BEKEDAM, E. K.; SCHOLS, H. A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. a SMIT, G. Incorporation of Chlorogenic Acids in Coffee Brew Melanoidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56, 6, 2055-2063. DOI: 10.1021/jf073157k.
- [146] CROZIER, A.; JAGANATH, I. B. a CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*. 2009, 26, 8. DOI: 10.1039/b802662a.
- [147] SATO, Y.; ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; OGURA, J.; KOBAYASHI, M. a kol. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. 2011, 403, 1-2, 136-138. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.09.035.
- [148] HAO, M. a BETA, T. Qualitative and quantitative analysis of the major phenolic compounds as antioxidants in barley and flaxseed hulls using HPLC/MS/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012, 92, 10, 2062-2068. DOI: 10.1002/jsfa.5582.
- [149] SEN, A.; MILLER, S. S.; ARNASON, J. T. a FULCHER, R. G. Quantitative determination by high performance liquid chromatography and microspectro-fluorimetry of phenolic acids in maize grain. *Phytochemical Analysis*. 1991, 2, 5, 225-229. DOI: 10.1002/pca.2800020509.
- [150] GARCIA-CONESA, M. T.; PLUMB, G. W.; WALDRON, K. W.; RALPH, J. a WILLIAMSON, G. Ferulic acid dehydrodimers from wheat bran: isolation, purification and antioxidant properties of 8-0-4-diferulic acid. *Redox Report*. 2016, 3, 5-6, 319-323. DOI: 10.1080/13510002.1997.11747129.
- [151] MATHEW, S. a ABRAHAM, T. E. Bioconversions of Ferulic Acid, an Hydroxycinnamic Acid. *Critical Reviews in Microbiology*. 2008, 32, 3, 115-125. DOI: 10.1080/10408410600709628.
- [152] BOZ, H. P -Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *International Journal of Food Science & Technology*. 2015, 50, 11, 2323-2328. DOI: 10.1111/ijfs.12898.
- [153] LI, X.; WANG, T.; ZHOU, B.; GAO, W.; CAO, J. a kol. Chemical composition and antioxidant and anti-inflammatory potential of peels and flesh from 10 different pear varieties (*Pyrus spp.*). *Food Chemistry*. 2014, 152, 531-538. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.010.
- [154] PUTTARAJU, N. G.; VENKATESHAIAH, S. U.; DHARMESH, S. M.; URS, S. M. N. a SOMASUNDARAM, R. Antioxidant Activity of Indigenous Edible Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, 26, 9764-9772. DOI: 10.1021/jf0615707.
- [155] ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M. a NESTEROWICZ, J. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, 6, 2118-2124. DOI: 10.1021/jf040411p.
- [156] BOERJAN, W.; RALPH, J. a BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 2003, 54, 1, 519-546. DOI: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.
- [157] SINHA, A. K.; VERMA, S. C. a SHARMA, U. K. Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. *Journal of Separation Science*. 2007, 30, 1, 15-20. DOI: 10.1002/jssc.200600193.
- [158] WALTON, N. J.; MAYER, M. J. a NARBAD, A. Vanillin. *Phytochemistry*. 2003, 63, 5, 505-515. DOI: 10.1016/S0031-9422(03)00149-3.
- [159] KHALIL ALYAHYA, H.; SUBASH-BABU, P.; MOHAMMAD SALAMATULLAH, A.; HAYAT, K.; ALBADER, N. a kol. Quantification of Chlorogenic Acid and Vanillin from Coffee Peel Extract and its Effect on α -Amylase Activity, Immunoregulation, Mitochondrial Oxidative Stress, and Tumor Suppressor Gene Expression Levels in H₂O₂-Induced Human Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Pharmacology*. 2021, 12. DOI: 10.3389/fphar.2021.760242.
- [160] MARCHIOSI, R.; DOS SANTOS, W. D.; CONSTANTIN, R. P.; DE LIMA, R. B.; SOARES, A. R. a kol. Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews*. 2020, 19, 4, 865-906. DOI: 10.1007/s11101-020-09689-2.
- [161] ORACZ, J.; NEBESNY, E. a ŻYŻELEWICZ, D. Identification and quantification of free and bound phenolic compounds contained in the high-molecular weight melanoidin fractions derived from two different

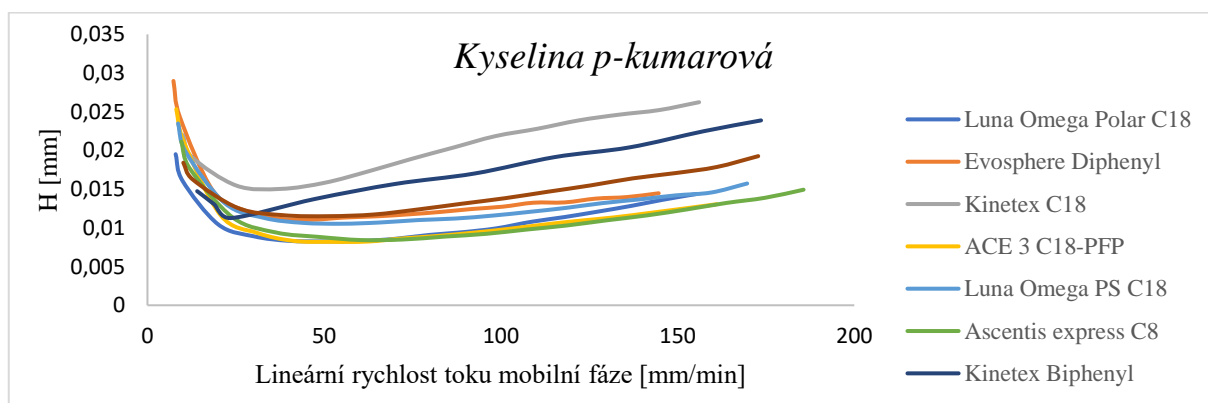
- types of cocoa beans by UHPLC-DAD-ESI-HR-MSn. *Food Research International*. 2019, 115, 135-149. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.08.028.
- [162] MULTARI, S.; NEACSU, M.; SCOBBI, L.; CANTLAY, L.; DUNCAN, G. a kol. Nutritional and Phytochemical Content of High-Protein Crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016, 64, 41, 7800-7811. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b00926.
- [163] CAO, J.; WEI, Y. J.; QI, L. W.; LI, P.; QIAN, Z. M. a kol. Determination of fifteen bioactive components in Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Biomedical Chromatography*. 2008, 22, 2, 164-172. DOI: 10.1002/bmc.911.
- [164] CARRILLO, J. D. a TENA, M. T. Determination of ethylphenols in wine by in situ derivatisation and headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, 387, 7, 2547-2558. DOI: 10.1007/s00216-006-1086-x.
- [165] BURON, N.; COTON, M.; LEGENDRE, P.; LEDAUPHIN, J.; KIENZ-BOUCHART, V. a kol. Implications of *Lactobacillus collinoides* and *Brettanomyces/Dekkera anomala* in phenolic off-flavour defects of ciders. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, 153, 1-2, 159-165. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.002.
- [166] DIAKO, C.; VIXIE, B.; WELLER, K. M.; DYCUS, D. A. a ROSS, C. F. Determination of 4-ethylcatechol in a Merlot wine using sensory evaluation and the electronic tongue. *International Journal of Food Science & Technology*. 2017, 52, 11, 2489-2496. DOI: 10.1111/ijfs.13534.
- [167] MÜLLER, C.; LANG, R. a HOFMANN, T. Quantitative Precursor Studies on Di- and Trihydroxybenzene Formation during Coffee Roasting Using “In Bean” Model Experiments and Stable Isotope Dilution Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, 26, 10086-10091. DOI: 10.1021/jf062727y.
- [168] CHATONNET, P.; DUBOURDIE, D.; BOIDRON, J. a PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1992, 60, 2, 165-178. DOI: 10.1002/jsfa.2740600205.
- [169] MASON, M. E.; JOHNSON, B. a HAMMING, M. C. Volatile components of roasted peanuts. Major monocarbonyls and some noncarbonyl components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1967, 15, 1, 66-73. DOI: 10.1021/jf60149a029.
- [170] YANG, K. M.; CHAO, L. K.; WU, C. S.; YE, Z. S. a CHEN, H. C. Headspace Solid-Phase Microextraction Analysis of Volatile Components in Peanut Oil. *Molecules*. 2021, 26, 11. DOI: 10.3390/molecules26113306.
- [171] PYYSAALO, T. a HONKANEN, E. The influence of heat on the aroma of cloudberries (*Rubus Chamaemorus* L.). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*. 1977, 163, 1, 25-30. DOI: 10.1007/BF01123552.
- [172] ZIMOVÁ, Michaela. Stanovení vybraných látek v různých fázích pražení kávy. Diplomová práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2023.
- [173] AL-DHABI, N. A.; PONMURUGAN, K. a MARAN JEGANATHAN, P. Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2017, 34, 206-213. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2016.05.005.
- [174] SEVERINI, C.; DEROSI, A. a FIORE, A. G. Ultrasound-assisted extraction to improve the recovery of phenols and antioxidants from spent espresso coffee ground: a study by response surface methodology and desirability approach. *European Food Research and Technology*. 2017, 243, 5, 835-847. DOI: 10.1007/s00217-016-2797-7.

