

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Vliv teploty sušení na obsah fenolických látek v pohankových sušenkách

Bc. Kateřina Kozumplíková

Diplomová práce

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina Kozumplíková**
Osobní číslo: **C16609**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Vliv teploty sušení na obsah fenolických látek v pohankových sušenkách**
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte literární rešerši s využitím vědeckých periodik na téma stanovení fenolických látek v pohance a ostatních obilovinách. Zaměřte se hlavně na postup přípravy vzorku před analýzou a možnosti stanovení fenolických látek v pohance pomocí kapalinové chromatografie.
2. V experimentální části proveďte optimalizaci podmínek přípravy vzorku a separace vybraných fenolických látek. Nejvhodnější podmínky použijte na analýzu vzorků sušenek vyrobených z pohanky, které byly vyrobeny za různých teplot sušení.
3. Dosažené výsledky přehledně zpracujte, kriticky zhodnoťte a případně srovnajte s již publikovanými údaji.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Tomáš Hájek, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

doc. Ing. Libor Červenka, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce:

20. února 2018

Termín odevzdání diplomové práce:

11. května 2018



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Bc. Kateřina Kozumplíková

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala panu Ing. Tomáši Hájkovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za vstřícnost, trpělivost a čas, který mi věnoval. A také bych chtěla poděkovat samozřejmě mé rodině, která mě podporuje ve všem, co dělám po celý můj život.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá vlivem teploty sušení na obsah fenolických látek v pohankových sušenkách. Teoretická část pojednává o klasických obilovinách, pseudoobilovinách, pohance a látkách v ní obsažených, antioxidantech, raw stravě, přípravě vzorku před analýzou a o vysokoúčinné kapalinové chromatografii. V rámci experimentální části byla optimalizována metoda pro stanovení fenolických látek jak metodou HPLC s UV a MS detekcí, tak metoda přípravy vzorku pohankových sušenek. Byl sledován vliv teploty sušení na obsah fenolických látek v pohankových raw sušenkách. Na závěr práce byly výsledky vyhodnoceny a kriticky zhodnoceny.

KLÍČOVÁ SLOVA

pohanka, antioxidanty, kyselá a alkalická hydrolyza, extrakce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV a MS detekcí

TITLE

Influence of drying temperature on the content of phenolic compounds in buckwheat biscuits

ANNOTATION

The aim of this work is to study influence of drying temperature on the content of phenolic compounds in buckwheat biscuits. The theoretical part focuses on the cereals, pseudocereals, buckwheat and important compounds which buckwheat contain, antioxidants, raw food, preparation sample before the analysis and about high performance liquid chromatography. The HPLC method with UV and MS detection and the preparation sample before the analysis were optimised for determination phenolic compounds in the buckwheat biscuits. The effect of the drying temperature of raw biscuits on the content of phenolic in compounds was investigated. In conclusion, the results were evaluated and critical appraised.

KEYWORDS

buckwheat, antioxidants, acid and alkaline hydrolysis, extraction, high performance liquid chromatography with UV and MS detection

OBSAH

1. Úvod	11
2. Teoretická část	12
2.1. Obiloviny a pseudoobiloviny	12
2.2. Pohanka	18
2.2.1. Sacharidy	19
2.2.2. Bílkoviny	20
2.2.3. Vitamíny a minerální látky	21
2.2.4. Lipidy	22
2.2.5. Antioxidanty pohanky	22
2.2.6. Terapeutické účinky	23
2.3. Antioxidanty	23
2.3.1. Rutin	25
2.3.2. Kvercetin	26
2.3.3. Myricetin	26
2.3.1. Katechin a epikatechin	27
2.3.2. Ferulová kyselina	27
2.3.3. Chlorogenová kyselina	28
2.3.4. Protokatechová kyselina	28
2.3.5. Syringová kyselina	29
2.3.6. Sinapová kyselina	29
2.3.7. Kyselina galová	30
2.3.8. Kyseliny p-kumarová	30
2.3.9. Kyselina vanilová	31
2.3.10. Kyselina kávová	31
2.4. Raw potraviny	31
2.5. Příprava vzorku před analýzou	32
2.5.1. Kyslá hydrolyza	32
2.5.2. Alkalická hydrolyza	33
2.5.3. Enzymatická hydrolyza	34
2.5.4. Ochrana fenolických kyselin během hydrolyz	34
2.5.5. Extrakce	34
2.6. Vysokoučinná kapalinová chromatografie	35
2.6.1. Možnosti stanovení fenolických látek kapalinovou chromatografií v pohance	39
3. Experimentální část	41
3.1. Přístroje a laboratorní pomůcky	41
3.2. Použité chemikálie	41
3.3. Příprava vzorku	43
3.3.1. Odtučnění vzorku	44

3.3.2.	Alkalická hydrolýza	44
3.3.3.	Extrakce.....	45
3.4.	Analýza vzorků.....	45
3.4.1.	Příprava standardů a kalibračních řad	45
3.4.2.	Podmínky analýzy	46
3.5.	Vyhodnocení	47
4.	Výsledky a diskuze.....	48
4.1.	Optimalizace podmínek	48
4.1.1.	Optimalizace podmínek separace a UV/VIS detekce.....	48
4.1.2.	Optimalizace podmínek separace a MS detekce	51
4.1.3.	Kalibrační závislosti.....	51
4.1.4.	Optimalizace přípravy vzorku	54
4.2.	Analýza vzorků.....	55
4.2.1.	Čistá pohanka a těsta pohankových raw sušenek.....	56
4.2.2.	Obsah fenolických kyselin ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40, 50, 60 a 70 °C.....	58
4.2.3.	Obsah flavonoidů ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40, 50, 60 a 70 °C	60
4.2.4.	Porovnání obsahu fenolických látek v pohankových raw sušenkách sušených při 40 a 70 °C	62
5.	Závěr	63
6.	Literatura.....	65
7.	Přílohy	76

SEZNAM OBRÁZKŮ:

Obrázek 1 <i>Obiloviny</i>	13
Obrázek 2 <i>Pseudoobiloviny</i>	16
Obrázek 3 <i>Pohanka setá</i>	18
Obrázek 4 <i>Anatomie nažky pohanky</i>	19
Obrázek 5 <i>Flavonové jádro</i>	24
Obrázek 6 <i>Chemická struktura: kyseliny benzoové A, kyseliny skořicové B</i>	25
Obrázek 7 <i>Chemický vzorec rutinu (A), kvercetinu (B), myricetinu (C)</i>	26
Obrázek 8 <i>Chemický vzorec katechin (A), epikatechin (B)</i>	27
Obrázek 9 <i>Chemický vzorec kyseliny ferulové (A), chlorogenové (B), protokatechové (C)</i>	28
Obrázek 10 <i>Chemický vzorec kyseliny syringové (A), sinapové (B), galové (C)</i>	29
Obrázek 11 <i>Chemický vzorec kyseliny p-kumarové (A), vanilové (B), kávové (C)</i>	30
Obrázek 12 <i>Schéma HPLC přístroje</i>	36
Obrázek 13 <i>Schéma ionizace elektrosprejem</i>	38
Obrázek 14 <i>Iontová past</i>	39
Obrázek 15 <i>Rotační třepačka s centrifugačními zkumavkami</i>	4544
Obrázek 16 <i>Chromatogram standardů</i>	49
Obrázek 17 <i>Závislost odezvy UV detektoru na typu použité mobilní fáze</i>	50
Obrázek 18 <i>Opakovatelnost a reprodukovatelnost hydrolyzy</i>	5556
Obrázek 19 <i>Koncentrace fenolových kyselin v čisté pohance a těstech</i>	Chyba! Záložka není definována.58
Obrázek 20 <i>Koncentrace flavonoidů v čisté pohance a těstech</i>	Chyba! Záložka není definována.59
Obrázek 21 <i>Koncentrace fenolových kyselin v pohankových raw sušenkách sušených při 40, 50, 60, 70 °C</i>	5860
Obrázek 22 <i>Koncentrace fenolových kyselin v pohankových raw sušenkách sušených při 40, 50, 60, 70 °C</i>	5961
Obrázek 23 <i>Koncentrace flavonoidů v pohankových raw sušenkách sušených při 40, 50, 60, 70 °C</i>	6062
Obrázek 24 <i>Koncentrace flavonoidů v pohankových raw sušenkách sušených při 40, 50, 60, 70 °C</i>	6163
Obrázek 25 <i>Koncentrace fenolických látek v pohankových raw sušenkách sušených při 40 a 70 °C</i>	6264

SEZNAM TABULEK:

Tabulka 1: <i>Obsah bílkovin, sacharidů a lipidů v obilovinách</i>	14
Tabulka 2: <i>Obsah vitamínů, minerálních látek a antioxidantů v obilovinách</i>	15
Tabulka 3: <i>Obsah bílkovin, sacharidů a tuků v pseudoobilovinách</i>	1617
Tabulka 4: <i>Přehled vitamínů, minerálních látek a antioxidantů přítomných v quinoe, amarantu, pohance</i>	17
Tabulka 5 <i>Standards</i>	42
Tabulka 6: <i>Přehled měřených vzorků</i>	4443
Tabulka 7: <i>Kalibrační rozsahy standardů</i>	4645
Tabulka 8: <i>Gradient</i>	4746
Tabulka 9 <i>Podmínky hmotnostního detektoru</i>	47
Tabulka 10 <i>Identifikované fenolické látky</i>	Chyba! Záložka není definována.51
Tabulka 11 <i>Kalibrační závislosti sledovaných látek, směrnice, úsek, p úsek, spolehlivost</i>	5253
Tabulka 12 <i>Mez stanovitelnosti a detekce</i>	5354

SEZNAM ZKRATEK

MW – molekulová hmotnost

kDa – kilodalton (jednotka)

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným

DE – diethyletheru

EA - ethylacetátu

HCl – kyselina chlorovodíková

NaOH - hydroxid sodný

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ESI – ionizace elektrosprejem

TOF – analyzátor doby letu

MF-A – část A mobilní fáze

MF-B – část B mobilní fáze

1. Úvod

Módní trendem dnešní doby je především zdravá strava. Existuje mnoho způsobů, jak se lze zdravě stravovat. Mezi tyto způsoby se řadí raw, neboli „živá“, strava. Základem raw stravy je konzumace ovoce, zeleniny, semínek, ořechů a sušených plodů, které jsou tepelně ošetřeny pouze do teploty cca 42 °C. Podle příznivců raw stravy vyšší teploty degraduje tělu prospěšné látky, jakými jsou antioxidanty nebo vitamíny. Další důvod je, že konzumace tepelně ošetřené stravy zatěžuje zbytečně organismus a vyvolává imunitní reakci těla, protože vařením se z potravin stává cizí látka pro náš organismus.

Cílem této práce bylo zjistit, zda různé teploty sušení u připravených pohankových raw sušenek mají vliv na obsah fenolických látek, zda se jejich koncentrace zvyšuje či jsou látky degradovány.

Raw sušenky, které byly použity jako vzorky v experimentální části bylo nejprve nutné správně připravit před samotnou separací, aby byly uvolněny veškeré fenolické látky, které jsou navázány na další složky potravin. Proto bylo nutné přípravu vzorku před separací optimalizovat. Jako nejvhodnější byla zvolena alkalická hydrolyza, která je podrobně popsána v příslušné kapitole. Dalším krokem byla extrakce, která nám zajistila izolovat uvolněné fenolické látky od ostatních látek. Posledním krokem byla samotná separace látek na RP-HPLC s UV/VIS a MS detekcí. Tato metoda musela být stejně jako příprava vzorku optimalizována, aby byly zajištěny podmínky separace, co nejvhodnější pro rozseparování všech zvolených látek v přijatelném čase.

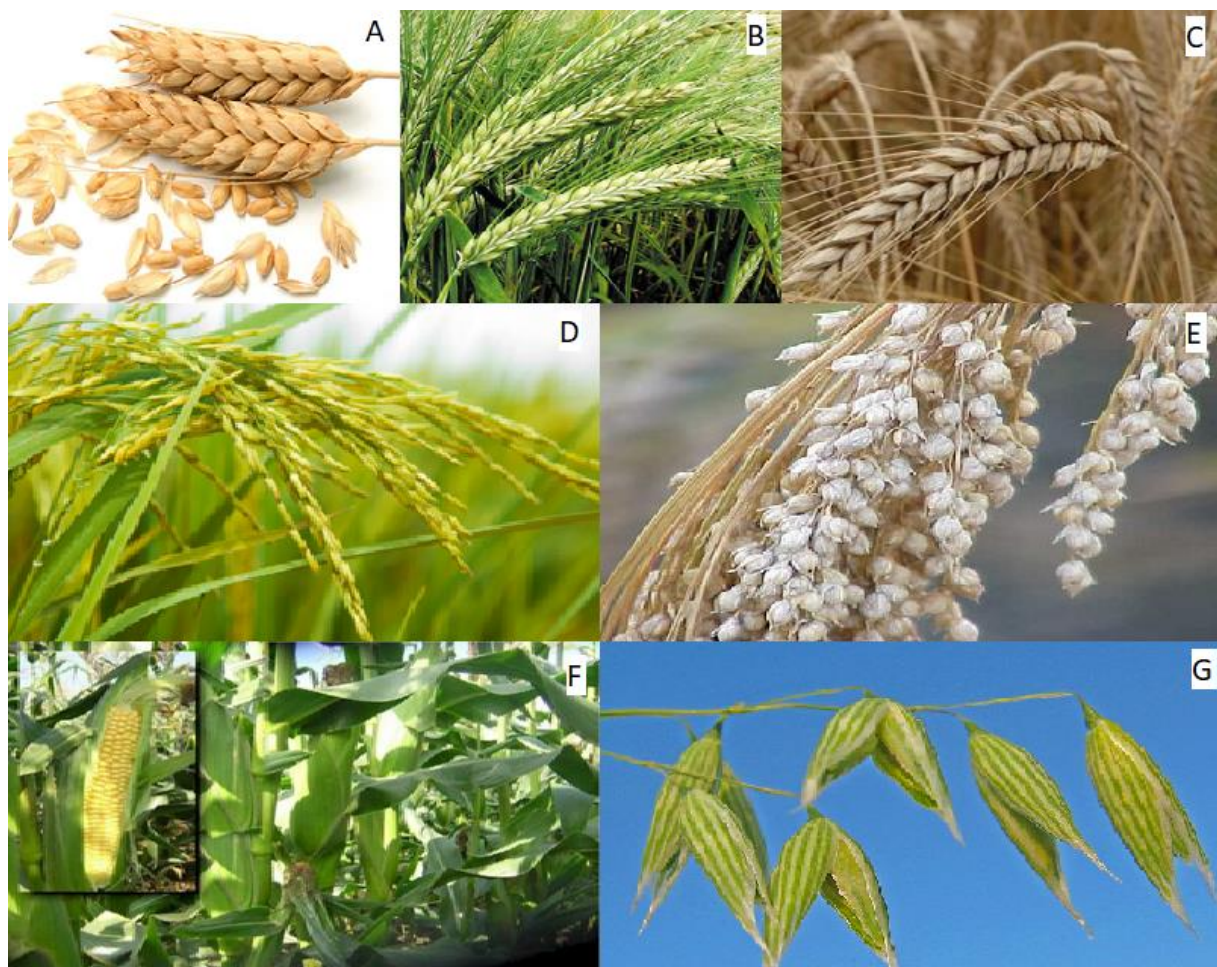
2. Teoretická část

2.1. Obiloviny a pseudoobiloviny

Obiloviny, jinak také nazývány obilninami či cereáliemi, se řadí mezi traviny, které jsou pěstovány od nepaměti a jsou nedílnou součástí lidské potravy. V žádné jiné potravíně nenajdeme takové množství sacharidů, které jsou zdrojem energie, jako v obilovinách. Obsahují velké množství tělu potřebných látek. Především jsou to sacharidy, bílkoviny, vitamíny, minerální látky či vláknina.

Většina obilovin patří do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), jako jsou pšenice, žito, ječmen, rýže, oves, proso či kukuřice (Obrázek 1). Naopak pohanka, amarant či quinoa jsou nazývány pseudoobilninami. Díky tomu že mají podobný vzhled zrna, podobné chemické složení a způsob využití, jsou řazeny k ostatním obilovinám. Najdeme mezi nimi i několik rozdílů, ve kterých se od klasických obilovin liší. Na rozdíl od normálních obilovin jsou pseudoobiloviny rostliny dvouděložné, zatímco klasické obiloviny jsou řazeny k rostlinám jednoděložným. Botanicky jsou řazeny k jiným čeledím, než je tomu u klasických obilovin. Pohanka patří do čeledi rdesnovité (*Polygonaceae*), amarant do čeledi laskavcovité (*Amaranthaceae*) a quinoa je řazena do čeledi merlíkovité (*Chenopodiaceae*) [1-4].

Pšenice je nejdůležitější plodinou pro výrobu chleba a představuje také jednu ze základních složek lidské potravy [4]. **Žito** je po pšenici druhou nejčastěji používanou surovinou k výrobě chleba v evropských zemích, kromě potravinářství je využívána i pro pícninářské, krmivářské, technické a farmaceutické účely [3,5]. **Ječmen** patří mezi nejstarší obiloviny a je čtvrtou nejrozsáhlejší obilovinou. Je hlavní surovinou pro výrobu sladu a piva [4]. **Oves** je třetí nejdůležitější krmnou obilninou v hospodářství hlavně pro koně. Ve středomořských státech se pěstuje jako plodina a částečně i k lidské spotřebě do kaší a müsli [4,6]. **Kukuřice** je převážně využívána jen jako krmivo pro dobytek, ojediněle jako samotná potravina ke konzumaci. Dokonce jsou z ní vyráběny i oleje, také se využívá pro výrobu biodegradovatelných plastů a proteinů v lékařství [3]. **Rýže** je nejstarší obilovinou, která je určena k přímé spotřebě. Je výjimečnou z energetického hlediska, protože přes 85 % energie tvoří komplexní cukry. Její výhodou je lehká stravitelnost, a proto je hojně využívána pro dietní režimy [3,4]. **Proso** je považováno za jednu z nejstarších obilovin vůbec. V našich podmínkách se proso využívá jako krmivo pro hospodářská zvířata, ale v poslední době je i hojně využívanou surovinou ve zdravé a bezlepkové stravě [7].



Obrázek 1 Obiloviny: Pšenice obecná (A), Ječmen jarní (B), Žito seté (C), Rýže (D), Proso (E), Kukuřice (F), Oves (G) [převzato z 8-14]

Obilniny obsahují řadu pro tělo důležitých látek, ty nejdůležitější jsou shrnuty v tabulce 1 a 2. Ať to jsou vitamíny, minerální látky, bílkoviny, sacharidy, lipidy či antioxidantní látky, všechny jsou potřebné pro správný chod lidského organismu. Přítomné antioxidantní látky mají antimutagenní účinek, snižují oxidační stres, pomáhají snižovat riziko srdečních onemocnění a určitých typů rakoviny [15,16]. Žito je zdravotního hlediska prospěšné při nadváze a obezitě, zácpě, u diabetes mellitus I. typu, u kardiovaskulárních onemocnění a u nádorových onemocnění tlustého střeva nebo konečníku [17]. Ječmen obsahuje β -glukany, které kontrolují cukrovku a snižují hladinu cholesterolu [18]. Slupky ovesa obsahují látky, které mají vlastnosti kariostatik. V některých studiích o ovsu se diskutuje o pozitivním vlivu na snižování hladiny cholesterolu a glukózy v krvi, dokonce má i důležitou roli v imunitním systému [3,19]. Proso má kromě antioxidantních také antiproliferační účinky [20].

Tabulka 1: Obsah bílkovin, sacharidů a lipidů v obilovinách [převzato z 3, 4, 17, 19, 21-26]

Obilnina	Bílkoviny [%]	Sacharidy [%]	Lipidy [%]
Pšenice	14	69	2-3
Žito	9-14	78-86	2-3
Ječmen	11	69	2-3
Oves	13	66	2-12
Kukuřice	9	73	5
Rýže	9	78	2-3
Proso	11	70	4

Tabulka 1 názorně ukazuje, že na bílkoviny je ze základních obilovin nejbohatší pšenice (14 g/100g) a hned za ní jsou společně žito a oves. Naopak nejméně bílkovin obsahuje kukuřice společně s rýží. Nejvíce sacharidů obsahuje žito (78-86 g/100g) a za ním následuje hned rýže (77,9 g/100g). Zbytek obilovin má průměrně kolem 70 g/100g sacharidů. Na lipidy jsou obiloviny velmi chudou surovinou, až na ječmen, který obsahuje 70 g/100 g lipidů.