PŘÍLOHY

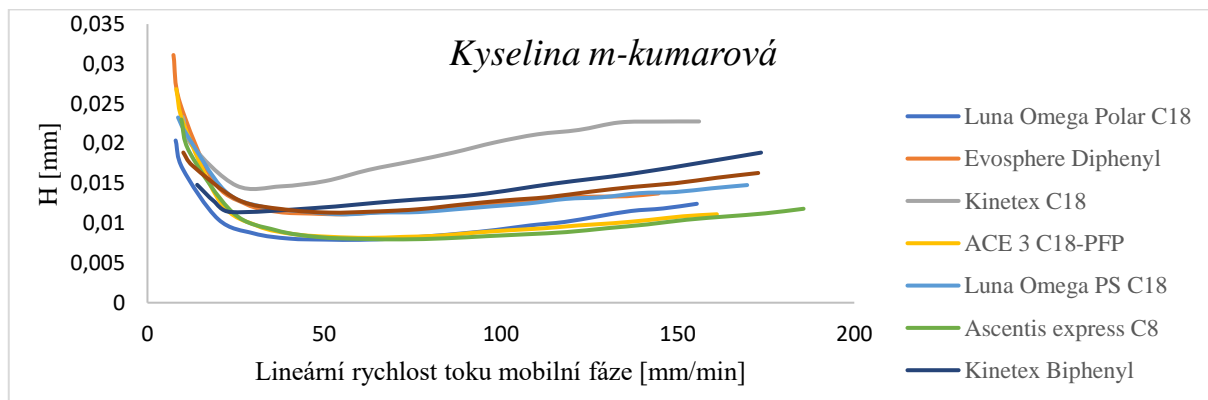
Příloha 1: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro kyselinu syringovou na testovaných kolonách ($n = 1$).



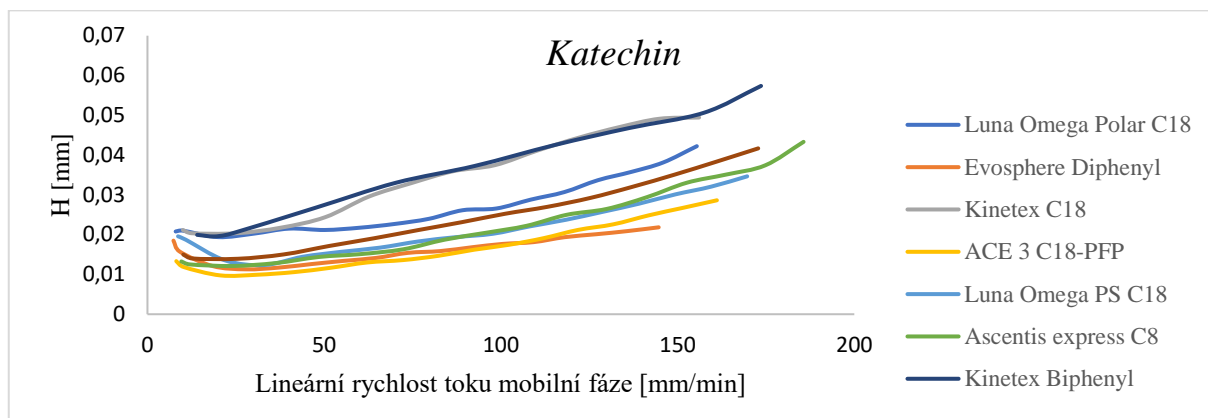
Příloha 2: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro kyselinu *p*-kumarovou na testovaných kolonách ($n = 1$).



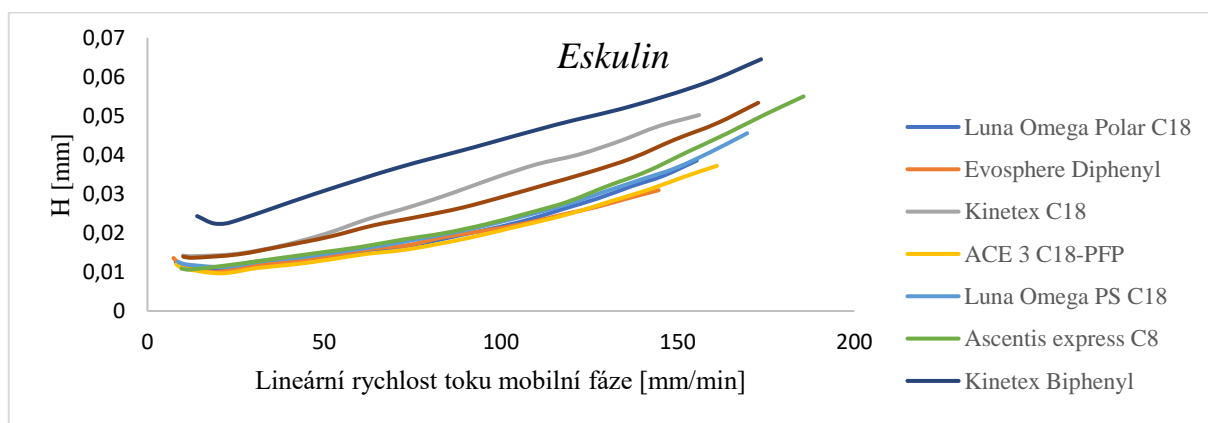
Příloha 3: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro kyselinu *m*-kumarovou na testovaných kolonách ($n = 1$).



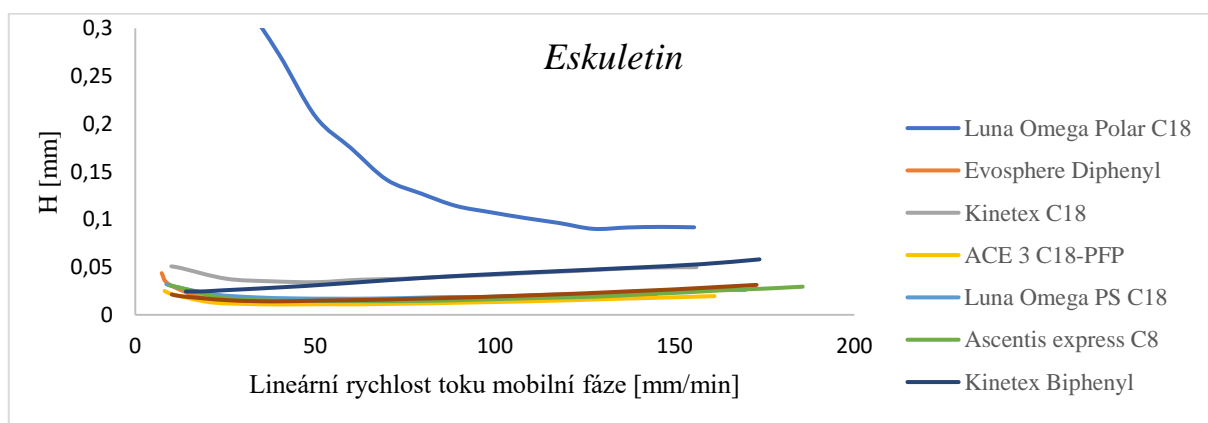
Příloha 4: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro katechin na testovaných kolonách ($n = 1$).



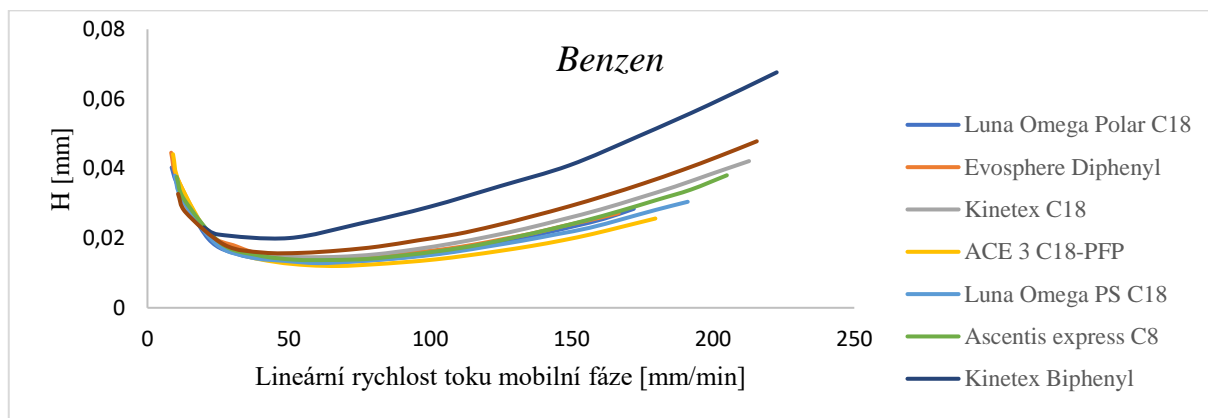
Příloha 5: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro eskulin na testovaných kolonách ($n = 1$).



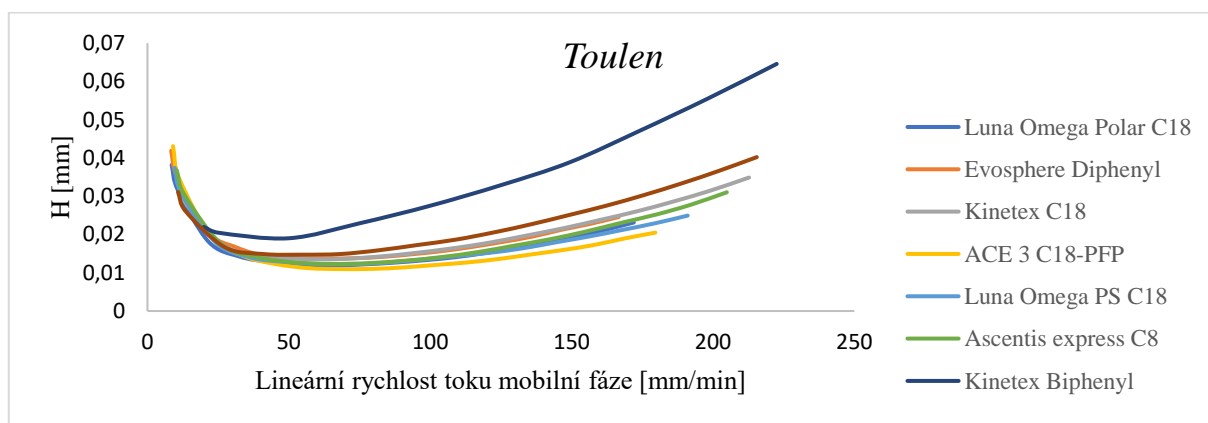
Příloha 6: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro eskuletin na testovaných kolonách ($n = 1$).