Tabulka 2 shrnuje celkový obsah vitamínů, minerálních látek a antioxidantů v jednotlivých obilovinách. Z vitamínů jsou zastoupeny nejvíce vitamíny skupiny B (B1, B2, B3, B6). Alespoň jeden z vitamínů skupiny B je zastoupen v každé obilovině. Žito, ječmen a oves má ještě navíc vitamín E. Kukuřice obsahuje provitamín A. Z minerálních látek se nejvíce objevují draslík, vápník, hořčík a železo. Nejbohatší na obsah minerálních látek je žito. Rýže jako jediná obsahuje ve svých částech fluor. Obsah antioxidantních látek je ve všech obilovinách podobný. Zastoupeny jsou nejvíce fenolové kyseliny, flavonoidy a tokoferoly.

Tabulka 2: Obsah vitamínů, minerálních látek a antioxidantů v obilovinách [převzato z 3, 4, 17, 19, 21-26]

Obilnina	Vitamíny	Minerální látky	Antioxidační látky
Pšenice	B1, B6	draslík, vápník, železo, hořčík, zinek	fenolové kyseliny, karotenoidy, tokoferoly, flavonoidy
Žito	E, vitamíny skupiny B	fosfor, hořčík, vápník, draslík, železo, měď, mangan, zinek, selen	fenolové kyseliny, flavonoidy, isoflavonoidy, lignany, stilbeny, fytosteroly, fytostanoly, alkyresorcinoly a komplexní fenolické polymery
Ječmen	E, vitamíny skupiny B	hořčík, síra, sodík, draslík, zinek, vápník	β-glukany, fenolové kyseliny, flavonoidy, anthocyanin
Oves	E, B3	křemík, fosfor, draslík, hořčík	tokoferoly, β-glukany, fenolové kyseliny, flavonoidy, steroly
Kukuřice	vitamíny skupiny B, provitamin A	draslík, fosfor, hořčík, železo	karotenoidy, tokoferoly, fytové kyseliny, anthokyaniny, fenolové kyseliny
Rýže	B1, B2, B3, B6	draslík, hořčík, zinek, mangan, fluor	tokoferoly, tokotrienoly, fenolové kyseliny
Proso	B1, B2, PP	hořčík, fosfor, železo, křemík	fenolové kyseliny, flavonoidy

Využití pseudoobilovin ve výživě člověka nebylo do nedávna nijak velké, nicméně s módními trendy zdravé stravy a s přibývajícím počtem lidí trpících neschopností trávit lepek jejich význam vzrostl. Jedná se zejména o nenáročné plodiny, které se mohou pěstovat i ve vyšších nadmořských výškách. Jsou jedinečné zejména díky velkému množství tělu prospěšných látek, které obsahují. Obsahují vysoce kvalitní bílkoviny, velké množství škrobu, minerálních látek, vitamínů a bioaktivních látek a navíc neobsahují lepek [27].

Amarant (Obrázek 2 A) neboli laskavec je nenáročnou plodinou, která lze pěstovat na půdách s nižší kvalitou, je odolná proti vysokým teplotám a suchu. Jedna rostlina vyprodukuje velké množství semen, které jsou bohaté na bílkoviny. V porovnání s normálními obilovinami je obsah bílkovin dvojnásobný. Bílkoviny jsou vysoce kvalitní a složením aminokyselin připomínají bílkoviny živočišného původu, proto by měl být zařazen v jídelníčku vegetariánů. Bílkoviny amarant mají vysoký obsah lyzinu, albuminů a sirných aminokyselin. Z hlediska potravinářství jsou u amarantu zajímavé i listy, které mají také vysokou nutriční hodnotu jako semena a připravují se podobně jako listová zelenina (např. špenát). Amarant je rovněž bohatý na vitamíny, minerální látky a antioxidanty. Lipidy jsou

zastoupeny z velké části nenasycenými mastnými kyselinami, ale také je přítomen skvalen. Skvalen inhibuje nadbytečnou syntézu cholesterolu v těle [3].



Obrázek 2 Pseudoobiloviny: amarant (A), quinoa (B) [převzato z 28, 29]

Quinoa (Obrázek 2 B) neboli merlík chilský je pěstován pro svá semena, která jsou podobná prosu, a také pro listy, ze kterých jsou připravovány saláty. Semena merlíku mají vysokou nutriční hodnotu. Obsah bílkovin je velký, aminokyselinové složení je velice pestré a bohaté. Lyzinu obsahuje více než dvojnásobné množství oproti klasickým obilovinám. Významný je i obsah sirných aminokyselin (arginin a histidin). Lipidy obsahují zejména nenasycené mastné kyseliny. Obsah minerálních látek, vitamínů a antioxidantů je u merlíku také významný [3,27].

Pohanka je stěžejní surovinou pro výrobu raw sušenek v experimentální části, byla jí proto věnována celá následující kapitola 1.2.

V tabulce 3 jsou zobrazeny údaje o obsahu bílkovin, sacharidů a lipidů u amarantu, quinoi a pohanky. Tabulka 4 obsahuje informace o přítomných vitamínech, minerálních látkách a antioxidantech v quinoe, amarantu a pohance.

Tabulka 3: Obsah bílkovin, sacharidů a tuků v pseudoobilovinách [4,27]

Pseudoobiloviny	Bílkoviny [%]	Sacharidy [%]	Lipidy [%]
Quinoa	11-17	60-75	4-9
Amarant	13-18	58-69	7-8
Pohanka	12	73	4

Z tabulky 3 je patrné, že největší obsah bílkovin z trojice pseudoobilovin má amarant společně s quinoou. Obsah sacharidů je u všech podobný, ale nejvíce jich má quinoa. Na lipidy je nejvíce bohatá quinoa společně s amarantem.

V porovnání s klasickými obilovinami mají pseudoobiloviny průměrně vyšší obsah bílkovin. Obsah sacharidů je u obilovin a pseudoobilovin různý. Nejméně sacharidů však obsahuje amarant a quinoa. Pohanka je z hlediska obsahu sacharidů průměrná v porovnání s běžnými obilninami. V obsahu lipidů se klasické obiloviny a pseudoobiloviny liší. Zatímco u klasických obilovin je obsah lipidů většinou nízký (kromě ovsa), kolem 2-3%. Obsah lipidů u pseudoobilovin je více jak dvojnásobný.

Tabulka 4: Přehled vitamínů, minerálních látek a antioxidantů přítomných v quinoe, amarantu, pohance [3,4,27]

Obilnina	Vitamíny	Minerální látky	Antioxidační látky
Quinoa	E, vitamíny skupiny B	fosfor, draslík, hořčík, vápník	fenolové kyseliny, flavonoidy
Amarant	C, vitamíny skupiny B	fosfor, draslík, vápník, hořčík, železo, sodík	fenolové kyseliny, flavonoidy, skvalen, taniny
Pohanka	E, vitamíny skupiny B	draslík, fosfor, hořčík, železo, zinek, měď, mangan, vápník	fenolové kyseliny, flavóny, flavonoidy, fytosteroly, fagopyríny

Vitamíny přítomné v klasických obilovinách i pseudoobilovinách jsou hodně podobné, U všech jsou přítomny vitamíny skupiny B a většinou i vitamín E. Amarant navíc ještě obsahuje vitamín C. Co se minerálních látek týče, jsou povětšinou přítomny fosfor, draslík, hořčík, železo a vápník. Výskyt antioxidantů jsou všech pseudoobilovin a obilovin podobný.

2.2. Pohanka

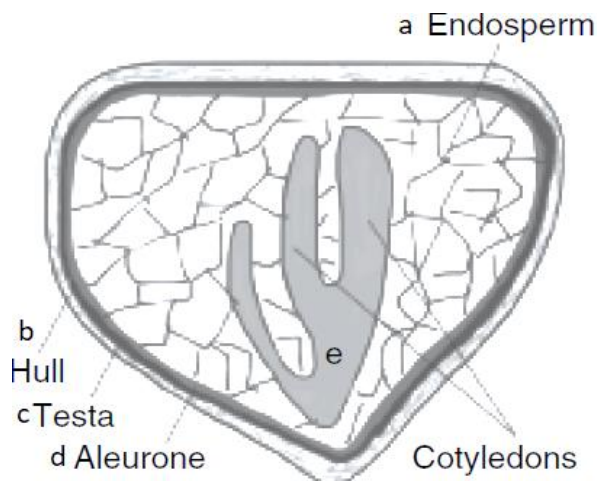
Tato jednorocní dvouděložná rostlina pochází ze střední a severní Asie. Ve 13. století se dostala do Evropy. Největší rozmach jejího pěstování byl na našem území v 16. století. Podle botanického hlediska jsou po celém světě nejnámější dva druhy a to pohanka obecná neboli setá (*Fagopyrum esculentum Moench*) a pohanka tatarská (*Fagopyrum tataricum*), která je méně náročnou rostlinou, a proto může být pěstována i v horských oblastech s chudší půdou. Oba druhy jsou si velice příbuzné, ale našly by se malé rozdíly mezi jejich anatomii listů a květů [30,31].

Pohanka (Obrázek 3) se dorůstá 60 až 70 cm. Má vzpřímené hladké stonky, listy jsou jednoduché do tvaru srdce. Dolní listy jsou řapíkaté a dolní přisedlé. Květy pohanky jsou bílé nebo růžové barvy a jsou uspořádány do kalichu [27].



Obrázek 3 Pohanka setá [převzato z 33]

Plodem této rostliny je jednosemenná trojboká nažka (Obrázek 4). Trup je černý a pokrývá světle zelené až bílé jádro. Trup nažky má větší hustotu než voda a proto lze z jádra dobře odstranit [32].



Obrázek 4 Anatomie nažky pohanky: endosperm (a), trup (b), testa - osemení (c), aleuronová vrstva (d), děložní lístek (e) [převzato z 27]

Pohanka má široké využití zejména v potravinářství, kde je zpracována na mouku či krupici. Dále se z těchto surovin vyrábějí různé druhy těstovin, které jsou oblíbené v hlavně v Japonsku, Číně či Itálii. Kromě těstovin se z pohanky vyrábí zelený pohankový čaj, pohankové klíčky, pohankový ocet či pivo [34].

2.2.1. Sacharidy

Celkový obsah sacharidů v pohance je 68-73 %. Škrob zaujímá 55 % pohankové nažky a tím je nejen nejvíce zastoupenou složkou ze sacharidů, ale také v nažce vůbec. Jeho zastoupení závisí na druhu pohanky. Škrob se ukládá v endospermu zrna a plní zde zásobní funkci. Odtud si rostlina bere energii pro svůj další růst. Škrob se skládá ze dvou polymerů, amylozy a amylopektinu. Amylóza je ve škrobu obsažena z 18,7-47 %. Obsah amylozy může mít vliv na bobtnavost a rozpustnost pohankového škrobu. Obsah amylopektinu zase ovlivňuje viskozitu a tím želatinizační vlastnosti [27,35].

Rozpustné sacharidy jsou přítomny v nažce pohanky okolo 2 %. Jedná se zejména o ramnósu, fruktózu, glukózu, sacharózu, maltózu a rafinózu. Nejvíce je v zrně zastoupena sacharóza a rafinóza. Rozpustné sacharidy jsou společně s fagopyritoly koncentrovány v embryu. Neškrobové polysacharidy (polysacharidy celulózy a necelulózoové) jsou nejvíce obsaženy v tkáních s tlustšími buněčnými stěnami [35-37].

2.2.2. Bílkoviny

Obsah bílkovin v pohance se pohybuje okolo 12 %, avšak bylo zjištěno, že tento údaj je ovlivněn druhem pohanky, prostředím, ve kterém se rostlina nachází a také způsobem hnojení. V jednotlivých částech zrna se množství bílkovin liší. Ve vnitřních částech zrna je zastoupení bílkovin pouhých 1-2 %, naopak ve vnějších částech je to až 40 % [27]. Bílkoviny v pohance jsou velice kvalitní. Složení aminokyselin je v pohance vyvážené na rozdíl od jiných plodin. Výživová hodnota je mnohem vyšší než u klasických obilovin [33].

V porovnání s klasickými obilninami obsahuje pohanka velmi málo nebo žádné množství prolaminu. Tato bílkovina je složena z kyseliny glutamové a prolinu, množství těchto aminokyselin je proto v pohance velice nízké. Dále pohanka obsahuje vysoké procento glutamové kyseliny 18,6 %. Aspartové kyseliny obsahuje 11,3 %, argininu 9,7 %, lysinu 6,1 %, prolinu 3,9 % [38].

Bílkoviny se dělí podle rozpustnosti do několika skupin. První skupinou jsou globuliny, které jsou rozpustné ve vodných solných roztocích, jako je chlorid sodný. Druhou skupinu tvoří albuminy, které jsou extrahovatelné ve vodě. Třetí skupina zahrnuje prolaminu, které jsou rozpustné ve vodných roztocích alkoholu (60% etanolu). A poslední skupinou jsou gluteliny, které jsou částečně rozpustné ve zředěných kyselinách či zásadách [31]. V pohankovém zrně jsou nejvíce zastoupeny albuminy a globuliny. Obsah prolaminů a glutelinů je hodně nízký. Naopak tyto dvě bílkovinné skupiny jsou nejrozšířenějšími u pšenice, kde tvoří lepek. Množství a poměr jednotlivých frakcí se mění dle druhu pohanky [31,36].

Albuminy zaujímají z celkového obsahu přítomných bílkovin okolo 25 %. V pohance je nejběžnější albumin se sedimentačním koeficientem 2S. Dělí se na dvě skupiny. První skupina má MW mezi 8-12 kDa a druhá blízko 16 kDa. Vazba mezi proteiny není disulfidického charakteru [31].

Globuliny jsou nejvíce zastoupenou skupinou proteinů v zrně pohanky, 64,5 %. Globuliny se dále dělí ještě na dvě podskupiny, které se liší svou molekulovou hmotností (MW) a různými sedimentačními koeficienty. Jednou podskupinou jsou 13S globuliny, jejichž MW je 28 kDa. V pohance je přibližně 33 % těchto globulinů a jsou hlavním zásobním proteinem. 13S globuliny mají hexamerickou strukturu, která se skládá z kyselých a bázičkových polypeptidů vázaných disulfidickými vazbami. Tato struktura je podobná pro všechny proteiny uchovávací legumin. Struktura 13S globulinu je složena z a, b a c

polypeptidů. Jednotlivé rozmezí jejich MW je přibližně 55-60, 32-44 a 16-29 kDa. Druhou podskupinu tvoří 8S globuliny, který jsou menší, s MW 57-58 kDa. Strukturně jsou 8S globuliny trimery a zaujímá přibližně 7 % z celkového množství proteinů v zrně pohanky. Jsou to proteiny podobné vicilinu [36,38].

Prolaminy se u všech cereálií vyskytují v nízkých koncentracích. V jedné ze studií byly prolaminy děleny pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). Tento typ elektroforézy je výhradně využíván pro separaci bílkovin. Dodecylsulfát sodný je anionaktivním detergentem a nese velký náboj, který vyrovnává nábojové rozdíly bílkovin. Následně mohou být bílkoviny děleny pouze na základě jejich velikostí. Separací byly odděleny prolaminy s MW 10-28 kDa. V další studii byl prolamin rozdělen do pěti dvourozměrných SDS-PAGE částí s proteiny o MW okolo 50 kDa, 39 kDa, 32 kDa, 31-59 kDa a 22 kDa [31].

Gluteliny jsou poslední skupinou a zaujímají přibližně 4 % z celkového obsahu proteinů. Skladba glutelinů se značně liší v jednotlivých druzích pohanky. Většinou jsou gluteliny složeny z tří až pěti podjednotek, které jsou spojeny disulfidickými vazbami. Jejich MW se pohybuje mezi 43-66 kDa [31].

2.2.3. Vitamíny a minerální látky

Pohanka obsahuje velké množství vitamínů. Nažky pohanky jsou důležitým zdrojem vitamínu B1 (thiamin), kterého obsahují 3,3 mg/kg. Vitamín B2 (riboflavin) se vyskytuje v množství 10,6 mg/kg, B3 (niacin) se nachází v koncentraci 18 mg/kg, B5 neboli kyselina listová se vyskytuje v množství 11 mg/kg a vitamín B6 (pyridoxin) se vyskytuje v množství 1,5 mg/kg. V pohankových výhoncích můžeme pak najít kromě vitamínu B1 a B6 také vitamín C (kyselinu askorbovou) [3,15].

V porovnání s běžnými obilninami obsahuje podobné zastoupení vitamínů skupiny B. Na rozdíl třeba od žita, ječmene či ovsa neobsahuje vitamín E. Naopak pohanka, jako jediná ze všech obilovin, obsahuje vitamín C.

Kromě vitamínů obsahují i řadu prvků, které jsou důležité pro správný chod organismu. Minerální látky se hromadí v embryu zrna, v semenech a trupu. Pohanka tatarská obsahuje více minerálních látek než pohanka setá. Nejvíce zastoupenými prvky jsou draslík, fosfor, hořčík, železo, zinek, měď, mangan či vápník. Ve stopovém množství obsahuje železo, selen, měď, mangan a zinek. Pohanková mouka obsahuje přibližně 400 mg/100 g hořčíku, draslíku a fosforu, 12 mg/100 g vápníku, 3 mg/100 g železa a zinku, 1,5 mg/100 g manganu

a 0,5 mg/100 g mědi. Zastoupení minerálních látek je podobné jako u běžných obilovin [5, 35,36].

2.2.4. Lipidy

Lipidy tvoří přibližně 4 % pohankové nažky. Nejvíce se jich nachází v embryu (11 %), kde slouží k výživě zárodku. Nejméně je lipidů v obalových částech (1 %). Hlavní složkou neutrální lipidové frakce jsou triacylglyceridy, které zaujímají více jak dvě třetiny z celkového množství lipidů. Fosfolipidy jsou zastoupeny z 10 % a glykolipidy jsou obsaženy z 5 %. Z mastných kyselin jsou více zastoupeny nenasycené mastné kyseliny a to z 80 %, oproti 20 % nasycených mastných kyselin. Nejvíce zastoupenými nenasycenými kyselinami jsou kyselina olejová, linolová a linolenová. U nasycených mastných kyselin tvoří převážnou část kyselina palmitová [35,36].

2.2.5. Antioxidanty pohanky

Obsah fenolických látek a jejich distribuce v pomleté pohance závisí na odrůdě pohanky, na podmínkách pěstování, na životním prostředí, podmínkách mletí a rafinace zrna. Všechny tyto aspekty ovlivňují i antioxidační aktivitu. Většina obilovin má fenolické látky vázané na buněčnou stěnu jednotlivých buněk trupu zrna. Nicméně pohanka obsahuje většinu fenolických látek ve volné formě, a ty jsou distribuovány v celém objemu zrna [38]. Antioxidanty v pohance zahrnují hned tři podskupiny bioaktivních látek, a to fenolové kyseliny, flavonoidy a tokoferoly. Pohanka obsahuje dvakrát až pětkrát více antioxidačních látek než oves nebo ječmen [27].

Flavonoidy jsou polyfenolycké látky, které jsou sekundárními metabolity rostlin. Mohou ovlivňovat organoleptické vlastnosti jídel. Podle výzkumů obsahuje vyšší podíl flavonoidů pohanka tatarská než setá. Rutin je nejvíce zastoupeným flavonoidem v pohance a je i z hlediska antioxidační ochrany lidského organismu nejvýznamnějším. Z pseudocereálií je pohanka jediná, která rutin obsahuje a ještě v takovém množství. Jeho obsah se liší v různých částech rostliny. Největší obsah rutinu je v květenství (12 % vztaženo k sušině), v horních listech je obsažen z 8-10 % a ve stoncích je přítomno pouhých 0,4-1 % [27, 32,35]. Dalšími významnými flavonoidy v pohance jsou orientin, vitexin, kvercetin, isovitexin a isoorientin, isokvercitrin, kvercitrin, katechin, epikatechin, hyperin, luteolin [34,35].

Přítomné fenolické kyseliny také svou měrou přispívají k antioxidační aktivitě. V semenech se vyskytují hlavně kyseliny ferulová, protokatechová a p-hydroxybenzoová,

ale byly detekovány i kyseliny p-kumarová, galová, kávová, vanilová či syringová. V květenství byly nalezeny kyselina chlorogenová, p- anisolová a salicylová [40].

2.2.6. Terapeutické účinky

Jak již bylo zmíněno výše, tato rostlina obsahuje řadu látek, které mají pozitivní význam na lidský organismus. Ať je to vysoký obsah kvalitních bílkovin, obsah vlákniny, velkého počtu minerálních látek, vitamínů, více nenasycených mastných kyselin, cholinu či antioxidantů. Každá z těchto látek má svou úlohu v organismu a svým způsobem mu pomáhá.

Avšak největší kredit je přisuzován flavonoidu rutinu, který má značný vliv na zdraví člověka. Rutin zvyšuje vaskulární permeabilitu, posiluje stěny cév, inhibuje hyaluronidázu, zvyšuje obranyschopnost organismu, má protizánětlivé a antioxidační účinky. Dále je využíván při léčbě křečových žil, alergií, hemoragií, hemeroidů, bércových vředů či hypertenzi. Nažky jsou zodpovědné za snižování cholesterolu, při střevních potížích a k detoxikaci organismu. Protože pohanka neobsahuje lepek je vhodná ke konzumaci celiaky [41,42].

2.3. Antioxidanty

Jsou to sloučeniny, které mohou zabránit biomolekulám (proteiny, nukleové kyseliny, lipidy, sacharidy), aby byly poškozeny volnými radikály. Mezi tyto látky patří syntetické a přírodní antioxidanty. Zejména o ty přírodní je v dnešní době velký zájem. Mezi přírodní antioxidanty se řadí některé vitamíny (vitamín C a E), byliny a koření (rozmarýn, tymián, oregano, šalvěj, bazalka, pepř, hřebíček a další) a rostlinné extrakty. Jak syntetické, tak přírodní antioxidanty přispívají ke snížení obsahu volných radikálů, které mohou být pro tělo nebezpečné. Přírodní antioxidanty jsou látky přítomné v tkáních rostlin, kde vznikly jako jejich ochrana před neustálým působením volných radikálů. Rostlinné tkáně jsou neustále vystavovány UV záření, a proto si vytvořili určité systémy, které je před nimi ochrání. [43,44].

Volné radikály jsou antioxidanty inhibovány a zpomalují tím autooxidaci nebo přerušují šíření volných radikálů jedním, ale kolikrát i více následujícími způsoby. Některé antioxidanty volné radikály přímo zachytí a iniciují tím peroxidaci. Jiné chelatací iontů kovů zajistí, že volné radikály se nestanou reaktivními a tudíž nejsou schopny rozkládat peroxidy

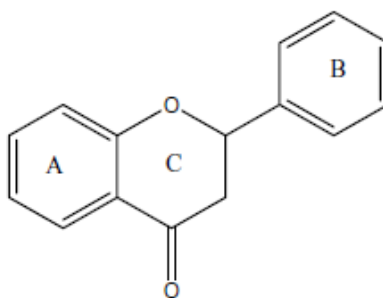
lipidů. Další zhasí kyslíkový radikál, což je prevencí před tvorbou peroxidů. A jedním z posledních mechanismů je přerušení autooxidační řetězové reakce nebo snížení lokalizovaných koncentrací kyslíku [43].

Nejvíce účinnými antioxidanty jsou ty, které přerušují řetězovou reakci s volnými radikály. Tyto antioxidanty ve struktuře obsahují aromatické nebo fenolové jádro. Stanou se pak donorem vodíkového radikálu, který reaguje se vzniklými volnými radikály během oxidace, a samy se stanou radikály (Rovnice 1). Tímto způsobem pracuje většina antioxidantů získaných z rostlinných výtažků [43].



Rostlinné antioxidační látky se rozlišují do čtyř základních skupin. První skupinou jsou flavonoidy, druhou jsou fenolové kyseliny, třetí jsou fenolické diterpeny a poslední jsou těkavé oleje. Mechanismem působení fenolových kyselin je zachycení volného radikálu. Flavonoidy mají stejný mechanismus působení jako fenolové kyseliny a ještě navíc mohou chelatovat ionty kovů, ty následně způsobí, že se radikál nestane aktivním [43].

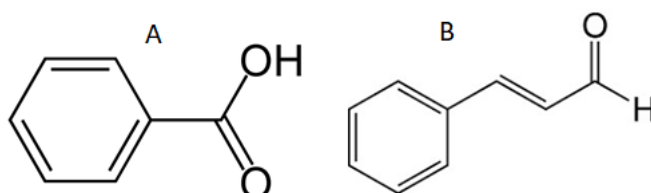
Základní strukturou flavonoidů je flavonové jádro, které je znázorněna na Obrázku 5. Schopnost zachytávat volné radikály závisí na počtu a umístění -OH skupin na flavonovém jádře. Čím více hydroxylových skupin je přítomno na základním skeletu, tím je antioxidant účinnější. Mezi nejznámější zástupce řadíme epikatechin, katechin, kvercetin, rutin, epikatechin gallát, epigallokatechin gallát [43].



Obrázek 5 Flavonové jádro

Fenolové kyseliny jsou deriváty kyseliny benzoové a skořicové, jejichž struktury jsou na obrázku 6. Základní skelet je stejný, ale poloha a počet hydroxylových skupin se liší. Jako fenolové kyseliny jsou často označovány i aldehydové analogy jako například vanilin. Téměř ve všech rostlinách jsou přítomny kyselina p-kumarová, kávová, vanilová, ferulová a protokatechová. Naopak jsou kyseliny, které se vyskytují pouze u určitých druhů a jsou pro

dané rostliny charakteristické (kyselina gentisová – hořec žlutý nebo kakao, syringová – kakao). Fenolové kyseliny jsou rozptýleny v celém těle rostliny. Jen malá část fenolových kyseliny se v rostlině vyskytuje jako volná, většinou jsou vázané ve formě esteru, etheru a dalších sloučenin. Tato strukturní variabilita je jeden z hlavních důvodů, proč není analýza fenolových kyselin úplně snadná. Další překážkou jsou růstové podmínky a teplota, které mají vliv na obsah kyselin v rostlině [46,47].

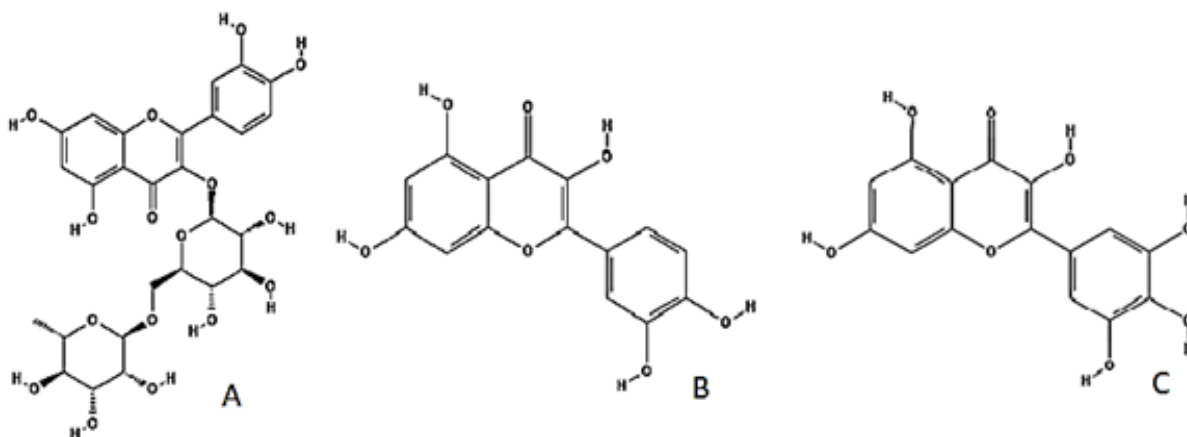


Obrázek 6 Chemická struktura: kyseliny benzoové A, kyseliny skořicové B

V následujících podkapitolách budou podrobněji popsány vybrané antioxidanty, které jsou zároveň stanovovány i v experimentální části. Bylo vybráno pět flavonoidů (rutin, kvercetin, epikatechin, katechin, myricetin) a devět fenolových kyselin (ferulová, chlorogenová, protokatechová, syringová, kávová, vanilová, sinapová, p-kumarová, galová), které v pohance převažují.

2.3.1. Rutin

Tento flavonoid je znám pod strukturním názvem jako kvercetin 3-rutinosid, někdy je také označován jako vitamín P. Chemicky je rutin glykosidem, který obsahuje flavonolický aglykon kvercetinu s disacharidovou rutinózou (Obrázek 7A). Název rutin pochází z názvu rostliny *Ruta graveolens* neboli ruta vonná, ve které byla tato látka poprvé identifikována. [48,49].



Obrázek 7 Chemický vzorec rutinu(A), kvercetin(B), myricetinu(C)

Je přítomen ve více jak 70 druzích rostlin, ale i ovoci a zelenině. Největší obsah přírodního rutinu je v pohance. Je syntetizován rostlinami jako sekundární metabolit, který chrání rostliny před ultrafialovým zářením a proti chorobám. Jeho jedinou nevýhodou je špatná biologická dostupnost, protože je velice málo rozpustný ve vodě, je nestabilní a je omezeně propouštěn membránami [32,48].

Ze zdravotního hlediska je téměř univerzálním lékem. Mnoho studií se zabývalo jeho pozitivními účinky na lidský organismus. Má neuroprotektivní účinky, jeho účinky mají i určitý vliv na boj s Alzheimerovou chorobou, je selektivním a netoxickým modulátorem u hypercholesterolemie, antioxidační účinky jsou asi nejznámějšími, také posiluje stěny cév, známi jsou i jeho protirakovinné účinky u některých druhů rakovin a významnými jsou i jeho antivirové a antibakteriální účinky [49].

2.3.2. Kvercetin

Kvercetin je dalším zástupcem flavonoidů rostlin. Jeho strukturní název je 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavanon. Chemicky se jedná o aglykon a nemá ve struktuře vázaný cukr (Obrázek 7B). Název vznikl z latinského termínu *quercentum*, což v překladu znamená dubový les.

Tento antioxidant je přítomný v červeném víně, cibuli, zeleném čaji, jablkách, bobulích, hroznech, rajčatech, červeném grepu, citrusovém ovoci, brokolici, další listnaté zelenině a také v mnoha rostlinách.

Předpokládá se, že má mnoho pozitivních účinků na lidský organismus. Stabilizuje propustnost buněčné membrány, inhibuje agregaci krevních destiček a podporuje funkci endotelu, tím, že umožňuje rychlou dopravu oxidu dusnatého a následnou vazodilataci. Má antihistaminové účinky, ochraňuje před oxidačním stresem a pozitivní účinek byl potvrzen i u kardiovaskulárních onemocnění [50-52].

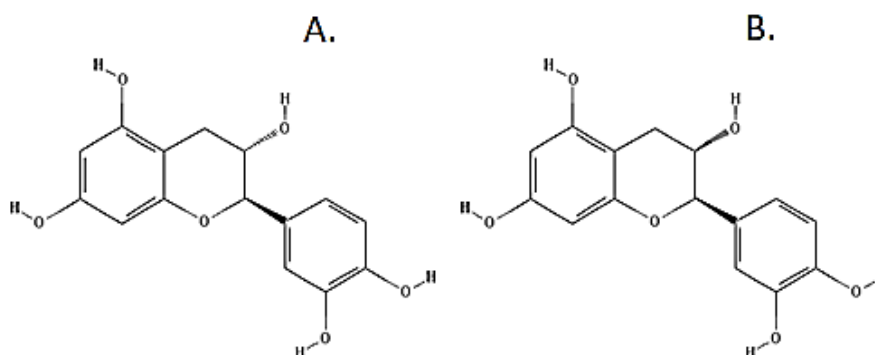
2.3.3. Myricetin

Tento flavonoid, jehož strukturní název je 3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavon, je většinou vázaný na cukr. Ve volné formě se vyskytuje zřídka. Základem jeho struktury je flavonové jádro, na kterém je navázáno šest hydroxylových skupin (Obrázek 7C). Na myricetin je bohatá zelenina, ovoce, ořechy, bobule, čaje a víno.

Vyazuje protizánětlivé, protirakovinné, antivirové, antihyperglykemické a silné antioxidační účinky. Při výzkumech bylo zjištěno, že má pozitivní účinek při zánětlivých kožních onemocněních [53,54].

2.3.1. Katechin a epikatechin

Katechin a epikatechin patří do skupiny flavonoidů, konkrétně do podskupiny flavanolu. Základním skeletem těchto izomerů je flavonové jádro, liší se však v prostorovém uspořádání (Obrázek 8). Jsou nejhojněji se vyskytujícími se polyfenoly v potravinách.

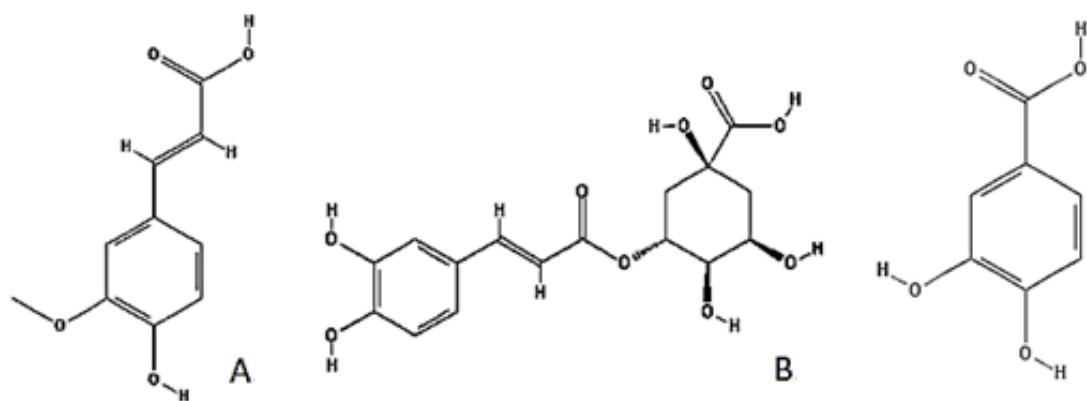


Obrázek 8 Chemický vzorec katechin (A), epikatechin (B)

Vyskytují se v rostlinách, ovoci (jablka, borůvky, angrešt, hroznové víno, kiwi, jahody), zelený a černý čaj, červené víno, pivo, kakao, čokoláda. V ovoci katechiny představují až 85 % celkového obsahu polyfenolů. Katechiny podléhají tepelnému ošetření, proto jsou často spojeny s negativními změnami kvality potravin [55,56].

2.3.2. Ferulová kyselina

Strukturním názvem kyselina 4-hydroxy-3-methoxyskořicová je jednou z neznámějších fenolových kyselin. Chemicky se jedná o derivát kyseliny skořicové (Obrázek 9A).



Obrázek 9 Chemický vzorec kyseliny ferulové(A), chlorogenové(B), protokatechové(C)

Je obsažena zejména v obilninách, rajčatech, citrusovém ovoci, zelenině. V obilninách se vyskytuje ve vnější vrstvě obilného zrna a u rostlin je lokalizována v buněčné stěně.

Její terapeutické účinky už jsou dlouho využívány v čínské medicíně. Je silným antioxidantem, snižuje aktivitu cholesterolu, je využívána k léčbě trombózy a arterosklerózy, má antivirové a antibakteriální účinky [57-59].

2.3.3. Chlorogenová kyselina

Kyselina chlorogenová také dle strukturního názvu kyselina 5-kafeoylchinová je jednou z dalších fenolových kyselin, která je přirozeně se vyskytujícím rostlinným antioxidantem. Chemicky se jedná o ester kyseliny kávové a chinové (Obrázek 9B).

Vyskytuje se v jablcích, hruškách, třešních, v kávě a celé řadě rostlin. Je využívána v čínské medicíně. Má mnoho izomerů. Je tepelně labilní a proto může při zpracování surovin dojít k jejím strukturálním změnám, které mohou ovlivnit kvalitu potraviny.

Kyselina chlorogenová je velice bioaktivní sloučeninou, která má antibakteriální, antioxidantní, antivirové a protirakovinné účinky. Dokonce má inhibiční účinky na karcinogenezi tlustého střeva, jater a jazyku. V některých studiích se píše o pozitivních účincích proti HIV [60-63].

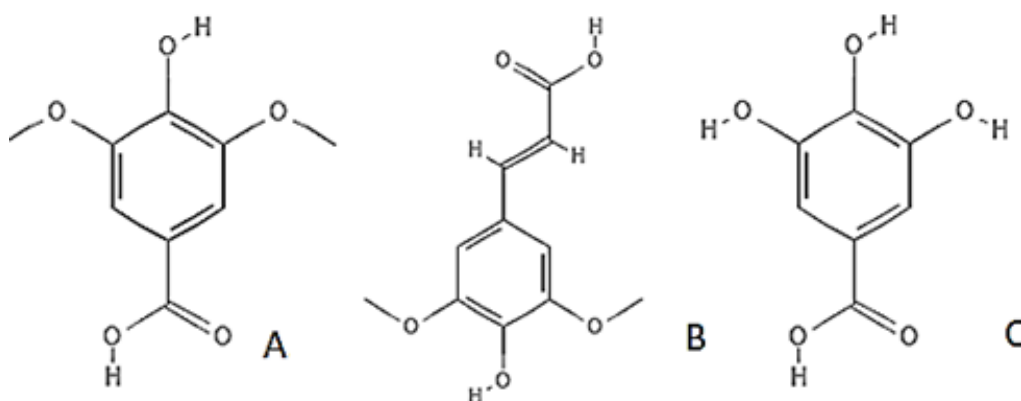
2.3.4. Protokatechová kyselina

Kyselina protokatechová neboli kyselina 3,4-dihydroxybenzoová je dalším zástupcem fenolových kyselin (Obrázek 9C). Je přítomna v zelenině, ovoci a některých rostlinách jako jsou například olivy, ibišek súdánský, gumojilm jilmový, bílé hroznové víno či kalamantin. Jako většina přírodních antioxidantů má pozitivní účinky na organismus. Působí antioxidantně,

antibakteriálně, antimutageně, antihyperglykemicky a byly zaznamenány i preventivní účinky u kardiovaskulárních onemocnění [64,65].

2.3.5. Syringová kyselina

Syringová kyselina je také známa pod strukturním názvem jako kyselina 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoová (Obrázek 10A). Je přítomna v obilovinách, v houbě zvané Houževnatec jedlý, která je známá také pod názvem šitake, *Herba dendrobii* (druh orchideje), v listech rostliny zvané galgán. I tato fenolická kyselina má mnoho příznivých účinků pro zdraví organismu. Může potlačit jaterní fibrózu při chronickém poškození jater, má antibakteriální, antioxidační či protizánětlivé účinky [66,67].



Obrázek 10 Chemický vzorec kyseliny syringové(A), sinapové(B), galové(C)

2.3.6. Sinapová kyselina

Sinapová kyselina je derivátem kyseliny skořicové. Strukturním názvem 3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyfenyl)prop-2-enová kyselina je kyselina, která patří mezi 4 nejrozšířenější kyseliny v rostlinách, které jsou odvozené od kyseliny skořicové (Obrázek 10B). Je zastoupena zejména v u rostlin brukvovitých (hořčice). Dále je obsažena v ovoci, zelenině (ředkvičky), obilninách a koření.

Její terapeutické účinky jsou stejné jako u ostatních antioxidantů. Nejvíce se projevují její antimikrobiální, protizánětlivé, protinádorové a antioxidační účinky. Pozitivní účinky kyseliny sinapové byly prokázány u rakovinných onemocnění, kardiovaskulárních chorob či neurodegenerativních poruch [68].