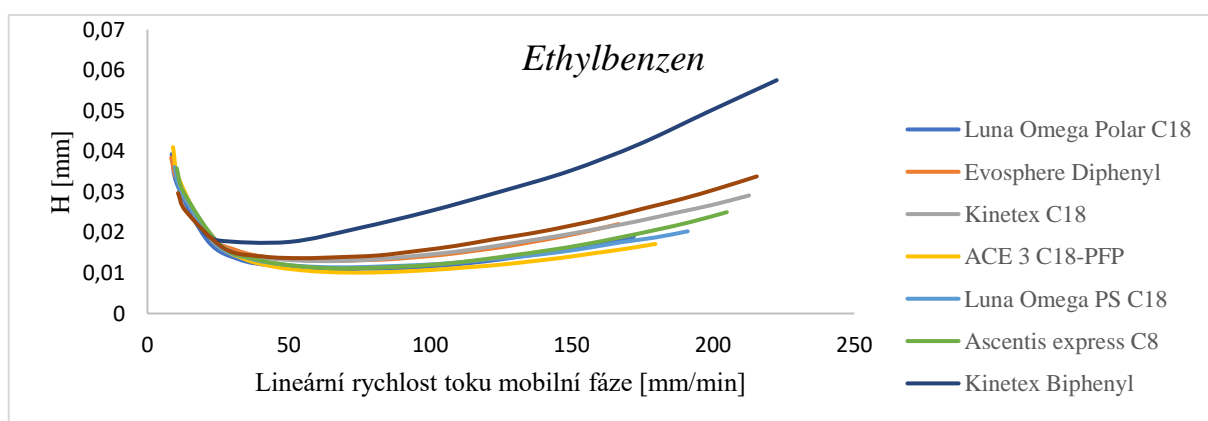
Příloha 7: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro benzen na testovaných kolonách ($n = 1$).



Příloha 8: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro toluen na testovaných kolonách ($n = 1$).



Příloha 9: Závislost výškového ekvivalentu teoretického patra (H) na lineární rychlosti toku mobilní fáze (u) pro ethylbenzen na testovaných kolonách ($n = 1$).

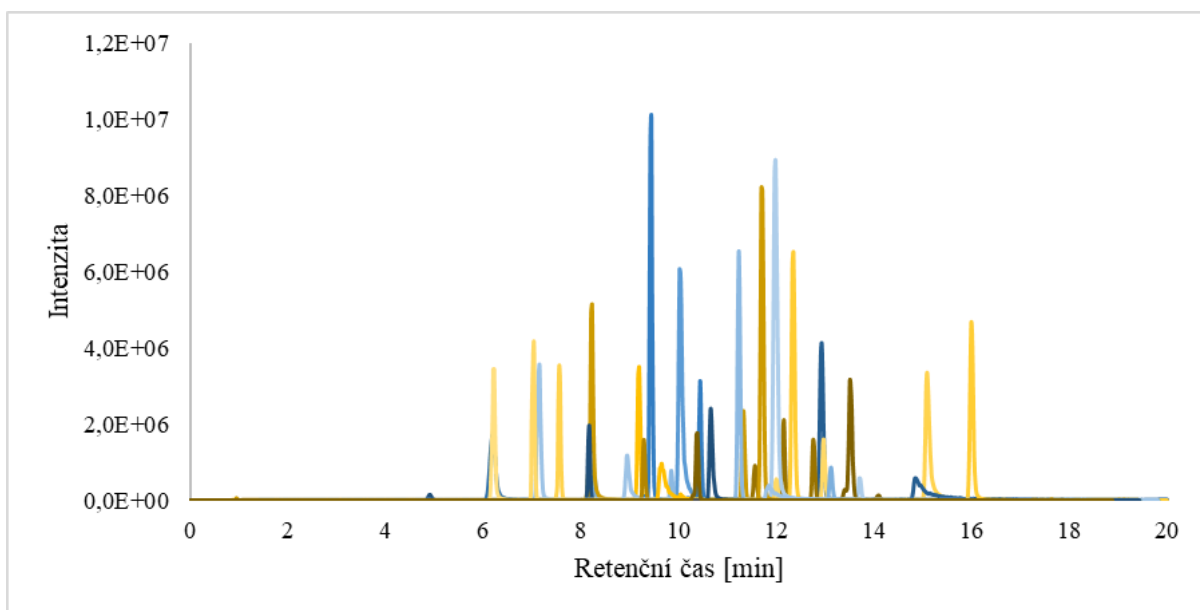


Příloha 10: Optimalizace MRM přechodů a parametrů DP, CE a CXP pro vybrané fenolické sloučeniny.

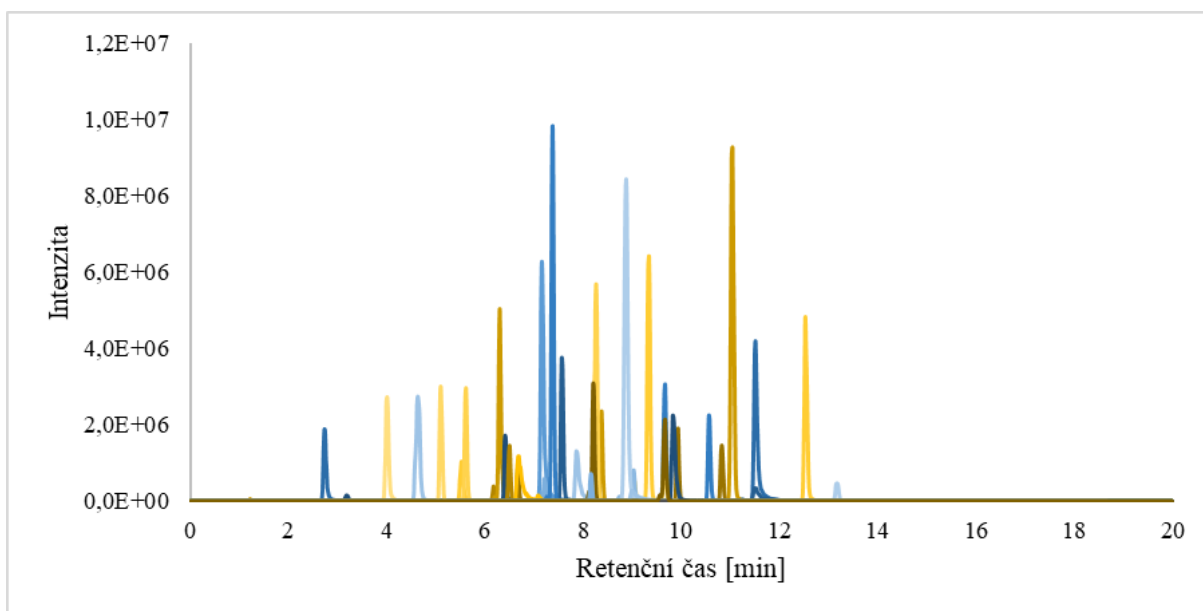
Název sloučeniny	M _r [g/mol]	Prekurzorový iont [m/z]	Produktový iont QT (QL) [m/z]	DP [V]	CE [V]	CXP [V]
4-ethylkatechol	138,16	137	122	-50	-30	-5
4-hydroxybenzaldehyd	122,12	121	92	-100	-32	-5
4-hydroxykumarin	162,14	161	117	-60	-26	-7
4-methylkatechol	124,14	123	108	-50	-30	-5
4-vinylphenol	120,15	119	93	-60	-32	-9
7-hydroxyflavon	238,24	237	208	-120	-38	-7
			193	-120	-36	-7
Epikatechin	290,27	289	245	-80	-22	-9
			109	-80	-38	-5
Eskuletin	178,14	177	133	-70	-26	-37
Eskulin	340,28	339	177	-85	-28	-5
			133	-85	-56	-7
Ethyl galát	198,17	197	124	-70	-30	-7
			78	-70	-46	-5
Ethyl vanilát	196,2	195	107	-55	-34	-7
			151	-55	-28	-7
Ethylester kys. kávové	208,21	207	133	-85	-40	-9
			161	-85	-26	-5
Hesperetin	302,28	301	164	-85	-32	-5
			136	-85	-40	-7
Homovanilyl alkohol	168,19	167	121	-65	-34	-9
Katechin	290,27	289	245	-110	-20	-9
			109	-110	-30	-7
Koniferyl alkohol	180,2	179	146	-50	-20	-7
Koniferyl aldehyd	178,18	177	134	-10	-28	-7
Kvercetin	302,24	301	151	-95	-30	-9
			107	-95	-36	-5
Kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	138,12	137	93	-55	-20	-5
			75	-55	-42	-5
Kyselina ferulová	194,18	193	134	-55	-20	-9
			149	-55	-14	-11
Kyselina galová	170,12	169	125	-65	-22	-7
			79	-65	-34	-5
Kyselina gentisová	154,12	153	108	-40	-28	-5
			81	-40	-24	-5
Kyselina homovanilová	182,17	181	137	-40	-12	-13
			122	-40	-26	-1
Kyselina chlorgenová	354,31	353	191	-65	-32	-7
			85	-65	-54	-5
Kyselina kávová	180,16	179	135	-65	-22	-13
Kyselina <i>m</i> -kumarová	164,16	163	119	-70	-20	-5