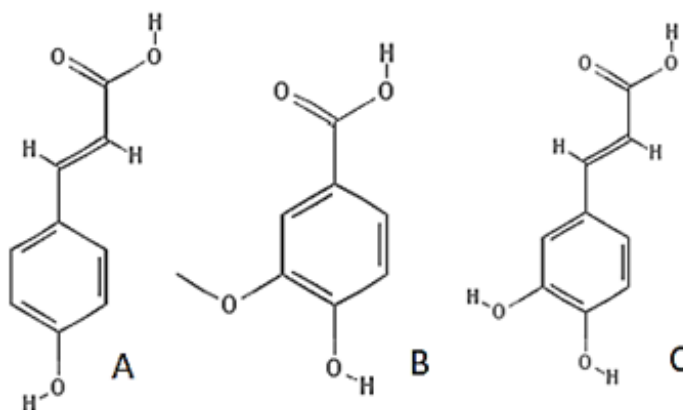
2.3.7. Kyselina galová

Kyselina galová se řadí mezi jednu z fenolických kyselin, jejíž strukturní název je kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová (Obrázek 10C). Její využití není pouze v potravinářském průmyslu jako antioxidant, ale je využívána jako zdroj materiálu pro inkousty a barvy, v kosmetice a ve farmaceutickém průmyslu.

Vyskytuje se zejména v rostlinách, ořechách, červeném víně, zeleném čaji, ovoci a její deriváty jsou obsaženy ve žlutcích, dubové kůře či koření. Jako jeden z antioxidantů zabraňuje oxidačnímu stresu. Jsou známy i její antivirové, antimikrobiální, protialergické a protinádorové účinky na lidský organismus [69,70].

2.3.8. Kyseliny p-kumarová

Kyselina p-kumarová je někdy nazývána jako parakumarová kyselina a je jednou z derivátů kyseliny skořicové. Její strukturní název je (E)-3-(4-hydroxyfenyl)prop-2-enová kyselina (Obrázek 11A). Další z fenolových kyselin, která je obsažena ve většině jedlých rostlin, arašídech, zelenině (rajčata, mrkev, česnek), ovoci (jablka, hrušky, hrozny, pomeranče), obilovinách, houbách a ve víně.



Obrázek 11 Chemický vzorec kyseliny p-kumarové (A), vanilové (B), kávové (C)

Bylo zjištěno, že podobně jako flavonoidy má příznivé účinky při léčbě Parkinsonovy choroby. Mohla by být využívána při léčbě jaterních onemocnění, arteriosklerózy a srdečních onemocněních. Kromě typických účinků antioxidantů, pomáhá u poškození oční tkáně, poranění neuronů a působí protivředově [71, 72].

2.3.9. Kyselina vanilová

Kyselina vanilová, která je využívána nejen v potravinářství ale i ve farmacii či parfumerii, je přirozeně získávána z rostlin. Je odvozena od kyseliny benzoové a její strukturní název je kyselina 4-hydroxy-3-methoxybenzoová (Obrázek 11B). Často je využívána v tradiční čínské medicíně. Obsažena je hlavně v rostlinách a ovoci.

Výzkumy prokázaly její pozitivní účinek u kardiovaskulárních, gastrointestinálních a jaterních onemocnění. Působí protirakovinotvorně a přínosem jsou zejména protizánětlivé účinky u akutních zánětlivých stavů [73-75].

2.3.10. Kyselina kávová

Kyselina kávová je známým zástupcem fenolických kyselin. Je jednou z derivátů kyseliny skořicové a její systematický název je kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)-2-propenová (Obrázek 11C). Je obsažena v rostlinách, ovoci, zelenině, čaji a víně. Známa je pro své antioxidační, protizánětlivé, protinádorové, imunologické a neuroprotektivní účinky [76,77].

2.4. Raw potraviny

Raw potraviny nebo raw strava jsou poslední dobou jedním z moderních stravovacích trendů a je o ně stále větší a větší zájem. Základem raw stravy je tepelná úprava potravin do 42 °C, protože vyšší teplota degraduje přítomné látky, které jsou tělu prospěšné. Ničí se tím jak nutriční hodnoty, tak i enzymatická aktivita. Základem raw stravy jsou ořechy, semínka, zelenina, ovoce, luštěniny, obiloviny, rostlinná mléka či řasy [78].

Mnoho studií se zabývá vlivem raw stravy na zdraví člověka, prevenci před některými onemocněními či zlepšením stavu již nemocných. Pozitivních výsledků bylo pozorováno při léčbě chronických onemocnění, jako jsou rakovina, diabetes nebo srdečních chorob. Další pozitiva byla pozorována z hlediska nutričního, konkrétně se jednalo o antioxidanty, které nejsou vysokou teplotou degradovány. Studie prokázaly, že lidé konzumující ve stravě více syrových potravin, je u nich snížen výskyt některých typů rakovin. Byla pozorována zvýšená účinnost imunitního systému a snížený výskyt zánětu v organismu, pokles vysokého krevního tlaku při revmatoidní artritidě, snížení hladiny cholesterolu a zvýšení hladiny homocysteinu [79].

Naopak jiné studie se zaměřily na negativní vlivy tohoto způsobu stravování. Bylo zjištěno, že při dlouhodobé konzumaci studených potravin, může dojít k zažívacím potížím. Při nadměrném příjmu ovocných kyselin může dojít k poškození zubní skloviny [79].

2.5. Příprava vzorku před analýzou

Příprava vzorku před analýzou je nejdůležitějším krokem v celém procesu od odběru vzorku až po samotné výsledky. Fenolické sloučeniny existují v obilovinách jak ve volných, tak vázaných formách. Fenolové kyseliny se vyskytují jak ve volné formě, tak vázány na estery, glykosidy nebo do komplexů. Aby mohly být stanoveny, je nutné jejich vyvázání z těchto vazeb. Pokud jsou fenolové kyseliny volné nebo jsou vázány na estery či glykosid, je možné je extrahovat vodně-organickými rozpouštědly. Zcela jiná situace je u vázaných fenolových kyselin, protože jsou vázány do polymerů buněčné stěny a jsou nerozpustné. V tomto případě je nutná hydrolyza, která tyto vazby přeruší. Flavonoidy jsou přítomny v obilovinách rovněž ve volné nebo vázané formě. Vázané jsou většinou na glykosidy.

Volba podmínek hydrolyzy by měla být taková, aby bylo získáno nejvyšší množství volných fenolických látek. Fenolické látky mohou být uvolněny z vazeb hydrolyzou kyselou, alkalickou nebo enzymatickou. Další možností je kombinace výše uvedených hydrolyz, například alkalické a následně kyselé nebo alkalické a enzymatické. Fenolické látky jsou obsaženy v obilovinách v nízkých koncentracích, a proto po hydrolyze většinou následuje extrakce. Ta zajistí zakoncentrování fenolických látek v co nejvyšším množství a jejich následnou detekci po separaci [80,81].

Postupy přípravy vzorků pro analýzu fenolických kyselin se mohou značně lišit. Některé vzorky lze zpracovat velice jednoduše s několika málo mezikroky, ale některé postupy zpracování jsou složitější a vyžadují hydrolyzu a následnou extrakci stanovovaných látek. Vzhledem k pestrosti složení fenolických látek neexistuje univerzální postup přípravy vzorku a je proto nutné zvolit optimální postup individuálně pro každý typ vzorku. Nejběžněji popsání postupy přípravy vzorků fenolických kyselin zahrnují dva a více kroků [81].

2.5.1. Kyselá hydrolyza

Základem kyselé hydrolyzy je působení anorganické kyseliny na vzorek. Ve většině případů je použita kyselina chlorovodíková [82,83,84] nebo kyselina sírová [85]. Vzorek je většinou zahříván pod zpětným chladičem při teplotě varu anorganické kyseliny nebo může

probíhat v ledové lázni [82]. Čas kyselé hydrolýzy se obvykle pohybuje od 30 minut [84] do 1 hodiny [83], pH kyseliny je v rozmezí 1-2.

Kyselá hydrolýza není běžně a často používaná jako hydrolýza alkalická. Na rozdíl od alkalické hydrolýzy má kyselá hydrolýza širokou variabilitu podmínek. Ty nejvyužívanější postupy kyselé hydrolýzy u obilovin jsou popsány v následujících odstavcích [81].

Kyselá hydrolýza pšeničných vzorků se jeví jako častější metoda při stanovení fenolických látek nebo je využita kombinace alkalické a následné kyselé hydrolýzy. Jednou z možných variant kyselé hydrolýzy je využít u vzorku pšenice [83]. Vzorek je smíchán s acetonitrilem a 0,1 M HCl. Směs je zahřívána na vodní lázni po dobu 1 hodiny na 120 °C. Následně je směs centrifugována a je odebrána organická vrstva. Postup je zopakován ještě jednou, aby se zajistilo uvolnění, co největšího množství fenolických látek z vazeb. Tento postup je však lehce modifikován. Je přidáno více acetonitrilu a méně 0,1 M HCl opět po dobu 1 hodiny. Další možností je využití nejprve alkalické hydrolýzy a následně hydrolýzy kyselé [84]. Po alkalické hydrolýze byla ke vzorku přidána koncentrovaná HCl, vzorek byl inkubován ve vodní lázni při teplotě 85 °C po dobu 30 minut. Následně byl vzorek ochlazen, pH bylo upraveno na hodnotu 2.

Kyselá hydrolýza ovsa [85] je provedena přidáním směsi metanol-kyselina sírová (10:1). Směs je zahřívána ve vodní lázni při teplotě 85 °C po dobu 20 hodin. Poté je tato směs ochlazená na laboratorní teplotu a centrifugována.

Kyselá hydrolýza kukuřice [82] byla provedena podobně jako u předchozích obilnin. Ke vzorku byla přidána 6 M HCl, tato směs byla inkubována při teplotě 4 °C po dobu 1 hodiny. Podobně jako u pšenice je možná i smíšená hydrolýza, nejprve alkalická a po ní následuje kyselá [16, 86].

2.5.2. Alkalická hydrolýza

Alkalická hydrolýza je u obilovin mnohem častější než hydrolýza kyselá. Zejména u pohanky je to nejvyužívanější způsob hydrolýzy. Všechny alkalické hydrolýzy probíhají většinou za podobných podmínek. Zpravidla se na vzorek působí 2 [87,88,89], 4 [90], 6 [91] a 10 [92] M hydroxidem sodným (NaOH). Hydrolýza většinou probíhá za laboratorní teploty a doba hydrolýzy se pohybuje od 15 minut až do 1 dne. Nejběžněji je však čas hydrolýzy 1,5 hodiny [87,88], 4 hodiny [89,90] nebo 16 hodin [91,92]. V některých studiích byla popsána také alkalická hydrolýza za tmy nebo v inertní atmosféře naplněné dusíkem nebo argonem [81].

2.5.3. Enzymatická hydrolýza

Enzymatická hydrolýza není tak frekventovaná jako předchozí dvě hydrolýzy. Využívá se při ní enzymů, především pektinázy, celulózy a amylázy, které štěpí vazby mezi fenolickými látkami a glykosidy [81].

Enzymatická hydrolýza našla uplatnění například u stanovení fenolových kyselin žita. Podle [89] byly testovány čtyři komerční enzymatické přípravky. Přítomné enzymy vyvázaly fenolové kyseliny z buněčné stěny a následně mohly být podrobeny analýze. Ke vzorku žita byl přidán 1 ml komerční směsi enzymů a následně byla tato směs inkubována při 37 °C, pH 4,5 a doba inkubace byla 18 hodin [93].

Enzymatická hydrolýza kukuřice se lehce liší [94]. Fenolické látky jsou smíchány s hydroxidem vápenatým, aby bylo upraveno pH, a následně je přidána enzymatická směs (pektinázy, amylázy a celulózy). Tato směs je míchána při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Poté se zfiltruje [94].

Enzymatickou hydrolýzu lze využít i u stanovení fenolických látek ječmene [95] nebo rýže [96].

2.5.4. Ochrana fenolických kyselin během hydrolýz

Během výše popsaných hydrolýz, kyselá a alkalická, dochází ke ztrátám fenolových kyselin. Degradaci zapříčiňuje velmi nízké (kyselá hydrolýza) nebo velmi vysoké (alkalická hydrolýza) pH. Například při alkalické hydrolýze byla pozorována ztráta kyseliny kávové 67 % a u kyseliny sinapové 36,5 %. U kyselá hydrolýzy dochází ještě k větším ztrátám, než je tomu u alkalické hydrolýzy. Pro jsou do směsi před hydrolýzou přidávány silné antioxidanty, jako je kyselina askorbová nebo kyselina ethylendiamintetraoctová. Ty fenolové kyseliny ochrání před jejich degradací [97].

2.5.5. Extrakce

Extrakce je dalším důležitým krokem přípravy vzorku před samotnou analýzou. Fenolické látky vzorku jsou extrakcí izolovány od ostatních nežádoucích látek. Existuje mnoho metod extrakce pro fenolické látky, ale ne všechny jsou stejně účinné a vhodné pro dané vzorky [81].

Extrakce kapalina-kapalina patří k nejpoužívanějším extrakcím fenolických látek. Jejimi výhodami jsou vysoká účinnost, jednoduchý postup a univerzálnost. Používanými extrakčními rozpouštědly jsou alkoholy (metanol, etanol), aceton, diethylether a ethylacetát. Poslední dvě jmenovaná rozpouštědla jsou asi nejčastěji používána u stanovení fenolických látek obilovin a jsou běžně používána ve směsi. Pokud se jedná o velmi polární kyseliny, jako jsou benzoová a skořicová, využívá se extrakce čistými organickými rozpouštědly nebo směs alkohol/aceton-voda. Samotná extrakce se opakuje minimálně 2-3x, aby došlo k dokonalé extrakci všech látek. Následně jsou vzorky s rozpouštědly stočeny na centrifuze, jednotlivé organické vrstvy jsou postupně sbírány a na závěr se spojí [81,82,97].

U pevných vzorků se k izolaci flavonoidů používá Soxhletova extrakce. Rozpouštědlem je metanol nebo acetonitril a doba extrakce je 12 hodin [81,98].

Nadkritická fluidní extrakce je využívána také pro pevné vzorky (rostliny). Extrakčním činidlem je oxid uhličitý, který má částečně vlastnosti jako tekutina a částečně jako plyn. Metoda je vhodná pro stanovení nepolárních nebo málo polárních látek. Pro extrakci polárních fenolických látek je nutné přidat modifikátor (metanol, acetonitril) k oxidu uhličitému [81,98].

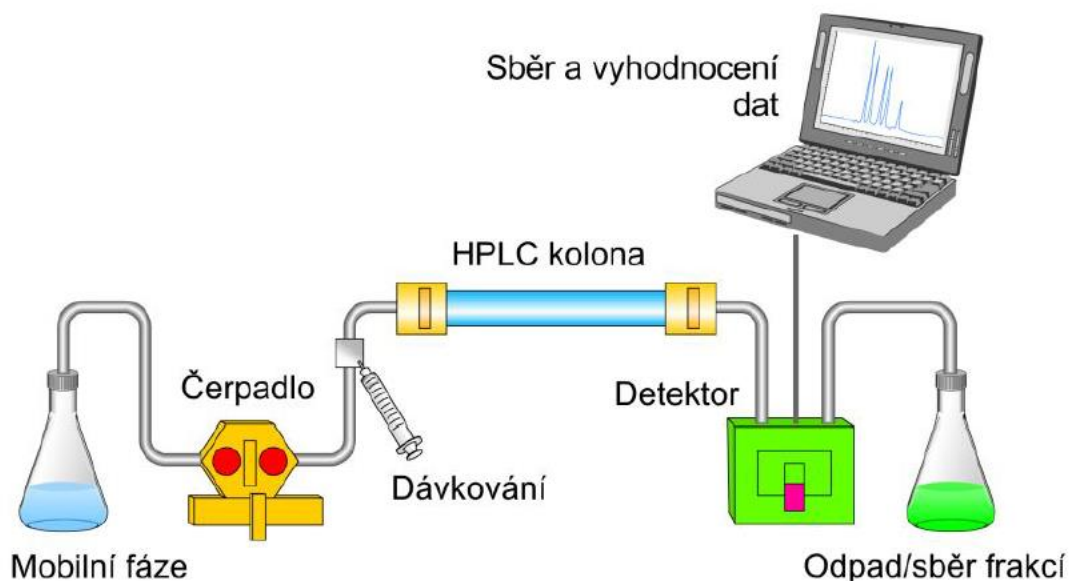
Ultrazvuková extrakce je poslední z tohoto výčtu extrakcí pro stanovení fenolických látek. Jsou při ní využívány zvukové vlny, které působí na matici pevného vzorku, dochází k rozpadu pevného vzorku a v případě rostlinného materiálu dochází k narušení buněčných stěn. Rozpouštědlo snadněji proniká do vzorku a samozřejmě je snadnější i uvolňování extrahovaných látek. Vzorek je tedy ponořen do ultrazvukové lázně s rozpouštědlem, po dobu 15-30 minut je ponořen v lázni, poté je extrakt od zbytku oddělen filtrací nebo centrifugací [81,98].

2.6. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou ze separačních metod. Základním principem této metody je distribuce látek mezi dvě fáze, které jsou nemísitelné. Jednou fází je fáze kapalná neboli mobilní fáze (pohyblivá), která unáší vzorek od nástřiku celým systémem, a druhou je stacionární fáze (nepohyblivá), která má různý charakter materiálu a je umístěna v koloně. Dochází zde k neustálému obnovování rovnováhy mezi fázemi a dle afinity látky k jedné či druhé fázi k silnějšímu či slabšímu zadržení analyzované látky ve stacionární fázi [99].

HPLC se vyznačuje menší zrnitostí kolony, která však zapříčiní vyšší odpor proti protékající mobilní fázi, a proto je potřeba použít mnohem vyšších pracovních tlaků. HPLC je dnes nejvíce využívanou metodou při stanovení fenolických látek v pohance [100,101].

HPLC přístroj (Obrázek 12) se skládá z čerpadla pro dodávání rozpouštědla, automatického dávkovače vzorků, kolony, která je umístěna v termostatu, detektoru, který vizualizuje detekované látky ve vzorku, a počítače, který celý přístroj ovládá a ukládá veškerá data [100].



Obrázek 12 Schéma HPLC přístroje [převzato a upraveno z 102]

Čerpadla jsou důležité pro přivádění mobilní fáze do celého systému. Přívod mobilní fáze je zajištěn tak, aby byl konstantní. Změnám tlaku zabráňuje zařízení na tlumení pulzů a veškeré spoje jsou odolné vůči vysokému tlaku, který je způsoben čerpacím systémem. Složení mobilní fáze může být po celou dobu analýzy konstantní (izokratická eluce) nebo se její složení může měnit (gradientová eluce). Při stanovení fenolických látek v pohance je využívána gradientová eluce různých směsí rozpouštědel. Při analýze složitější směsí, jako jsou právě rostlinné extrakty, je využití isokratické eluce nevhodné. Látky, které jsou obsaženy v těchto složitějších směsích, mají různou retenci a v tomto případě by čas analýzy byl příliš dlouhý. Z tohoto důvodu je využívána právě gradientová eluce, při které se zvyšuje eluční síla rozpouštědla a čas analýzy je přijatelný [99].

Dávkovací zařízení je dnes v mnoha případech již automatické, protože je mnohem přesnější než dávkování ruční. Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze před začátkem

kolony. Tato zařízení dovolují dávkovat i při vysokém tlaku. Jsou schopny dávkovat buď konstantní či proměnný objem vzorku. Dávkovací zařízení pracují na základě několikacestného (nejčastěji šesticestného) ventilu, který je přepínán mezi dvěma polohami (plnění, dávkování vzorku) [99,103].

Kolony jsou trubky či kapiláry, které jsou naplněny stacionární fází a jsou vyrobeny z nerezového materiálu, plastu či skla. Jejich délka se pohybuje od 3 do 20 cm s průměrem 1-5 mm. Kolony pro HPLC jsou naplněny porézními kulovitými mikročásticemi o velikosti 1,7-5 μm [101,103].

Detektor je umístěn za kolonou, ve které dochází k separaci látek. Separované látky jsou následně dle měřeného analytického signálu detektorem změřeny. Detektor zaznamenává rozdíly analytického signálu mezi čistou mobilní fází a mobilní fází, která obsahuje eluované látky. Nejvyužívanějšími detektory jsou refraktometrický, spektrofotometrický, fluorimetrický, ampérometrický, vodivostní nebo hmotnostní spektrometr. Následující odstavce budou věnovány popisu spektrometrickému detektoru a spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem, které jsou používány v experimentální části [101,103].

Spektrometrický (UV/VIS) detektor je selektivním a také vysoce citlivým detektorem. Pracuje na základě absorpce záření v rozmezí vlnových délek 190-800 nm. Kvantita je vyhodnocována na základě Lambert-Beerova zákona (2):

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (2)$$

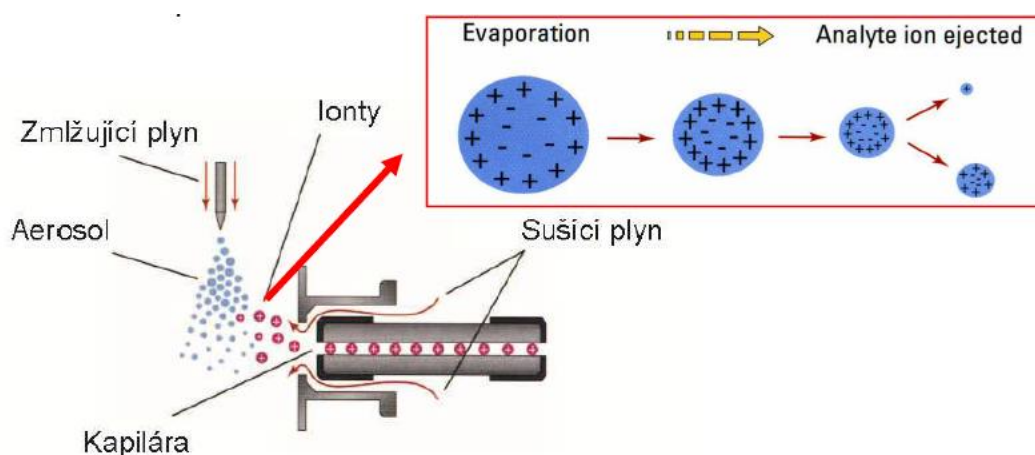
kde A je absorbance, ϵ je molární absorpční koeficient (l/mol/cm), c je koncentrace (mol/l), l je tloušťka absorbující vrstvy (cm).

Tento typ detektoru je dále dělen podle konstrukce na **detektory s fixní vlnovou délkou**, kde je zdrojem nízkotlaká rtuťová výbojka. **Detektory s měnitelnou vlnovou délkou**, kdy je předem zvolena jedna z vlnových délek. **Detektory s programovatelnou vlnovou délkou**, u kterých se zvolí určité rozmezí vlnových délek a vlnová délka se během analýzy mění. **Detektory diodového pole (DAD)**, které snímají celé spektrum v reálném čase. Záření ze zdroje prochází optickou soustavou, je rozkládáno na holografické mřížce a jednotlivé paprsky o určité vlnové délce dopadají na sérii fotodiod. Každá fotodioda je spojena s kondenzátorem, který je nabit na určitou hodnotu. Po dopadu záření dochází k vybíjení kondenzátorů, vznikající elektrický proud je přímo úměrný intenzitě dopadajícího záření. Kondenzátory jsou následně znovu dobity a měří se proud, který je k tomu zapotřebí.

Tyto údaje jsou zaznamenávány do počítače a proces nabíjení a vybíjení se opakuje velmi rychle [103].

Možnost spojení **HPLC s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS)** nám poskytuje nejen oddělení jednotlivých látek analyzovaného vzorku, ale také jejich identifikaci či částečné odvození jejich struktury. Samotná hmotnostní spektrometrie je metodou, která je založena na převedení atomů na ionty (iontový zdroj), následuje jejich rozlišení dle poměru hmotnosti a náboje, m/z , (hmotnostní analyzátor) a poslední krokem je zaznamenání jejich relativních intenzit (detektor a operační zařízení) [99,104].

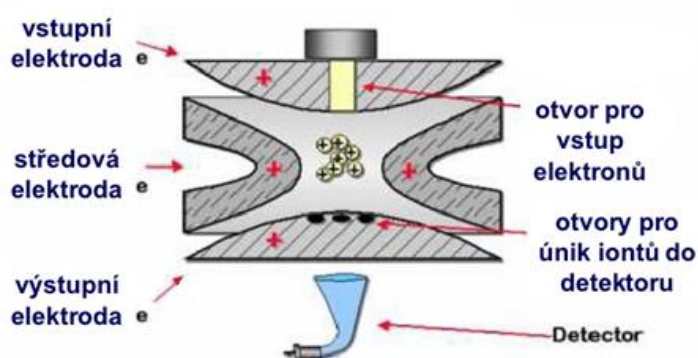
Spojení HPLC/MS bylo velmi náročné. Prvním problémem byl rozdíl pracovních tlaků, jelikož analýza vzorků HPLC probíhá za atmosférického tlaku a hmotnostní spektrometr pracuje za vakua. Druhým problémem bylo odstranění nadbytku mobilní fáze. Tyto problémy byly vyřešeny několika způsoby. Jednou z technik, které měly vyřešit tyto problémy, byla **ionizace elektrosprejem (ESI)** (Obrázek 13). Tato technika ionizace je poměrně často využívána při spojení HPLC/MS. Při ESI eluát z chromatografické kolony prochází kapilárou, na které je vloženo vysoké napětí (3-5 kV). Na výstupu z kapiláry vznikají kapičky, které nesou náboj dle vloženého napětí. Současně zde dochází k odpařování rozpouštědla, kapičky se stále zmenšují a zvyšuje se hustota povrchového napětí. Jakmile dojde k překročení kritické hodnoty povrchového náboje na kapičce, pak dojde ke coulombické explozi a vznikají menší kapičky či ideálně ionty [104,105].



Obrázek 13 Schéma ionizace elektrosprejem [převzato z 106]

Vzniklé ionty jsou podle poměru hmotnosti a náboje děleny v hmotnostním analyzátoru. V analyzátoru dochází k dělení iontů za vysokého vakua. Existuje hned několik druhů analyzátorů pro dělení iontů, které pracují na různých fyzikálních principech. Mezi

nejvýznamnější patří magnetický sektorový analyzátor, kvadrupólový analyzátor, lineární iontová past, průletový analyzátor, Orbitrap nebo iontová cyklotronová rezonance. Protože hmotnostním analyzátozem v experimentální části je iontová past, bude jí věnováno několik následujících řádků. **Iontová past** (Obrázek 14) je analyzátozem s nízkou rozlišovací schopností a správností, ale finančně se řadí to střední relace. Tento analyzátor je složen z prstencové elektrody a dvou koncových elektrod, na které je vloženo napětí. Krátkými napěťovými pulzy ionty pronikají do pasti vstupním otvorem. Podle poměru napětí vloženo na kruhovou a dvě koncové elektrody, jsou ionty zadržovány uvnitř pasti. Jakmile dojde ke změně napětí, jsou ionty podle poměru m/z vypuzovány na detektor [106].



Obrázek 14 Iontová past [převzato z 107]

2.6.1. Možnosti stanovení fenolických látek kapalinovou chromatografií v pohance

HPLC má dominantní postavení v analýze obilovin, zvláště pohanky. Umožňuje stanovení nízkých koncentrací fenolických látek a také jejich degradačních produktů. Jednou z výhod HPLC je široký výběr komerčních kolon pro separaci fenolických látek [81].

Pro separaci se výhradně používají kolony s obrácenými fázemi (RP), které jsou pro separaci fenolických látek nejvhodnější. RP kolony jsou naplněné chemicky modifikovaným silikagelem, který má na sobě navázané molekuly oktadecylsilanu (C18) [39,82,87,88,108,110] nebo dalších nepolárních ligandů. Velikost částic se pohybuje mezi 3-10 μm [81].

Na separaci fenolických látek v obilovinách je možné použít laboratorní teplotu kolem cca 25 °C [82,108,109] nebo zvýšenou teplotu okolo 40 °C [87].

Protože je chemické složení a vlastnosti jednotlivých fenolických látek velmi rozdílné strukturou a různou retencí, využívá se gradientové eluce. Ta umožňuje programově měnit složení mobilní fáze během analýzy. Nejvíce používanými organickými rozpouštědly v mobilní fázi pro analýzu fenolických látek v pohance je metanol [39,110] nebo acetonitril [82,87,88] ve směsi s vodou. Výhodou metanolu je, že není toxický na rozdíl od acetonitrilu. Na druhou stranu výhodou acetonitrilu jsou ostřejší píky díky zvýšení účinnosti separace [81].

Často jsou do mobilní fáze přidávány modifikátory, které zajistí zlepšení rozlišení a lepší reprodukovatelnost analýz. Kdyby nebyly přidány, mohlo by dojít k disociaci analytů. Za tímto účelem se pH mobilní fáze doporučuje udržovat mezi hodnotami 2-4. Proto jsou do vodné fáze přidávána malá množství různých kyselin či solí, které tuto hodnotu pH zajistí. Jsou to například kyselina octová [82,88], mravenčí [39,110], fosforečná [111] nebo octan amonný [81].

K detekci fenolických látek v pohance se nejčastěji využívá UV/VIS detekce. Ve většině publikací je používán detektor diodového pole, který je detailně popsán v předchozí kapitole. Ve většině případů se pracuje při vlnových délkách 280 [39,88], 330 [39,110,111] a 350 nm [39,110]. Při vlnové délce 280 nm dobře absorbují fenolové kyseliny, při vyšších vlnových délkách absorbují lépe flavonoidy. Proto je nutné zvolit optimální vlnovou délku, při které budou absorbovat jak fenolické kyseliny, tak i flavonoidy, nebo využít detektor diodového pole a snímat více vlnových délek najednou.

K UV/VIS detekci bývá často připojen také hmotnostní detektor, který umožňuje a potvrzuje identifikaci fenolických látek. Z iontových zdrojů je nejčastěji využívána ionizace ionizace elektrosprejem [82,108]. Ve většině případů je měření prováděno v režimu negativních iontů [82,108,109,87]. Z hmotnostních analyzátorů jsou využívány iontové pasti [80] nebo analyzátory doby letu (TOF) [82,87]. Analyzátor doby letu měří dobu letu iontu, který se dostává do letové trubice až do doby, kdy dorazí nakonec trubice k detektoru. Ionty s různým poměrem m/z se pohybují trubicí různou rychlostí. Do letové trubice jsou vpraveny se stejnou kinetickou energií, ale ionty s menším hodnotou m/z se pohybují trubicí rychleji a tudíž budou i dříve u detektoru [81,104].

Výhodou obou analyzátorů je střední pořizovací cena. Analyzátor doby letu je však ve všech vlastnostech popisujících analyzátory lepší oproti iontové pasti. Má vyšší rozlišovací schopnost, měří s vyšší správností a i rychlost snímání je vyšší [104].

3. Experimentální část

3.1. Přístroje a laboratorní pomůcky

- běžné laboratorní nádobí
- Laboratorní váhy KERN® M CE (Kern & Sohn, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (Bandelin Sonorex RK 52, Německo)
- Stolní centrifuga (UNIVERSAL 320 HETTICH, Německo)
- pH meter (Schott CG 842 pH- Meter, Německo)
- gelová pH elektroda HI1270 (Hanna® Instruments, USA)
- Rotační třepačka (VWR Collection, USA)
- Minitřepačka VORTEX 1 (Maneko spol. s r.o., Česká republika)
- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series LC/MSD trap SL (Agilent Technologies, USA) vybavený spektrofotometrickým detektorem, s hmotnostním detektorem, odplyňovačem mobilní fáze, kvartérní pumpou, termostatovaným automatickým dávkovačem, termostatem kolony
 - použitá kolona: Gemini® 5 μm C18 110 Å, LC Column 150 x 3,0 mm (Phenomenex, USA)

3.2. Použité chemikálie

- Etanol 96 %, p.a. (Lach-ner s.r.o., ČR)
- Etylacetát (Lach – Ner, s.r.o., Neratovice)
- Deonizovaná voda (MILI-Q, Merck Milipore, Německo)
- Diethylether (Penta s.r.o., ČR)
- Hydroxid sodný, p.a. (Penta s.r.o., ČR)
- Kyselina askorbová (Lach – Ner, s.r.o., Neratovice)
- Kyselina chlorovodíková 35%, p.a. (Penta s.r.o., ČR)
- Kyselina mravenčí $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich, Co., Německo)
- Metanol, p.a. (Penta s.r.o., ČR)
- Octan amonný (Penta s.r.o., ČR)

Ke kvantifikaci fenolických látek ve vzorcích sušenek pohanky byly použity standardy uvedené v Tabulce 5.

Tabulka 5 Standardy fenolických látek a flavonů

Látka č.	Standardy	Sumární vzorec	Molární hmotnost [g/mol]	[M-H] ⁻
1	Kyselina galová ¹	C ₇ H ₆ O ₅	170,120	169,120
2	Kyselina protokatechová ¹	C ₇ H ₆ O ₄	154,121	153,121
3	Katechin ²	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,271	289,271
4	Kyselina chlorogenová ²	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354,311	353,311
5	Kyselina vanilová ¹	C ₈ H ₈ O ₄	168,148	167,148
6	Kyselina kávová ³	C ₉ H ₈ O ₄	180,159	179,159
7	Kyselina syringová ²	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,174	197,174
8	Epikatechin ²	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,271	289,271
9	Kyselina p-kumarová ¹	C ₉ H ₈ O ₃	164,160	163,160
10	Kyselina ferulová ²	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,186	193,186
11	Kyselina sinapová ¹	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,212	223,212
12	Rutin ³	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610,521	609,521
13	Myricetin ³	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318,237	317,237
14	Kvercetin ²	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,238	301,238

zakoupeno: ¹ ... Fluka™, Švýcarsko

² ... Sigma-Aldrich, Co., Německo

³ ... TCI Chemicals, Japonsko

3.3. Příprava vzorku

Postup přípravy vzorků pohankových sušenek, který je popsán v této kapitole, zahrnuje rozmrznutí vzorku, odtučnění, vážení, hydrolýzu, extrakci a sušení. Vzorky byly převzaty z diplomové práce [112].

Sušenky byly vyrobeny z loupané pohanky, lískových ořechů a sušených švestek, které byly zakoupeny v BIO kvalitě u výrobce Lifefood Czech Republic s.r.o. (Praha). Sušenky byly upečeny podle běžných receptů uváděných na internetu. Použité vzorky pohankových sušenek byly již připravené podle následujícího postupu: bylo naváženo 120 g pohanky (namáčeno ve 400 ml vody), 15 g sušených švestek (namáčeno v 60 ml vody) a 15 g lískových ořechů (namáčeno v 60 ml vody). Sušenková hmota se zalila vodou a byla takto ponechána 20 hodin. Část vzorků byla 20 hodin ponechána v lednici a další část při laboratorní teplotě. Takto byly připraveny dvě sady vzorků. Voda byla slita po 20 hodinách. Suroviny byly rozmixovány, těsto bylo nalito do formy na pečení a byly připraveny sušenky, které byly sušeny při různých teplotách (40, 50, 60 a 70 °C) 24 hodin. Upečené sušenky byly zhomogenizovány a v plastových nádobách zamraženy na teplotu -80 °C. Stejně tak byla zamražena i těsta, ze kterých byly vyrobeny.

Celkem bylo připraveno 25 vzorků pro následnou analýzu RP-HPLC-MS. Byly zpracovány vzorky připravované jak za laboratorní, tak za chladničkové teploty při teplotách sušení 40, 50, 60 a 70 °C. Pro jednotlivé přípravy byly vzaty 2 vzorky od každého typu. Dále byla zpracována těsta, ze kterých byly připraveny sušenky o teplotě sušení 40, 50, 60 a 70 °C, a vzorek čisté pohanky. Navíc při každém zpracování byl zpracován vzorek sušenek připravovaný při laboratorní teplotě a sušený při 40 °C jako kontrola pro správný průběh a reprodukovatelnost hydrolýzy. Přehled zpracovaných vzorků je v tabulce č. 6.

Čistá pohanka byla rozemleta, zhomogenizována, odtučněna v hexanu, vysušena a zamražena až do doby analýzy.

Tabulka 6: Přehled měřených vzorků

Vzorek	Laboratorní teplota (Lab. t.)	Chladničková teplota (Chlad. t.)
Sušenky 40°C	2x	2x
Sušenky 50°C	2x	2x
Sušenky 60°C	2x	2x
Sušenky 70°C	2x	2x
Vzorek čisté pohanky	1x	
Těsto	3x	
Kontrolní vzorek	5x	

3.3.1. Odtučnění vzorku

Zamrzlé vzorky byly rozmrazeny při laboratorní teplotě. Následovalo odstranění tuku pomocí hexanu. K 10 g vzorku bylo napipetováno 5 ml hexanu, směs byla promíchána, hexan byl následně odpipetován a vzorek byl vysušen. Z odtučněných vzorků bylo naváženo 0,5 g vzorku na analytických vahách s přesností 0,1 mg do centrifugační zkumavky o objemu 50 ml a vzorek byl podroben hydrolyze.

3.3.2. Alkalická hydrolyza

Alkalická hydrolyza byla popsána podrobněji v teoretické části. Postup alkalické hydrolyzy byl převzat z práce [113]. K naváženému vzorku bylo přidáno 10 ml 4 M NaOH a 4 ml kyseliny askorbové o koncentraci 25 mg/ml. Kyselina askorbová je přidávána na ochranu fenolových kyselin před vysokým pH. Takto připravený vzorek byl vložen do rotační třepačky (Obrázek 15). Čas hydrolyzy byl 3 hodiny. Po 3 hodinách byl vzorek zneutralizován 35 % kyselinou chlorovodíkovou na pH okolo 2.



Obrázek 15 Rotační třepačka s centrifugačními zkumavkami

3.3.3. Extrakce

Ke každému ze vzorků bylo napipetováno 10 ml směsi diethylether a ethylacetát v poměru 1:1 (v/v). Vzorky byly protřepány a vloženy do centrifugy. Směs byla centrifugována při rychlosti 5000 otáček za minutu po dobu 5 minut. Po centrifugaci byla odebrána organická vrstva do čisté centrifugační zkumavky a postup extrakce byl zopakován pro každý vzorek ještě 2x, celkem 3x. Extrakty byly vysušeny pod proudem dusíku do sucha.

Vysušené extrakty byly skladovány v ledničce až do doby analýzy. Před analýzou byly k vysušeným vzorkům odpipetovány 2 ml směsi metanolu a vody 1:1 (v/v). Vzorek byl dán na 5 minut do ultrazvukové lázně a poté promíchán na vortexu. Takto připravené vzorky byly zfiltrány přes stříkačkové filtry s porozitou 0,45 μm . Zfiltrované vzorky byly přelity do vialek a analyzovány.

3.4. Analýza vzorků

3.4.1. Příprava standardů a kalibračních řad

Celkem bylo připraveno 14 zásobních roztoků fenolických látek (9 fenolových kyselina a 5 flavonoidů). Zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci 50 mg/ml. Bylo naváženo 50 mg příslušného standardu do 50 ml odměrné baňky a standardy byly rozpuštěny v příslušném rozpouštědle. Fenolové kyseliny byly rozpuštěny ve směsi metanol-voda v poměru 1:1 (v/v) a flavonoidy v čistém metanolu. Standardy byly rozpuštěny za pomoci ultrazvukové lázně, promíchány na vortexu a následně přefiltrovány přes stříkačkové filtry s porozitou 0,45 μm .

Ze zásobních roztoků byly připraveny jednotlivé kalibrační řady, které byly ředěny směsí metanol-voda 1:1 (v/v), v rozsahu 0,031 µg/ml-100 µg/ml uvedeného v Tabulce 7.