			91	-70	-34	-5
Kyselina p-kumarová	164,16	163	119	-65	-20	-5
Kyselina protokatechová	154,12	153	109	-60	-20	-9
Kyselina salicylová	138,12	137	93	-45	-22	-5
			75	-45	-40	-7
Kyselina sinapová	224,21	223	164	-65	-20	-5
			121	-65	-36	-9
Kyselina syringová	198,17	197	121	-55	-24	-7
			153	-55	-16	-7
Kyselina <i>trans</i> -skořicová	148,16	147	103	-50	-16	-7
			77	-50	-28	-3
Kyselina vanilová	168,15	167	123	-55	-16	-7
			91	-55	-26	-7
Kyselina veratrová	182,17	181	137	-65	-16	-7
			107	-65	-34	-7
Myricetin	318,24	317	151	-100	-32	-5
			137	-100	-34	-7
Naringenin	272,25	271	151	-75	-26	-9
			119	-75	-32	-7
Naringin	580,54	579	271	-160	-44	-9
			151	-160	-46	-5
Protokatechový aldehyd	138,12	137	108	-85	-30	-7
			92	-85	-32	-5
Pyrogallol	126,11	125	79	-75	-28	-7
			97	-75	-22	-7
Resveratrol	228,24	227	185	-100	-28	-5
Rutin	610,52	609	300	-175	-52	-15
Skopoletin	192,17	191	176	-55	-20	-7
			104	-55	-32	-7
Syringaldehyd	182,17	181	166	-40	-18	-5
			151	-40	-26	-5
Taxifolin	304,25	303	285	-80	-16	-9
			125	-80	-28	-7
Tryptofol	161,2	160	130	-70	-22	-13
Tyrosol	138,16	137	106	-80	-22	-7
			119	-80	-20	-7
Vanilin	152,15	151	136	-30	-18	-7
			92	-30	-26	-5
Vanilyl methyl keton	180,2	179	164	-10	-18	-9

Příloha 11: Chromatogram 48 fenolických sloučenin za podmínek gradientu 1 a při záznamu pouze kvantifikačních MRM přechodů. Chromatogram získán spojením analýz pěti odlišných směsí látek o koncentraci 1 mg/l.



Příloha 12: Chromatogram 48 fenolických sloučenin za podmínek gradientu 3 a při záznamu pouze kvantifikačních MRM přechodů. Chromatogram získán spojením analýz pěti odlišných směsí látek o koncentraci 1 mg/l.



Příloha 13: Koncentrace fenolických látek a jejich standardní chyby měření v mg/l vzorků lihového octa. Prázdná pole značí, že látka nebyla v daném vzorku identifikována (n = 3).

Látka	Tesco	K-Klassic	Gurmen
4-ethylcatechol			
4-hydroxybenzaldehyd	0,088 ± 0,003	0,100 ± 0,002	0,118 ± 0,003
4-hydroxykumarin			
4-methylcatechol			
4-vinylfenol			
7-hydroxyflavon			
Coniferyl alkohol			
Epikatechin			
Eskuletin			
Eskulin			
Ethyl galát			
Ethyl vanilát			
Ethylester kys. kávové			
Hesperetin			
Homovanilyl alkohol			
Katechin			
Koniferyl aldehyd			
Kvercetin			
Kys. 4-hydroxybenzoová	0,017 ± 0,002	0,017 ± 0,001	0,027 ± 0,002
Kys. ferulová			
Kys. galová			
Kys. gentisová			
Kys. homovanilová			
Kys. chlorgenová	0,007 ± 0,002		
Kys. kávová			
Kys. m-kumarová			
Kys. p-kumarová			
Kys. protokatechuová	0,037 ± 0,002	0,032 ± 0,001	0,041 ± 0,001
Kys. salicylová			
Kys. sinapová			
Kys. syringová			
Kys. trans-skořicová			
Kys. vanilová	0,009 ± 0,002	0,009 ± 0,001	0,009 ± 0,001
Kys. veratrová			
Myricetin			
Naringenin			
Naringin			
Protokatechuový aldehyd			
Pyrogallol			
Resveratrol			
Rutin			
Skopoletin			
Syringaldehyd			
Taxifolin			

Tryptofol			
Tyrosol	0,173 ± 0,012	0,154 ± 0,008	0,059 ± 0,002
Vanilin	0,055 ± 0,002	0,044 ± 0,002	0,053 ± 0,003
Vanilyl methyl keton			

Příloha 14: Koncentrace fenolických látek a jejich standardní chyby měření v mg/l vzorků rýžového octa. Prázdná pole značí, že látka nebyla v daném vzorku identifikována. Hodnoty <LOQ značí, že hodnota koncentrace se nacházela pod mezí kvantifikace s ohledem na ředění vzorku (n = 3).