Tabulka 7: Kalibrační rozsahy standardů

Látka č.	Standard	Kalibrační rozsah [µg/ml]
1	Kyselina galová	0,25-100,4
2	Kyselina protocatechová	0,032-100,8
3	Katechin	0,252-25,2
4	Kyselina chlorogenová	0,251-100,2
5	Kyselina vanilová	0,250-100
6	Kyselina kávová	0,031-100,2
7	Kyselina syringová	0,252-100,4
8	Epikatechin	0,251-25,1
9	Kyselina p-kumarová	0,251-100,4
10	Kyselina ferulová	0,251-100,4
11	Kyselina sinapová	0,25-100
12	Rutin	0,25-24,95
13	Myricetin	0,251-100,4
14	Kvercetin	0,251-10,04

3.4.2. Podmínky analýzy

Chromatografická separace jednotlivých vzorků probíhala na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series, který je vybavený spektrofotometrickým detektorem a hmotnostním spektrometrem. Analýza probíhala v režimu s převrácenými fázemi, nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Jednotlivé látky byly separovány na oktadecylsilikagelové koloně Gemini 5µ C18 110A o délce 150 mm s průměrem 3 mm a velikostí částic 5 µm. Mobilní fáze obsahovala vodný roztok 5 mM octanu amonného okyseleného kyselinou mravenčí o pH 3,1 (MF-A) a metanol (MF-B). S analytickou přesností bylo naváženo 0,3854 g octanu amonného, který byl rozpuštěn v 1 l deionizované vody. Následně bylo napipetováno 580 µl 95% kyseliny mravenčí pro úpravu pH na hodnotu 3,1. Připravená mobilní směs byla přefitrována přes filtr s velikostí pórů 0,45 µm.

Analýza probíhala při teplotě 40 °C, průtoku mobilní fáze 0,5 ml/min a použitý gradient je uveden v Tabulce 8. Každý vzorek byl dávkován v objemu 15 µl. Vzorky byly detekovány při vlnové délce 280 nm.

Tabulka 8: Gradient

Čas [min]	MF-B [%]	MF-A [%]
0	5	95
30	60	40
35	80	20

K hmotnostní detekci byla jako iontový zdroj použita elektrochemická ionizace (ESI) a vzorky byly měřeny v režimu negativu. Podmínky hmotnostního detektoru jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9 Podmínky hmotnostního detektoru

Podmínky
Nebulizer: 40 psi
Dry gas: 9 l/min
Dry temperature: 350 °C
Target mass: 250 m/z
Compound stability: 100 %
Trap drive level: 100 %
MaxAcute time: 50 ms
Scan: 100-800 m/z
Averages: 10

3.5. Vyhodnocení

Veškerá data byla vyhodnocena pomocí programu Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Vyhodnocení separací bylo provedeno s využitím programů Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Inc., USA) a MSD Trap Control (Agilent Technologies, Inc., USA). Pro vyhodnocení pravděpodobnosti úseků byl použit program QC Expert (TriloByte Statistical Software, s.r.o., Česká republika). Celá diplomová práce byla sepsána v Microsoft Office Word 2010 (Microsoft Corporation, USA).

4. Výsledky a diskuze

Raw strava je v dnešní době hodně populárním stravovacím trendem. Hlavním znakem tohoto stravování je příprava pokrmů z běžné zeleniny, ovoce a obilovin, které jsou tepelně upravovány do cca 42 °C. Vyšší teplota podle studií degraduje prospěšné látky (antioxidanty, vitamíny), které tělo potřebuje pro správný chod organismu. Proto jsme se v této diplomové práci otázkou teploty zabývali více. Konkrétně byl sledován vliv teploty sušení na obsah fenolických látek v raw pohankových sušenkách. Zaměřili jsme se na obsah nejvíce zastoupených fenolických látek v pohance, ze které byly vyrobeny sušenky při různých teplotách sušení, a to na fenolické kyseliny (galovou, protokatechovou, chlorogenovou, vanilovou, kávovou, syringovou, p-kumarovou, ferulovou, sinapovou) a flavonoidy (katechin, epikatechin, rutin, myricetin, kvercetin).

4.1. Optimalizace podmínek

Před analýzou vzorků bylo nutné stanovit optimální podmínky separace (složení mobilní fáze, objem dávkování vzorků, nastavení hmotnostního spektrometru, nastavení vlnové délky) RP-HPLC-UV-MS, tak aby bylo možné rozseparovat všechny sledované látky. Optimalizovat bylo zapotřebí i přípravu vzorku před samotnou separací, která je nejdůležitějším krokem celého procesu.

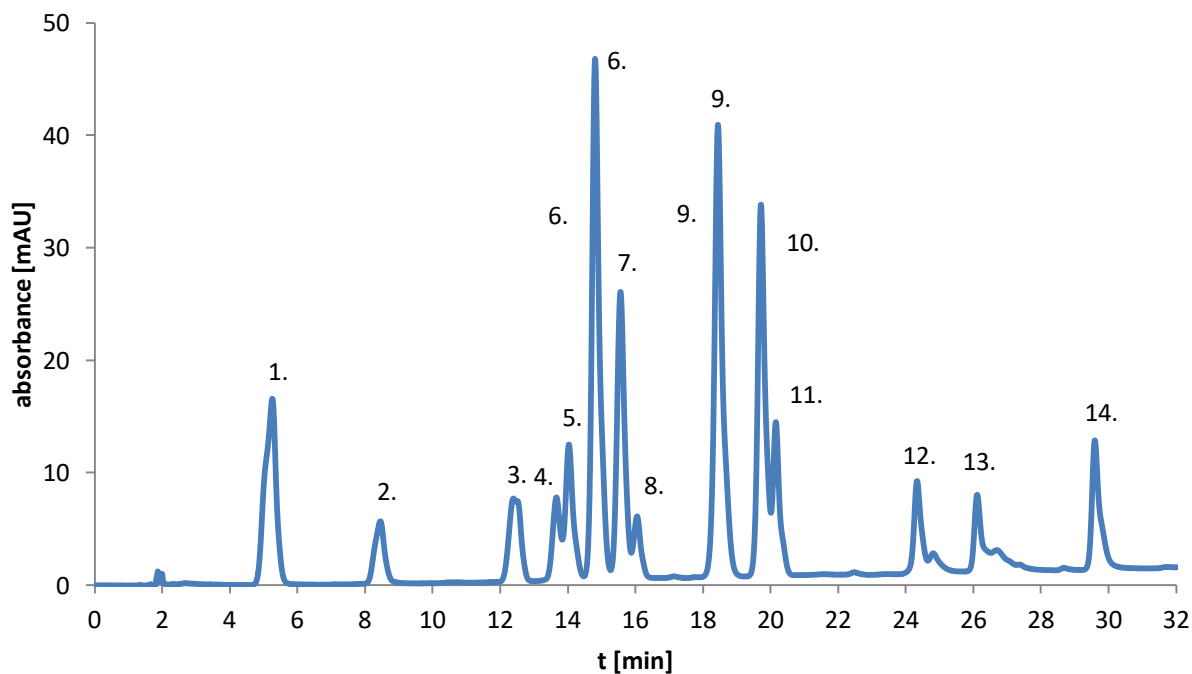
4.1.1. Optimalizace podmínek separace a UV/VIS detekce

Pro separaci byl použit HPLC systém s UV/VIS detekcí spojený s MS detekcí. UV/VIS detekce umožňovala pouze nastavení jedné vlnové délky, tudíž identifikace pomocí UV/VIS spekter nebyla možná, a proto bylo využito MS detekce.

Volba vlnové délky při detekování látek byla zvolena 280 nm. Při vlnové délce 350 nm by sice flavonoidy (rutin, kvercetin, epikatechin, katechin a myricetin) absorbovaly více, ale většina fenolových kyselin při této vlnové délce již neabsorbují nebo jen velice málo. Pro separaci byla proto zvolena vlnová délka 280 nm, při které absorbují jak fenolické kyseliny, tak i flavonoidy separovaných vzorků.

Bylo testováno několik elučních gradientů, aby bylo zajištěno co nejlepší separace testovaných látek. Nejvhodnější eluční gradient byl vybrán 0 minuta – 5 % metanolu + 95 % roztok 5 mM octanu amonného s kyselinou mravenčí, 30 minuta – 60 % metanol + 40 % roztok 5 mM octanu amonného s kyselinou mravenčí, 35 minuta – 80 % metanolu + 20 %

roztok 5 mM octanu amonného s kyselinou mravenčí. Za těchto podmínek byly rozděleny všechny testované látky a čas analýzy byl přijatelný (Obrázek 16). V Tabulce 10 jsou zobrazeny identifikované fenolové kyseliny a flavonoidy s jejich retenčními časy.

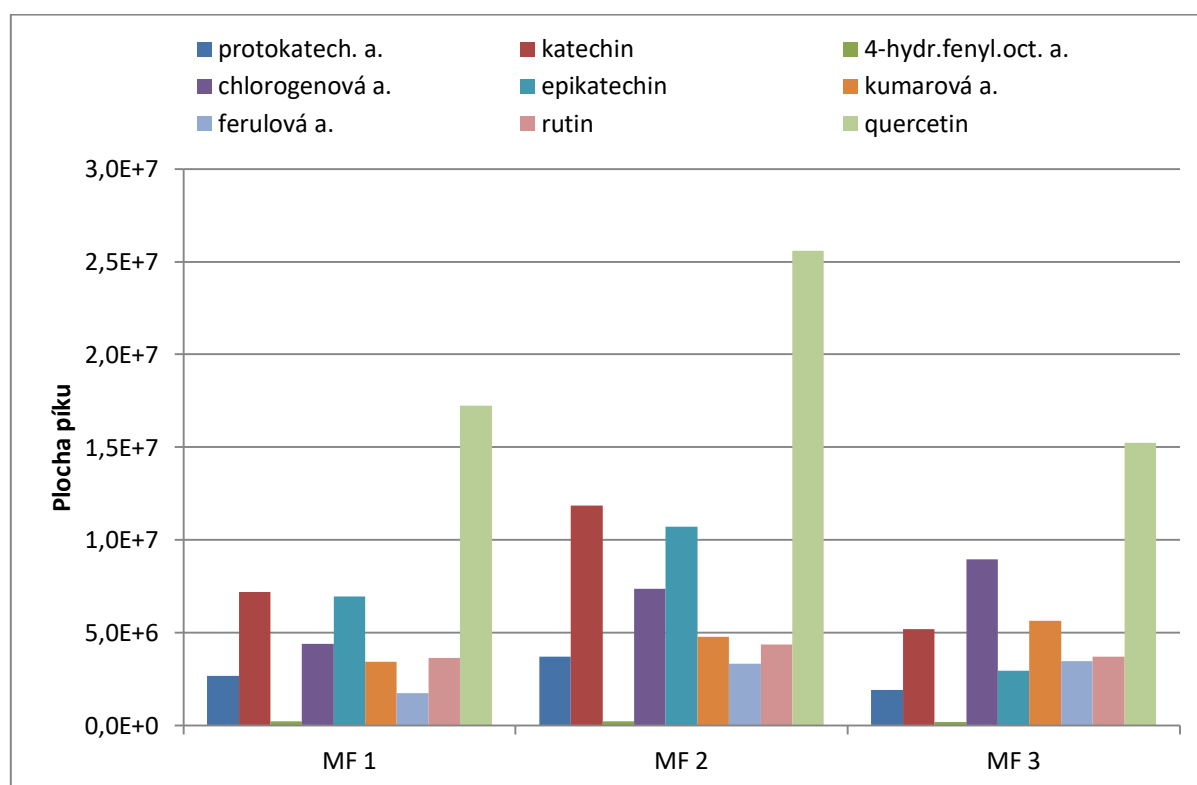


Obrázek 16 Chromatogram standardních látek. Čísla látek jsou uvedena v Tabulce 5.

Tabulka 10 retenční časy sledovaných fenolických kyselin a flavonů

Látka č.	Látka	Retenční čas [min]
1	Kyselina galová	5,1
2	Kyselina protokatechová	8,3
3	Katechin	12,6
4	Kyselina chlorogenová	13,7
5	Kyselina vanilová	14,0
6	Kyselina kávová	14,7
7	Kyselina syringová	15,6
8	Epikatechin	16,1
9	Kyselina p-kumarová	18,3
10	Kyselina ferulová	19,8
11	Kyselina sinapová	20,1
12	Rutin	24,4
13	Myricetin	26,1
14	Kvercetin	29,9

Jako další byl testován vliv koncentrace pufru v mobilní fázi na ionizaci MS detekce. Aby mohlo dojít ke spolehlivé identifikaci látek, je nutné vybrat vhodné složení mobilní fáze. Při výběru mobilní fáze byly vyzkoušeny 3 typy. První mobilní fáze (MF 1) obsahovala vodný roztok 10 mM octanu amonného okyseleného kyselinou mravenčí na pH 3,1 a metanol. Druhá mobilní fáze (MF 2) měla stejné složení jako předešlá, ale přítomný modifikátor byl pouze 5 mM octan amonný. Třetí mobilní fáze (MF 3) obsahovala pouze deionizovanou okyselenou vodu kyselinou mravenčí na pH 3,1 a metanol. Tyto 3 mobilní fáze byly použity na separaci směsi látek o koncentracích 50 µg/ml za optimálních podmínek a byla sledována odezva (plocha píku) detektoru na typu mobilní fáze. Z Obrázku 17 je patrné, že největší odezvy standardů byly pozorovány u MF 2. Pouze kyselina chlorogenová a p-kumarová měly o něco větší odezvy v MF 3, která neobsahovala octan amonný. Proto jako nejvhodnější pro separaci vzorků pohankových raw sušenek byla zvolena mobilní fáze s vodným roztokem 5 mM octanu amonného okyseleného kyselinou mravenčí na pH 3,1 a metanolem.



Obrázek 17 Závislost odezvy UV detektoru na typu použité mobilní fáze: **MF 1** - vodný roztok 10 mM octanu amonného okyseleného kyselinou mravenčí na pH 3,1 a methanol; **MF 2** - vodný roztok 5 mM octanu amonného okyseleného kyselinou mravenčí na pH 3,1 a metanol; **MF 3** - deionizovaná okyselená voda kyselinou mravenčí na pH 3,1 a metanol

Objem dávkovaného vzorku byl postupně zkoušen od 1, 5, 7, 10, do 15 μl z důvodu zvýšení detekce a změny tvaru píků. Protože se tyto parametry při separacích neměnily, byl zvolen objem 15 μl dávkovaného vzorku. Kvalita tvaru píků byla stejně dobrá jako při dávkování 5 μl .

4.1.2. Optimalizace podmínek separace a MS detekce

Jak již bylo zmíněno výše, protože UV/VIS detektor umožňoval pouze nastavení jedné vlnové délky, byla proto identifikace látek ověřena ještě pomocí MS detektoru.

MS detekcí byly látky identifikovány podle molekulových iontů. Standardní látky byly měřeny v režimu negativu a pozitivu nastaveném v hmotnostním detektoru. Vhodnější bylo měření v negativu, protože byl pozorován nižší šum, nulová linie byla pravidelnější a separace látek (jednotlivých píků) se zlepšila. V negativním režimu iontu jsou hledány dané látky molekulové hmotnosti o 1 menší. Jednotlivé hodnoty $[M-H]^-$ se nachází v Tabulce 5. V příloze práce jsou k na ukázkou extrahované chromatogramy molekulových iontů jednotlivých látek i s TIC chromatogramem (P 1-2).

Za pomoci UV/VIS detektoru, tak hmotnostního detektoru bylo identifikováno 14 fenolických látek, které byly následně hledány v analyzovaných vzorcích. Identifikace fenolických látek byla provedena v extraktech raw pohankových sušenek. Bylo identifikováno 9 fenolických kyselin a 5 flavonoidů. Jednotlivé látky byly hledány podle molekulových hmotností za pomoci iontové pasti. Získané hodnoty byly porovnávány se standardy, s literaturou, UV/VIS detekcí a MS detekcí kapalinového chromatografu. V Tabulce 10 jsou zobrazeny identifikované fenolové kyseliny a flavonoidy s jejich retenčními časy.

4.1.3. Kalibrační závislosti

Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno metodou kalibračních přímek. Kalibrační řady standardů byly proměřeny a následně byly sestaveny regresní grafy vytvořené na základě závislosti odezvy UV/VIS detektoru na koncentraci jednotlivých roztoků. Ze získaných regresních parametrů byly vypočteny koncentrace fenolických látek ve vzorcích.

Byly připraveny kalibrační roztoky o různých koncentracích (Tabulka 7). Každá z kalibračních řad byla proměřena dvakrát. Kalibrační grafy standardů jsou uvedeny v příloze této práce (P 2-15).

Vyhodnocení kalibrací bylo provedeno pomocí programu QC Expert. Byla provedena kritika modelu na hladině významnosti 95 % a významnost regresních parametrů byla ověřena Studentovým t-testem. V Tabulce 11 jsou zobrazeny regresní parametry (směrnice, úsek) a jejich směrodatné odchylky, pravděpodobnost úseku, $p_{\text{úsek}}$, a jejich spolehlivosti (R^2). Úsek byl významný, pokud hodnota $p_{\text{úsek}}$ byla nižší než 0,05. Naopak pokud byla vyšší než 0,05, pak byl úsek brán jako nevýznamný. Hodnoty spolehlivosti u standardů byly větší než hodnota 0,996.

Tabulka 11 Kalibrační závislosti sledovaných látek, směrnice, úsek, $p_{\text{úsek}}$, spolehlivost. V – významný úsek ($p < 0,05$); N – nevýznamný úsek ($p > 0,05$), ^a ... nevýznamný úsek.

Látka č.	Standard	Směrnice	Úsek	$p_{\text{úsek}}$	R^2
1	Kyselina galová	83,716 (± 0,24)	-28,045 (± 9,35)	0,0085 (V)	0,9999
2	Kyselina protokatechová	41,759 (± 0,54)	56,980 (± 18,12)	0,0047 (V)	0,9967
3	Katechin	20,617 (± 0,10)	- 2,240 (± 0,10)	0,0440 (V)	0,9998
4	Kyselina chlorogenová	41,655 (± 0,12)	- ^a	0,2542 (N)	0,9999
5	Kyselina vanilová	39,581 (± 0,10)	- 9,434 (± 3,92)	0,0285 (V)	0,9999
6	Kyselina kávová	120,017 (± 0,87)	128,644 (± 29,14)	0,0002 (V)	0,9988
7	Kyselina syringová	76,146 (± 0,24)	- ^a	0,9353 (N)	0,9998
8	Epikatechin	15,030 (± 0,04)	- ^a	0,3522 (N)	0,9999
9	Kyselina p-kumarová	149,547 (± 0,70)	-83,178 (± 27,09)	0,0073 (V)	0,9996
10	Kyselina ferulová	82,864 (± 0,3)	- ^a	0,6596 (N)	0,9998
11	Kyselina sinapová	40,747 (± 0,11)	-12,136 (± 4,39)	0,0139 (V)	0,9999
12	Rutin	17,277 (± 0,12)	4,738 (± 1,31)	0,0047 (V)	0,9997
13	Myricetin	26,976 (± 0,17)	-23,743 (± 6,34)	0,0018 (V)	0,9994
14	Kvercetin	32,027 (± 1,16)	- ^a	0,6661 (N)	0,9968

Abychom zjistili, jak nízké koncentrace můžeme stanovit optimalizovanou metodou RP-HPLC-UV-MS byly vypočteny meze detekce a stanovitelnosti. Mez detekce (LOD) je koncentrace analytu, která lze ještě spolehlivě prokázat. Mez detekce byla vypočítána jako trojnásobek hodnoty šumu na základní linii podělená směrnicí z regresní křivky, která byla získána závislostí výšky standardů na jejich koncentraci. Mez stanovitelnosti (LOQ) je koncentrace analytu, která lze s definovanou přesností ještě stanovit. Mez stanovitelnosti byla vypočítána jako desetinásobek hodnoty šumu na základní linii podělená směrnicí z regresní křivky, která byla získána závislostí výšky standardů na jejich koncentraci. Meze detekce a stanovitelnosti jsou uvedeny v Tabulce 12 u všech uvedených standardů.

Tabulka 12 Mez stanovitelnosti a detekce

Číslo	Látka	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]
1	Kyselina galová	0,0141	0,0470
2	Kyselina protokatechová	0,0186	0,0620
3	Katechin	0,0503	0,1678
4	Kyselina chlorogenová	0,0235	0,0785
5	Kyselina vanilová	0,0198	0,0658
6	Kyselina kávová	0,0064	0,0215
7	Kyselina syringová	0,0118	0,0394
8	Epikatechin	0,0553	0,1845
9	Kyselina p-kumarová	0,0058	0,0192
10	Kyselina ferulová	0,0118	0,0393
11	Kyselina sinapová	0,0168	0,0560
12	Rutin	0,0479	0,1596
13	Myricetin	0,0285	0,0951
14	Kvercetin	0,0318	0,1061

4.1.4. Optimalizace přípravy vzorku

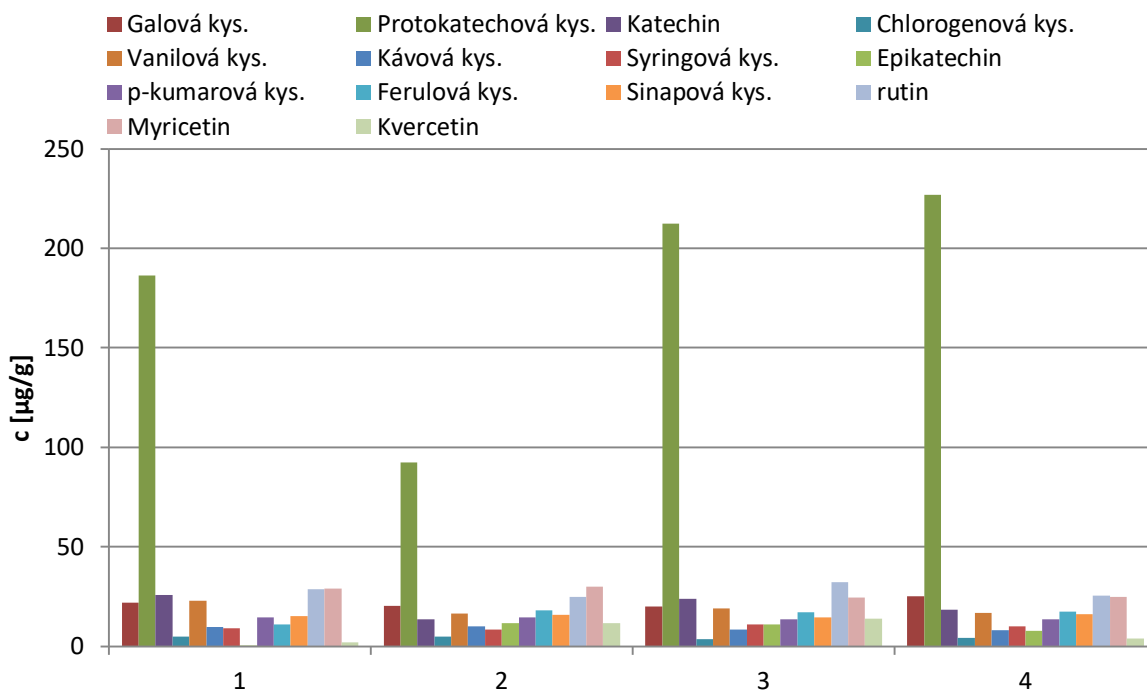
Příprava vzorku je jeden z nejdůležitějších kroků při analýze potravin. Fenolické látky obsažené v pohance jsou z velké části vázány na glykosidovou či esterovou vazbu na další složky pohanky, a je nutné je z těchto vazeb uvolnit, aby mohlo dojít k jejich stanovení.

Postup alkalické hydrolyzy byl převzat z [113], ale musel být modifikován. Místo 5 ml NaOH bylo napipetováno 10 ml NaOH ke vzorku, protože při 5 ml obsah zkumavky zgelovatěl a nedošlo by k dostatečné homogenizaci vzorku v rotační třepačce během hydrolyzy, viz. kapitola 2.3.2. Alkalická hydrolyza.

Byla testována nejvhodnější délka alkalické hydrolyzy vzorků pohankových raw sušenek. Trvání hydrolyzy bylo důležité z hlediska množství vyvázaných fenolických látek z vazeb, aby mohly být poté stanoveny. Proto byla testována 2, 3 a 4 hodinová hydrolyza. Při porovnání 2, 3 a 4 hodinové hydrolyzy (P 16-18) je patrné, že 2 hodinová hydrolyza nebyla dostatečně dlouhá, aby se přítomné fenolické látky hydrolyzovaly. 4 hodinová hydrolyza byla z hlediska analýzy podobná 3 hodinové, ale některé látky už nebyly detekovány a odezva nebyla tak vysoká jako u 3 hodinové hydrolyzy. 3 hodinová hydrolyza byla proto zvolena jako neoptimálnější. Během této doby se podařilo vybrané fenolické látky hydrolyzovat v co největším množství a bylo, je možné detekovat. Píky detekovaných látek byly dostatečně vysoké a také z hlediska úspory času byla 3 hodinová hydrolyza výhodnější.

Po hydrolyze následovala neutralizace 35 % HCl. Hodnota pH byla upravena na hodnotu cca 2. Upravit pH na přesnou hodnotu 2 nebylo jednoduché, protože jen při malém přídavku kyseliny, pH podstatně kleslo. Dodržení napipetovaného množství kyseliny bylo důležité i v rámci dodržení stejných objemů vzorku. Nicméně bylo testováno různé pH (0,5-3) a vliv pH na obsah fenolických látek nebyl pozorován.

Jako kontrola opakovatelnosti a reprodukovatelnosti hydrolyzy byl zpracován jeden vzorek (vzorek pohankových sušenek sušený při 40 °C), který byl připraven vždy stejným způsobem, jako ostatní vzorky viz. kapitola 2.3. Příprava vzorku. Tyto vzorky byly připraveny s odstupem 2 dnů a dohromady byly připraveny 4 vzorky. Jak je patrné z Obrázku 18 hydrolyzy nejsou zcela identické, ale podobné si jsou. Proto byla u vzorků zvolena metoda: jeden vzorek-dvě hydrolyzy a každý vzorek byl dvakrát měřen.



Obrázek 18 Opakovatelnost a reprodukovatelnost hydrolýzy

Po extrakci fenolických látek směsí diethyletheru a ethylecetátu byl vzorek sušen pod proudem dusíku. Po vysušení vzorku bylo zvoleno jako nejvhodnější rozpuštění extraktu ve 2 ml směsi metanol-voda (1:1, v/v). Vzorek byl poté připraven k analýze.

4.2. Analýza vzorků

Pohankové raw sušenky byly připraveny v práci [112]. Sušenky obsahovaly kromě pohanky také sušené švestky a lískové oříšky. Látky, které jsou přítomné ve švestkách, by mohly mít vliv na obsah fenolických látek v sušenkách. Po upečení byly vzorky zhomogenizovány a zmrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby analýzy.

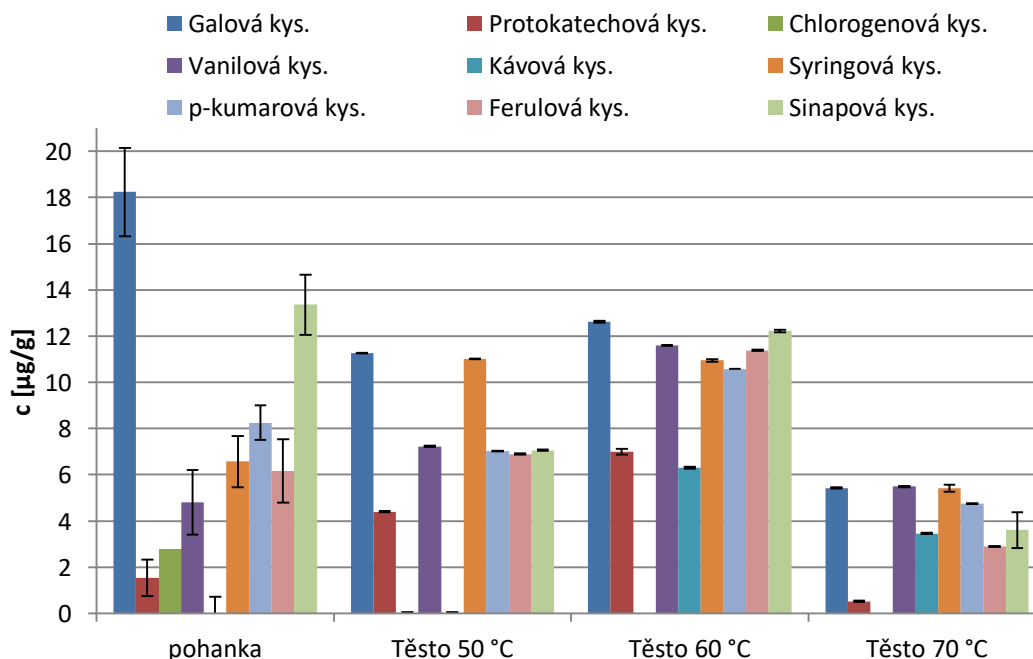
Bylo připraveno celkem 25 vzorků. Stanovení fenolických látek ve vzorcích pohankových raw sušenek bylo provedeno pomocí optimalizované RP-HPLC-UV/VIS-MS metody. Byly zpracovány vzorky, kdy pečící hmota byla namáčena jak za laboratorní, tak za chladničkové teploty, při teplotách sušení 40 , 50 , 60 a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analyzovány byly vždy 2 vzorky od každé teploty sušení, které byly proměřeny 2x. Označení vzorků, jejíž směs byla namáčena 20 hodin za laboratorní teploty, bylo Lab. t. 40 , 50 , 60 , $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky s pečící směsí, která byla namáčena za chladničkové teploty, měla označení jako Chlad. t. 40 , 50 , 60 , $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále byly analyzovány vzorky těsta, ze kterých byly připraveny pohankové raw sušenky o teplotě sušení 50 , 60 a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. K dispozici byl pouze jeden vzorek od každého těsta

a každý ze vzorků byl 2x proměřen. Nakonec byl analyzován vzorek čisté pohanky, ze které byly připraveny 2 extrakty a každý extrakt byl proměřen 2x.

Výsledné koncentrace fenolických látek v pohankových raw sušenkách jsou přepočítány na $\mu\text{g/g}$ upečené sušenky. Tabulky s koncentracemi a směrodatnými odchylkami jednotlivých vzorků jsou v příloze této práce (P 19-25).

4.2.1. Čistá pohanka a těsta pohankových raw sušenek

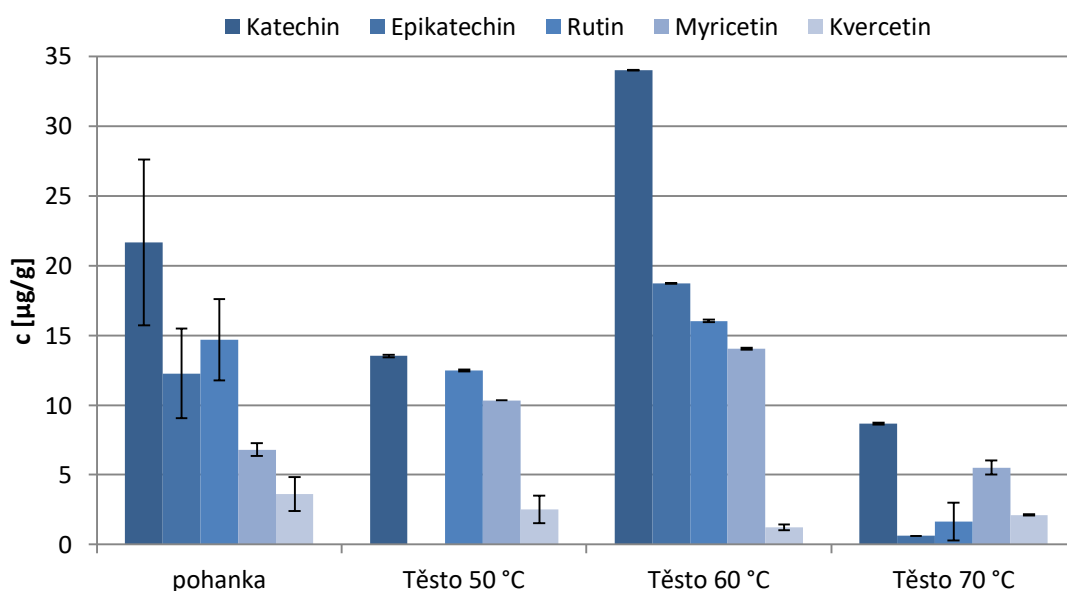
Ve vzorku čisté pohanky bylo detekováno 7 fenolových kyselin (Obrázek 19), pouze kyselina kávová byla pod mezí stanovitelnosti. Nebyla přítomna kyselina chlorogenová. Pohanka obsahuje nejvíce kyselinu galovou a sinapovou. V nejmenším množství byla přítomna kyselina protokatechová. Podle článku [39] byla v pohance nejvíce zastoupena kyselina ferulová, v našem případě byla tato kyselina detekována ve vzorku pohanky až jako pátá v pořadí. Přítomnost nižšího množství mohlo být způsobeno odlišnou přípravou vzorku. V našem případě byl vzorek pohanky hydrolyzován a lišil se i postup extrakce. V našich vzorcích pohanky byla detekována navíc kyselina galová. Kyselina kávová a ferulová nebyly nalezeny ani v naší pohance ani v pohance ze článku [39].



Obrázek 19 Koncentrace fenolových kyselin v čisté pohance a těstech

V těstech raw pohankových sušenek nebyla nalezena kyselina chlorogenová na rozdíl od vzorků pohanky. Kyselina kávová byla detekována v těstech o teplotách sušení 60 a 70 °C. Jak je z Obrázku 19 pohanky a těst patrné, tak koncentrace většiny fenolových kyselin v těstech je vyšší než jejich koncentrace v pohance. Kromě kyselin galové a sinapové, ty mají vyšší koncentraci v pohance.

Ve vzorku pohanky byly nalezeny všechny sledované flavonoidy (Obrázek 20). Největší zastoupení měl katechin a rutin. Nejméně bylo nalezeno myricetinu a kvercetin ve vzorku čisté pohanky. V článku [39] byl naopak katechin přítomen v malém množství, ale rutin byl nejvíce zastoupeným flavonoidem. Příčinou vysoké koncentrace katechinu by mohla být rozdílná příprava vzorku k separaci, protože v [39] nebyly vzorky hydrolyzovány. Katechiny jsou díky hydrolyze uvolněny z glykosidových vazeb a poté mohou být detekovány. Naopak v našich vzorcích byly navíc nalezeny také epikatechin a myricetin.



Obrázek 20 Koncentrace flavonoidů v čisté pohance a těstech

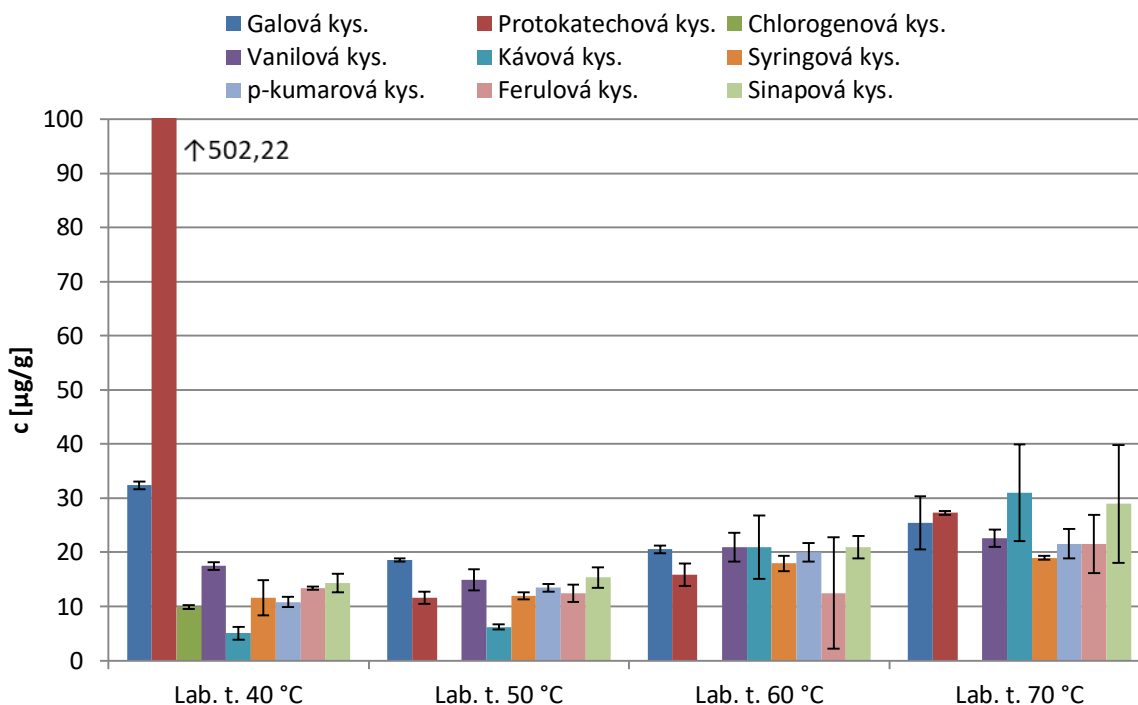
Obsah flavonoidů v těstu o teplotě sušení 50 °C (Obrázek 20) je podobný jako u pohanky až na chybějící epikatechin v těstu. Obsah flavonoidů v těstu o teplotě sušení 60 °C je nejbohatší až na koncentraci kvercetinu, která je ze všech těst nejnižší. V těstě o teplotě sušení 70 °C obsah flavonoidů je nejnižší, avšak jsou přítomny rovněž všechny stanovované flavonoidy. Shodně bylo nalezeno největší množství katechinu u všech těst. Naopak nejméně bylo nalezeno kvercetin.

Podle studie [82], ve které zjišťovali obsah fenolických látek v pohankových špagetách, byly shodně identifikovány myricetin, kyseliny protokatechová, syringová,

p-kumarová, katechin, rutin, epikatechin a kvercetin jako u našich vzorků čisté pohanky. V této studii také použili podobný postup přípravy vzorků (alkalickou hydrolyzu s následnou extrakcí). Jednou z možných příčin rozdílného zastoupení fenolických látek, jak bylo prokázáno v publikaci [114], je způsobeno procesem mletí.

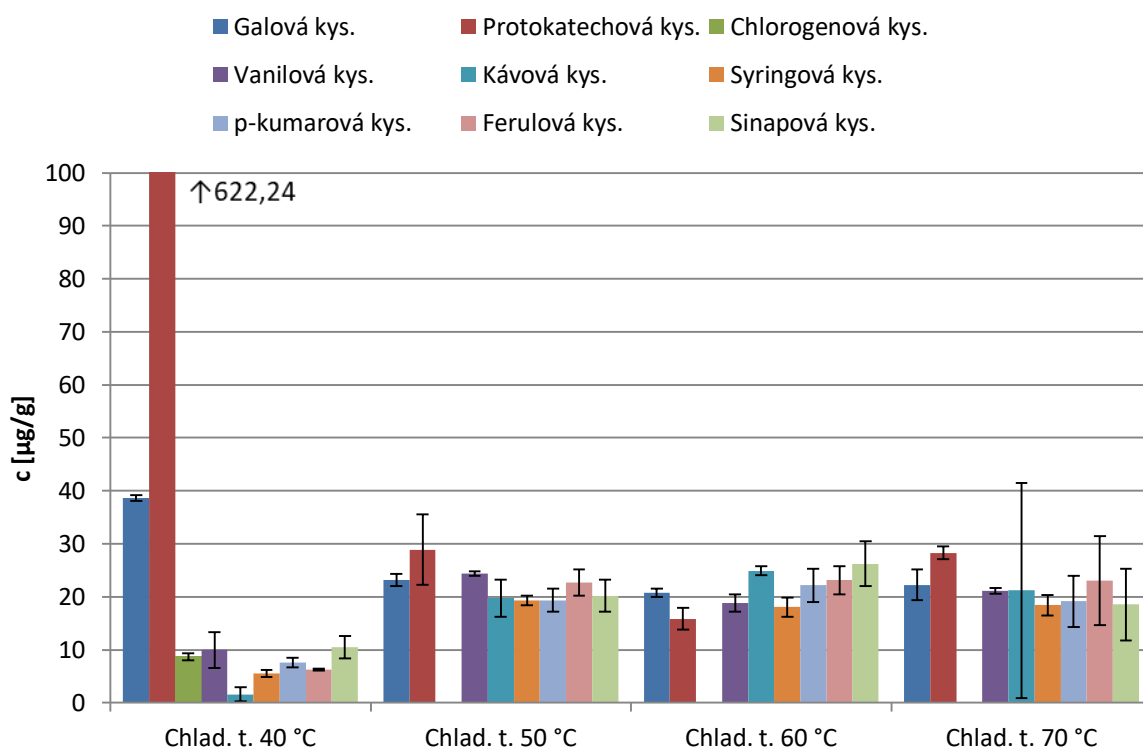
4.2.2. Obsah fenolických kyselin ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40, 50, 60 a 70 °C

Byly porovnány obsahy fenolových kyselin ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40, 50, 60 a 70 °C, kde byla pečící hmota namáčena za laboratorní teploty 20 hodin (Obrázek 21). Ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40 °C bylo jako v jediném vzorku nalezeno všech 9 vybraných fenolických kyselin. V tomto vzorku byl nalezen vysoký obsah kyseliny protokatechové oproti ostatním vzorkům lišících se teplotou sušení. Bylo nalezeno i vysoké procento galové kyseliny ve vzorku při 40 °C. Koncentrace ostatních fenolových kyseliny vzorku při 40 °C jsou podobné vzorku při 50 °C. Při porovnání koncentrací všech fenolových kyselin je patrný stoupající trend. Nejvyšší koncentrace fenolových kyseliny jsou u vzorku při 70 °C kromě zmíněných kyselin protokatechové a galové.