Látka	Heng Shun	Tokyo	Pearl River Bridge
4-ethylcatechol			
4-hydroxybenzaldehyd	0,138 ± 0,003	0,015 ± 0,001	0,077 ± 0,001
4-hydroxykumarin			
4-methylcatechol			
4-vinylfenol			0,006 ± 0,001
7-hydroxyflavon			
Coniferyl alkohol			
Epikatechin			
Eskuletin		<LOQ	
Eskulin			
Ethyl galát			
Ethyl vanilát			
Ethylester kys. kávové			
Hesperetin			
Homovanilyl alkohol			
Katechin			
Koniferyl aldehyd			0,005 ± 0,001
Kvercetin			
Kys. 4-hydroxybenzoová	0,072 ± 0,002	0,028 ± 0,001	0,260 ± 0,005
Kys. ferulová	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,001	0,500 ± 0,019
Kys. galová			<LOQ
Kys. gentisová		<LOQ	
Kys. homovanilová			<LOQ
Kys. chlorgenová			
Kys. kávová			
Kys. m-kumarová			
Kys. p-kumarová	0,002 ± 0,001		0,398 ± 0,010
Kys. protokatechuová	0,102 ± 0,003	0,034 ± 0,002	0,117 ± 0,006
Kys. salicylová	0,040 ± 0,002		
Kys. sinapová		<LOQ	
Kys. syringová	0,001 ± 0,001	0,031 ± 0,001	0,070 ± 0,001
Kys. trans-skořicová			
Kys. vanilová	0,048 ± 0,003	0,018 ± 0,001	0,159 ± 0,004
Kys. veratrová			
Myricetin			
Naringenin			

Naringin			
Protokatechuový aldehyd	0,006 ± 0,002	<LOQ	0,005 ± 0,002
Pyrogallol			
Resveratrol			
Rutin			
Skopoletin	0,001 ± 0,001		
Syringaldehyd	0,003 ± 0,001	0,008 ± 0,004	0,082 ± 0,004
Taxifolin			
Tryptofol			
Tyrosol	7,699 ± 0,146	0,506 ± 0,021	0,638 ± 0,020
Vanilin	0,085 ± 0,001	0,030 ± 0,002	0,089 ± 0,002
Vanilyl methyl keton			

Příloha 15: Koncentrace fenolických látek a jejich standardní chyby měření v mg/l vzorků jablečného octa. Prázdná pole značí, že látka nebyla v daném vzorku identifikována. Hodnoty <LOQ značí, že hodnota koncentrace se nacházela pod mezi kvantifikace s ohledem na ředění vzorku (n = 3).

Látka	Bzenecký ocet	KAND	Benita
4-ethylcatechol	38,675 ± 2,320		
4-hydroxybenzaldehyd	0,304 ± 0,004	0,079 ± 0,004	0,068 ± 0,002
4-hydroxykumarin			
4-methylcatechol			
4-vinylfenol	<LOQ		
7-hydroxyflavon			
Coniferyl alkohol			
Epikatechin	10,949 ± 0,397		<LOQ
Eskuletin	0,021 ± 0,004	0,005 ± 0,005	
Eskulin		<LOQ	
Ethyl galát	0,009 ± 0,002		
Ethyl vanilát	<LOQ		
Ethylester kys. kávové	0,143 ± 0,003	0,001 ± 0,003	<LOQ
Hesperetin			
Homovanilyl alkohol			
Katechin	1,172 ± 0,070		
Koniferyl aldehyd			
Kvercetin	1,421 ± 0,059		
Kys. 4-hydroxybenzoová	1,284 ± 0,028	0,321 ± 0,013	0,056 ± 0,006
Kys. ferulová	0,029 ± 0,003	0,047 ± 0,002	0,010 ± 0,004
Kys. galová	0,141 ± 0,004	0,146 ± 0,006	0,014 ± 0,003
Kys. gentisová	1,430 ± 0,040	0,029 ± 0,005	0,003 ± 0,003
Kys. homovanilová			
Kys. chlorgenová	8,473 ± 0,330	23,250 ± 0,742	1,122 ± 0,088
Kys. kávová	0,181 ± 0,006	0,040 ± 0,004	0,016 ± 0,004
Kys. m-kumarová			
Kys. p-kumarová	0,086 ± 0,003	0,020 ± 0,002	0,004 ± 0,001
Kys. protokatechuová	1,266 ± 0,028	1,170 ± 0,030	0,124 ± 0,003
Kys. salicylová	0,085 ± 0,004	0,010 ± 0,003	

Kys. sinapová	0,015 ± 0,002	0,018 ± 0,006	0,003 ± 0,006
Kys. syringová	0,078 ± 0,001	0,077 ± 0,006	0,020 ± 0,003
Kys. <i>trans</i> -skořicová	0,009 ± 0,002	0,004 ± 0,003	
Kys. vanilová	0,201 ± 0,004	0,369 ± 0,025	0,042 ± 0,002
Kys. veratrová	<LOQ		
Myricetin			
Naringenin	0,012 ± 0,001		
Naringin			
Protokatechuový aldehyd	0,099 ± 0,007	0,095 ± 0,006	0,008 ± 0,003
Pyrogallol	0,727 ± 0,033	0,025 ± 0,002	
Resveratrol	0,010 ± 0,001		
Rutin	0,009 ± 0,003	0,170 ± 0,025	0,009 ± 0,002
Skopoletin			
Syringaldehyd	0,006 ± 0,003	0,006 ± 0,002	<LOQ
Taxifolin	0,023 ± 0,002		
Tryptofol	0,056 ± 0,006	<LOQ	
Tyrosol	8,650 ± 0,102	5,009 ± 0,129	7,001 ± 0,306
Vanilin	<LOQ	0,057 ± 0,004	0,047 ± 0,004
Vanilyl methyl keton			

Příloha 16: Koncentrace fenolických látek a jejich standardní chyby měření v mg/l vzorků vinného bílého octa. Prázdná pole značí, že látka nebyla v daném vzorku identifikována. Hodnoty <LOQ značí, že hodnota koncentrace se nacházela pod mezi kvantifikace s ohledem na ředění vzorku (n = 3).

Látka	Bzenecký ocet	KAND	K-Klassic	De Nigris
4-ethylkatechol	0,034 ± 0,007	0,013 ± 0,003	<LOQ	
4-hydroxybenzaldehyd	0,106 ± 0,010	0,143 ± 0,004	0,074 ± 0,001	0,027 ± 0,004
4-hydroxykumarin		<LOQ		
4-methylkatechol				
4-vinylfenol	0,014 ± 0,002	0,015 ± 0,001	0,006 ± 0,001	
7-hydroxyflavon				
Coniferyl alkohol				
Epikatechin	0,798 ± 0,039	0,015 ± 0,006	0,400 ± 0,015	
Eskuletin	0,029 ± 0,011	0,049 ± 0,005	0,007 ± 0,003	
Eskulin				
Ethyl galát	0,146 ± 0,011	0,208 ± 0,007	0,041 ± 0,003	0,009 ± 0,005
Ethyl vanilát	0,008 ± 0,006	0,011 ± 0,002		
Ethylester kys. kávové	0,144 ± 0,010	0,038 ± 0,055	0,007 ± 0,003	0,006 ± 0,004
Hesperetin				0,005 ± 0,003
Homovanilyl alkohol				
Katechin	1,807 ± 0,152		0,282 ± 0,040	
Koniferyl aldehyd				
Kvercetin	0,140 ± 0,010	0,013 ± 0,002	0,004 ± 0,003	
Kys. 4-hydroxybenzoová	0,318 ± 0,016	0,574 ± 0,013	0,424 ± 0,014	0,102 ± 0,006
Kys. ferulová	0,111 ± 0,009	0,373 ± 0,014	0,077 ± 0,002	0,009 ± 0,004
Kys. galová	0,769 ± 0,051	1,051 ± 0,059	3,509 ± 0,085	0,051 ± 0,006
Kys. gentisová	0,125 ± 0,006	0,104 ± 0,004	0,112 ± 0,006	0,007 ± 0,002

Kys. homovanilová				
Kys. chlorgenová	1,191 ± 0,269	0,130 ± 0,007	<LOQ	<LOQ
Kys. kávová	0,679 ± 0,033	0,250 ± 0,021	0,365 ± 0,035	0,012 ± 0,007
Kys. <i>m</i> -kumarová				
Kys. <i>p</i> -kumarová	0,274 ± 0,009	0,079 ± 0,014	0,193 ± 0,003	0,005 ± 0,004
Kys. protokatechuová	0,730 ± 0,031	0,745 ± 0,051	0,864 ± 0,059	0,092 ± 0,004
Kys. salicylová	0,093 ± 0,009	0,198 ± 0,006	0,147 ± 0,005	0,021 ± 0,004
Kys. sinapová	0,011 ± 0,008	0,006 ± 0,005	0,003 ± 0,002	
Kys. syringová	0,103 ± 0,009	0,119 ± 0,002	0,045 ± 0,003	0,016 ± 0,002
Kys. <i>trans</i> -skořicová	<LOQ	0,006 ± 0,002	<LOQ	
Kys. vanilová	0,114 ± 0,009	0,209 ± 0,007	0,071 ± 0,002	0,028 ± 0,004
Kys. veratrová				
Myricetin				
Naringenin	0,018 ± 0,008	0,013 ± 0,003	0,003 ± 0,002	<LOQ
Naringin				
Protokatechuový aldehyd	0,041 ± 0,010	0,169 ± 0,006	0,083 ± 0,005	0,007 ± 0,004
Pyrogallol	0,044 ± 0,009		0,029 ± 0,002	<LOQ
Resveratrol	0,014 ± 0,006		0,002 ± 0,002	
Rutin	0,023 ± 0,006	0,003 ± 0,003		
Skopoletin	0,011 ± 0,008	0,008 ± 0,006		
Syringaldehyd	0,020 ± 0,007	0,016 ± 0,003	0,005 ± 0,001	
Taxifolin	0,152 ± 0,012	0,378 ± 0,012	0,011 ± 0,002	
Tryptofol			0,013 ± 0,003	
Tyrosol	3,494 ± 0,075	8,165 ± 0,223	0,886 ± 0,023	0,308 ± 0,021
Vanilin	0,018 ± 0,007	0,022 ± 0,002	0,008 ± 0,001	<LOQ
Vanilyl methyl keton				

Příloha 17: Koncentrace fenolických látek a jejich standardní chyby měření v mg/l vzorků vinného červeného octa. Prázdná pole značí, že látka nebyla v daném vzorku identifikována. Hodnoty <LOQ značí, že hodnota koncentrace se nacházela pod mezí kvantifikace s ohledem na ředění vzorku (n = 3).

Látka	Bzenecký ocet	Varvello	Casa Rinaldi
4-ethylkatechol	0,002 ± 0,005	0,129 ± 0,006	0,032 ± 0,004
4-hydroxybenzaldehyd	0,235 ± 0,003	0,205 ± 0,003	0,283 ± 0,006
4-hydroxykumarin			
4-methylkatechol			
4-vinylfenol			
7-hydroxyflavon			
Coniferyl alkohol			
Epikatechin	0,023 ± 0,005	0,160 ± 0,006	0,125 ± 0,008
Eskuletin	0,034 ± 0,002	0,035 ± 0,003	0,027 ± 0,002
Eskulin			
Ethyl galát	1,246 ± 0,043	1,277 ± 0,030	0,460 ± 0,008
Ethyl vanilát	0,028 ± 0,003	0,036 ± 0,003	0,014 ± 0,003
Ethylester kys. kávové	0,012 ± 0,001	0,026 ± 0,003	0,016 ± 0,001
Hesperetin			
Homovanilyl alkohol			

Katechin	0,055 ± 0,014	0,215 ± 0,009	0,198 ± 0,011
Koniferyl aldehyd			
Kvercetin		<LOQ	
Kys. 4-hydroxybenzoová	0,296 ± 0,008	0,436 ± 0,010	0,489 ± 0,014
Kys. ferulová	0,082 ± 0,002	0,129 ± 0,003	0,117 ± 0,004
Kys. galová	20,032 ± 0,362	21,752 ± 0,993	8,514 ± 0,220
Kys. gentisová		0,286 ± 0,005	0,246 ± 0,007
Kys. homovanilová			
Kys. chlorgenová	0,288 ± 0,011	0,018 ± 0,006	0,026 ± 0,005
Kys. kávová	0,349 ± 0,022	0,784 ± 0,012	0,551 ± 0,025
Kys. <i>m</i> -kumarová			
Kys. <i>p</i> -kumarová	0,206 ± 0,004	0,246 ± 0,006	0,062 ± 0,004
Kys. protokatechuová	1,680 ± 0,061	1,435 ± 0,064	0,711 ± 0,063
Kys. salicylová	0,166 ± 0,005	0,273 ± 0,010	0,159 ± 0,007
Kys. sinapová	0,020 ± 0,021	0,003 ± 0,002	0,006 ± 0,004
Kys. syringová	3,773 ± 0,087	2,766 ± 0,099	0,970 ± 0,053
Kys. <i>trans</i> -skořicová	<LOQ		
Kys. vanilová	1,272 ± 0,031	1,347 ± 0,035	0,574 ± 0,029
Kys. veratrová			
Myricetin			
Naringenin	<LOQ		
Naringin			
Protokatechuový aldehyd	0,209 ± 0,010	0,132 ± 0,004	0,052 ± 0,003
Pyrogallol		2,403 ± 0,055	4,782 ± 0,666
Resveratrol			
Rutin			
Skopoletin	0,004 ± 0,005	0,005 ± 0,003	<LOQ
Syringaldehyd	0,104 ± 0,003	0,050 ± 0,003	0,016 ± 0,003
Taxifolin	<LOQ	0,012 ± 0,004	0,005 ± 0,002
Tryptofol		<LOQ	0,011 ± 0,004
Tyrosol	12,367 ± 0,623	11,454 ± 0,513	11,957 ± 0,554
Vanilin	0,094 ± 0,007	0,076 ± 0,003	0,055 ± 0,003
Vanilyl methyl keton			

Příloha 18: Koncentrace fenolických látek a jejich standardní chyby měření v mg/l vzorků balzamického octa. Prázdná pole značí, že látka nebyla v daném vzorku identifikována. Hodnoty <LOQ značí, že hodnota koncentrace se nacházela pod mezi kvantifikace s ohledem na ředění vzorku (n = 3).

Látka	Ophellia	San Fabio	Cascina San G.	Mengazzolim
4-ethylkatechol		0,017 ± 0,004	0,004 ± 0,006	
4-hydroxybenzaldehyd	0,118 ± 0,002	0,204 ± 0,007	0,765 ± 0,074	1,588 ± 0,065
4-hydroxykumarin				
4-methylkatechol				0,029 ± 0,015
4-vinylfenol				
7-hydroxyflavon				

Coniferyl alkohol				
Epikatechin				
Eskuletin	0,013 ± 0,005	0,036 ± 0,001	0,033 ± 0,005	
Eskulín	0,007 ± 0,003	0,006 ± 0,002	0,027 ± 0,003	0,039 ± 0,002
Ethyl galát	0,019 ± 0,002	0,040 ± 0,002	1,396 ± 0,090	0,135 ± 0,012
Ethyl vanilát		0,014 ± 0,002	0,011 ± 0,003	0,009 ± 0,003
Ethylester kys. kávové	0,001 ± 0,001	0,032 ± 0,001	0,101 ± 0,025	0,004 ± 0,002
Hesperetin				
Homovanilyl alkohol				
Katechin				
Koniferyl aldehyd				
Kvercetin		0,103 ± 0,014		
Kys. 4-hydroxybenzoová	0,531 ± 0,110	0,852 ± 0,040	3,197 ± 0,331	3,254 ± 0,390
Kys. ferulová	0,063 ± 0,003	0,178 ± 0,007	0,762 ± 0,117	0,134 ± 0,022
Kys. galová	1,123 ± 0,103	14,505 ± 0,205	87,713 ± 2,090	19,587 ± 0,441
Kys. gentisová	0,105 ± 0,002	0,932 ± 0,024	1,052 ± 0,113	1,188 ± 0,046
Kys. homovanilová				
Kys. chlorgenová	2,493 ± 0,408	0,014 ± 0,003	0,051 ± 0,006	0,020 ± 0,003
Kys. kávová	0,088 ± 0,003	0,701 ± 0,075	15,238 ± 0,776	1,229 ± 0,113
Kys. m-kumarová				
Kys. p-kumarová	0,030 ± 0,005	0,383 ± 0,035	12,354 ± 0,771	2,136 ± 0,438
Kys. protokatechuová	1,165 ± 0,027	2,917 ± 0,110	17,165 ± 0,455	13,829 ± 0,399
Kys. salicylová	0,285 ± 0,006	0,474 ± 0,029	1,535 ± 0,061	1,057 ± 0,080
Kys. sinapová	0,007 ± 0,003		0,003 ± 0,003	
Kys. syringová	0,226 ± 0,003	1,760 ± 0,062	2,952 ± 0,138	
Kys. trans-skořicová	0,013 ± 0,003	0,005 ± 0,001	0,007 ± 0,002	0,013 ± 0,003
Kys. vanilová	0,248 ± 0,014	1,122 ± 0,110	1,730 ± 0,111	3,811 ± 0,117
Kys. veratrová				
Myricetin		0,012 ± 0,008		
Naringenin				
Naringin				
Protokatechuový aldehyd	0,129 ± 0,003	0,312 ± 0,009	1,368 ± 0,056	2,881 ± 0,173
Pyrogallol	0,130 ± 0,016	0,169 ± 0,019		
Resveratrol				
Rutin				
Skopoletin	0,002 ± 0,004	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,003	0,103 ± 0,020
Syringaldehyd	0,020 ± 0,002	0,031 ± 0,003	0,061 ± 0,004	1,071 ± 0,045
Taxifolin				
Tryptofol				
Tyrosol	2,643 ± 0,242	11,799 ± 0,974	14,089 ± 0,646	23,373 ± 0,747
Vanilin	0,092 ± 0,005	0,118 ± 0,005	0,198 ± 0,024	1,002 ± 0,041
Vanilyl methyl keton				

SEZNAM PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

Články

KAŠPAR, Michal; BAJER, Tomáš; BAJEROVÁ, Petra a ČESLA, Petr. Comparison of Phenolic Profile of Balsamic Vinegars Determined Using Liquid and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Molecules*. 2022, 27, 4. DOI: 10.3390/molecules27041356.

KAŠPAR, Michal a ČESLA, Petr. Characterization of Balsamic Vinegars Using High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography. *Applied Sciences*. 2022, 12, 18. DOI: 10.3390/app12188946.

ROULOVÁ, Nikola; HRDÁ, Kateřina; KAŠPAR, Michal; PEROUTKOVÁ, Petra; JOSEFOVÁ, Dominika a kol. Removal of Chloroacetanilide Herbicides from Water Using Heterogeneous Photocatalysis with TiO₂/UV-A. *Catalysts*. 2022, 12, 6. DOI: 10.3390/catal12060597.

SÝS, Milan; DEJMKOVÁ, Hana; TOUŠKOVÁ, Monika; KAŠPAR, Michal a KLIKAROVÁ, Jitka. A novel derivatization method for the determination of ethyl carbamate in spirits by liquid chromatography with spectrophotometric detection. *Microchemical Journal*. 2024, 200. DOI: 10.1016/j.microc.2024.110447.

Přednášky

KAŠPAR, Michal; BAJER, Tomáš; BAJEROVÁ, Petra a ČESLA, Petr. Analysis of Phenolic Composition of Balsamic Vinegars using LC/MS/MS and GC/MS. *5th STARSS Conference on Separation Science*, Hradec Králové, Česká republika 2021.

KAŠPAR, Michal; BAJER, Tomáš; BAJEROVÁ, Petra a ČESLA, Petr. Comparison of phenolic profile of balsamic vinegars determined using liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometry. *IXth International Session of Young Scientific Staff "Food nowadays local of global traditional or innovative?"*, Poznaň, Polsko 2022.

KAŠPAR, Michal; ŘEZKOVÁ, Soňa; ZIMOVÁ, Michaela a ČESLA, Petr. Concentration changes of phenolic compounds during roasting of green coffee beans determined by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *27th International Symposium on Separation Science*, Kluž, Rumunsko 2023.

Postery

KAŠPAR, Michal; PEROUTKOVÁ, Petra a ČESLA, Petr. Analysis of Alachlor, Acetochlor and Metolachlor by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Prague Meeting on Historical Perspectives of Mass Spectrometry*, Praha, Česká republika 2021.

KAŠPAR, Michal a ČESLA, Petr. The Use of Carbon-Based Columns in the Analysis of Structurally Similar Herbicides. *Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2024*. Olomouc, Česká republika, 2024.

KAŠPAR, Michal a ČESLA, Petr. The Phenolic Profile of Common European Vinegars. *28th International Symposium on Separation Science*, Messina, Itálie 2024 (v přípravě, září 2024).