Obrázek 21 Koncentrace fenolových kyselin v pohankových raw sušenkách sušených při 40, 50, 60, 70 °C, směs pro pečení namáčena při laboratorní teplotě 20 hodin

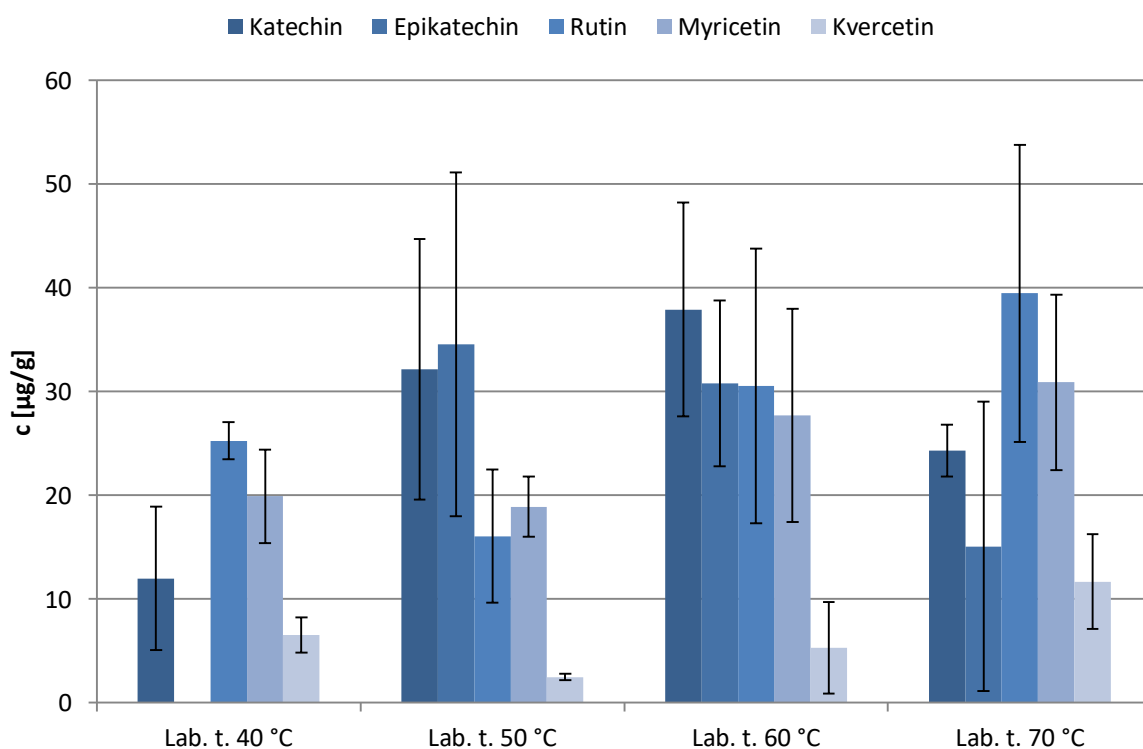
Obsah většiny fenolových kyselin se vzrůstající teplotou mírně roste ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40, 50, 60 a 70 °C, kde byla pečící hmota namáčena za chladničkové teploty 20 hodin (Obrázek 22). Zastoupení fenolových kyselin bylo stejné jako u vzorků připravovaných za laboratorní teploty, ale koncentrace přítomných fenolových kyselin byly o něco vyšší. Ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40 °C bylo opět jako v jediném vzorku nalezeno všech 9 vybraných fenolických kyselin. V tomto vzorku byl nalezen vysoký obsah kyseliny protokatechové oproti ostatním vzorkům lišících se teplotou sušení. I koncentrace kyseliny galové v tomto vzorku byla nejvyšší. Naopak nejméně bylo kyseliny chlorogenové, která nebyla v ostatních vzorcích nalezena. Jak je patrné, tak příprava těsta za laboratorní a chladničkové teploty nemá prakticky vliv na obsah fenolových kyselin.



Obrázek 22 Koncentrace fenolových kyselin v pohankových raw sušenkách sušených při 40, 50, 60, 70 °C, směs po pečení namáčena při chladničkové teplotě 20 hodin

4.2.3. Obsah flavonoidů ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40, 50, 60 a 70 °C

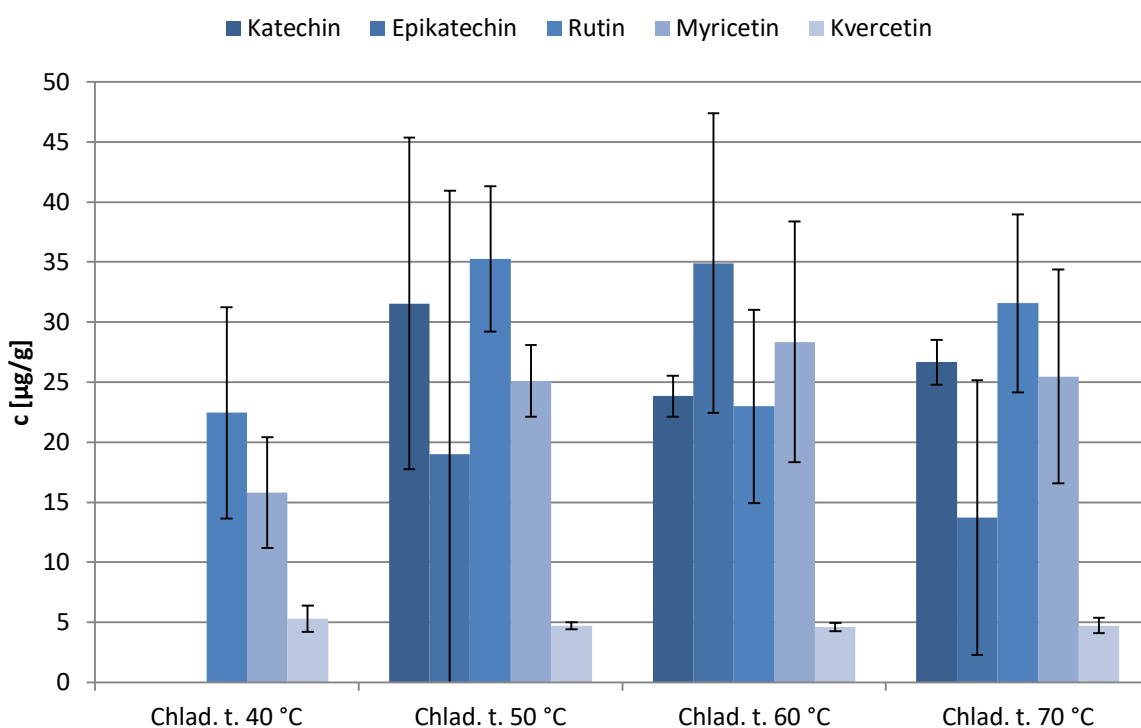
Byly porovnány obsahy flavonoidů ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40, 50, 60 a 70 °C, kde byla pečící hmota namáčena za laboratorní teploty 20 hodin (Obrázek 23). Ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40 °C nebyl jako v jediném vzorku nalezen epikatechin. Ve všech ostatních vzorcích odlišných teplot nalezen byl. U epikatechinu můžeme pozorovat klesající trend koncentrací ve vzorcích teplot 50-70 °C. U rutinu, myricetinu a kvercetin je naopak rostoucí trend koncentrací. U katechinu a epikatechinu jsou koncentrace proměnlivé u všech vzorků. Je zajímavé, že rutin, který má být nejvíce zastoupeným flavonoidem v pohance, tak pouze ve vzorku o teplotě 40 a 70 °C je na prvním místě.



Obrázek 23 Koncentrace flavonoidů v pohankových raw sušenkách sušených při 40, 50, 60, 70 °C, směs pro pečení namáčena při laboratorní teplotě 20 hodin

Stejně jako u fenolových kyselin ani u flavonoidů nebyl zaznamenán vliv teploty přípravy těsta na obsah flavonoidů (Obrázek 24). U rutinu, myricetinu a kvercetin byl pozorován rostoucí trend v jejich koncentracích. Ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při teplotě 40 °C byly nalezeny pouze tři flavonoidy, rutin, myricetin a kvercetin a jejich obsahy byly nejnižší ze všech vzorků. Je zajímavé, že obsah kvercetin je u všech vzorků téměř stejný. Tentokrát je rutin jako nejvíce zastoupený flavonoid přítomen hned ve třech případech, vzorku pohankových raw sušenek o teplotě sušení 40, 50 a 70 °C.

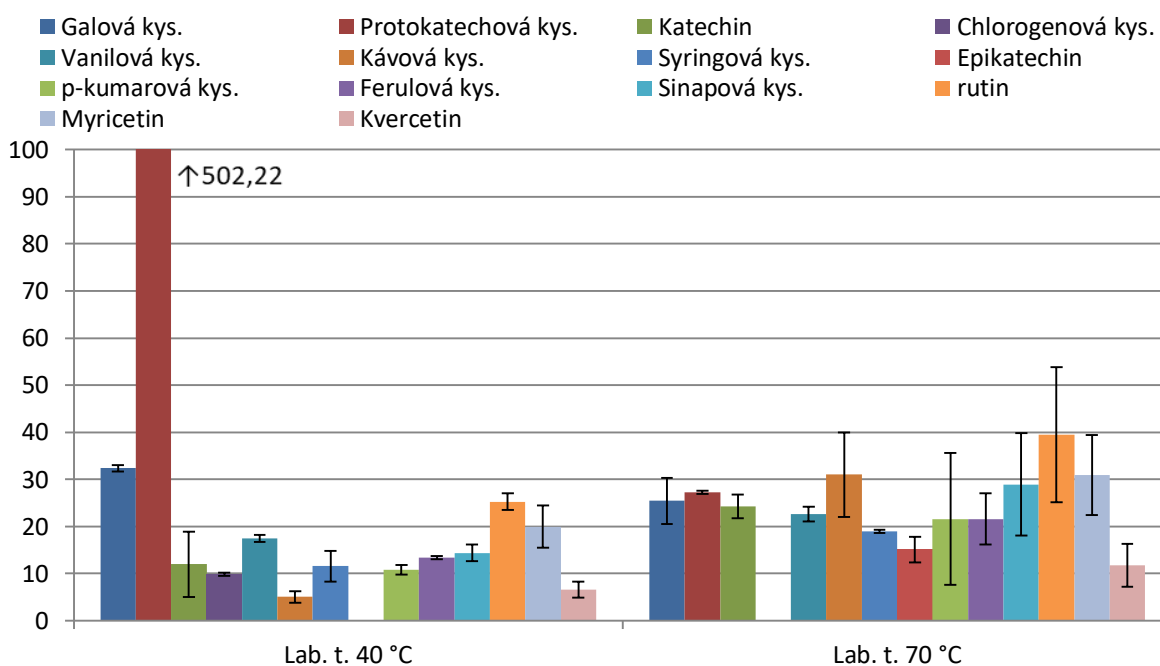
Chromatogramy vzorků pohankových raw sušenek sušených při rozdílných teplotách, vzorků těst a čisté pohanky jsou v příloze práce (P 26-31).



Obrázek 24 Koncentrace flavonoidů v pohankových raw sušenkách sušených při 40, 50, 60, 70 °C, směs pro pečení namáčena při chladničkové teplotě 20 hodin

4.2.4. Porovnání obsahu fenolických látek v pohankových raw sušenkách sušených při 40 a 70 °C

Při porovnání obsahů fenolických látek v pohankových raw sušenkách sušených při 40 a 70 °C (Obrázek 25) je patrné, že koncentrace těchto látek s teplotou sušení roste kromě kyseliny protokatechové a galové, jejichž koncentrace v sušenkách sušených při 40 °C mnohonásobně převyšují jejich obsah v sušenkách sušených při 70 °C. Koncentrace katechinu vzrostla více než dvojnásobně. Koncentrace kyseliny vanilové je o 1,3x vyšší. Koncentrace kyseliny kávové je více jak 6-ti násobná. Skoro dvojnásobně se zvýšila koncentrace kyseliny syringové. Epikatechin nebyl vůbec přítomen ve vzorku o teplotě sušení 40 °C. Dvojnásobně se zvýšila i koncentrace kyseliny p-kumarové, ferulové a sinapové. Koncentrace rutinu, myricetinu a kvercetin se zvýšila cca 1,6x. Zvyšuje se obsah fenolových kyselin i flavonoidů. Tento trend platí jak pro sušenky, jejichž pečící hmota byla namáčena za laboratorní i chladničkové teploty 20 hodin.



Obrázek 25 Koncentrace fenolických látek v pohankových raw sušenkách sušených při 40 a 70 °C, směs pro pečení namáčena při laboratorní teplotě 20 hodin

V jedné ze studií byl popsán vliv sušení na pohankový slad, který ovlivnil zastoupení fenolických látek. Dokonce vliv zvýšené teploty dal vzniku nové sloučenině [108]. Další studie popisuje vliv teploty v procesu zrání na ječný slad. Zde došlo k nárůstu fenolových kyselin do teplot 70-80 °C. Po dalším zvýšení teploty došlo následně k poklesu koncentrace těchto látek [115].

5. Závěr

Byla vypracována literární rešerše, kde bylo popsáno stanovení fenolických látek v pohance a ostatních obilovinách. Toto téma bylo zaměřeno hlavně na postup přípravy vzorku před analýzou a možnosti stanovení fenolických látek v pohance pomocí kapalinové chromatografie. Dále byla popsána samotná pohanka z hlediska morfologie rostliny, obsahu látek (sacharidy, bílkoviny, lipidy, vitamíny, antioxidanty a minerální látky) a terapeutického účinku. Jedna kapitola byla věnována stanovovaným antioxidantům a raw stravě.

V experimentální části byla nejprve popsána optimalizace podmínek separace a následně optimalizace podmínek přípravy vzorků pohankový raw sušenek. Vzorek pohankových raw sušenek byl podroben 2 hodinové alkalické hydrolyze NaOH s přidavkem kyseliny askorbové, která má za úkol chránit fenolové kyseliny před jejich degradací vlivem vysokého pH. Následně byl vzorek zneutralizován kyselinou chlorovodíkovou. Uvolněné fenolické látky byly odděleny od ostatních látek extrakcí ve směsi ethylacetátu s diethyletherem 1:1 (v/v). Extrahované látky byly nakonec vysušeny pod proudem dusíku a byly připraveny k separaci na RP-HPLC-UV/VIS-MS. Ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40, 50, 60 a 70 °C byl sledován obsah vybraných fenolových kyselin a flavonoidů. Fenolické látky byly sledovány ve dvou typech sušenek, u části vzorků byla pečící hmota namáčena při laboratorní teplotě ve vodě 20 hodin a u druhé části vzorků byla pečící hmota namáčena při chladničkové teplotě ve vodě 20 hodin.

Koncentrace většiny fenolových kyselin ve vzorcích pohankových raw sušenek sušených při 40, 50, 60 a 70 °C měla stoupající tendenci, kdy byla pečící hmota namáčena při laboratorní teplotě. Z tohoto trendu však vybočovaly kyseliny protokatechová a galová, které byly v nejvyšších koncentracích nalezeny v sušenkách sušených již při 40 °C. Sušenky, jejichž pečící hmota se namáčela za chladničkové teploty, vykazovaly koncentrace fenolových kyseliny přibližně podobných u sušenek sušených při 50, 60 a 70 °C. U obsahu flavonoidů pohankových raw sušenek sušených při 40, 50, 60 a 70 °C nebyla vypořádkována žádná významná závislost. Vzorky sušenek oproti čisté pohance obsahovaly mnohonásobně víc fenolických látek. Jednou z příčin vyššího obsahu fenolických látek by mohla být přítomnost švestek v sušenkách a také vliv sušící teploty, protože i sušenky sušené při 40 °C měly minimálně dvojnásobné hodnoty koncentrací fenolických látek, než tomu bylo u čisté pohanky. Při porovnání vzorků sušených při 40 a 70 °C je patrné, že teplota sušení při 70 °C je výhodnější z hlediska obsahu fenolických látek.

Vliv teploty sušení na obsah fenolických látek je patrný, ale ne tak výrazný. Rozhodně ale není teplota nad 42 °C degradující teplotou pro fenolické látky, ba naopak celkově fenolických látek postupně přibývalo ve většině vzorků. Zajímavé by bylo porovnat, jak se bude obsah sledovaných látek lišit v sušenkách pečených, např. při teplotě 180 °C, kdy již dochází k Maillardovým reakcím.

6. Literatura

1. BAJEROVÁ, E., GABROVSKÁ, D., HAVELKOVÁ, D., HAVELKOVÁ, V., HRUŠKOVÁ, M., JURKANINOVÁ, L., POLIŠENSKÁ, I., SLUKOVÁ, M., VACULOVÁ, K., FAMĚRA, O., JIRČÍK, L., PŘÍHODA, J., SKŘIVAN, P., ŠVEC, I., TLÁSKAL, P.: *Obiloviny v lidské výživě 2016: Moderní trendy v mlýnské a pekárenské výrobě*. Praha: Potravinářská komora České republiky, 2016. ISBN 978-80-88019-16-9.
2. JAROLÍMKOVÁ, S.: *Jak připravovat obiloviny, luštěniny, ořechy a semena*. Praha: EB-Eva Babická, 2002. ISBN 80-903-234-0-5.
3. KOPÁČOVÁ, O.: *Trendy ve zpracování cereálií s přihlédnutím zejména k celozrnným výrobkům*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2007. ISBN 978-80-7271-184-0.
4. GAJDOŠOVÁ, A., ŠTURDÍK, E.: *Biologické, chemické a nutrično-zdravotné charakteristiky pekárských cereálií*. Nova Biotechnologica, 2004, 133-154.
5. BONDIA-PONS, I., AURA, A. M., VUORELA, S., KOLEHMAINEN, M., MYKKÄNEN, H., POUTANEN, K.: *Rye phenolics in nutrition and health*. Journal of Cereal Science, 49 (2009), 323-336.
6. EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION: *Good plant protection practice: Oat*. Bulletin OEPP/EPPO, 32 (2002), 393-406.
7. CHANDRASEKARA, A., SHAHIDI, F.: *Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation*. Journal of Functional Foods, 4 (2012), 226-237.
8. PŠENICE OBECNÁ [online]. 2018[cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <http://www.farmpirate.com/de/node/2466>
9. JEČMEN JARNÍ [online]. 2018[cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <https://www.bvv.cz/techagro/techagro-2014/grand-prix-techagro-2014/prihlasene-exponaty/jecmen-jarni-francin/>
10. ŽITO SETÉ [online]. 2018[cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <http://www.chlebasvezdejsi.cz/cs/jime/jime-pro-zdravi-a-krasu/vite-ze-zito-neni-jen-zakladni-potravina>

11. RÝŽE [online]. 2018[cit. 2018-03-17]. Dostupné z: http://www.vimcojim.cz/magazin/clanky/o-vyzive/Ryze-by-v-nasem-jidelnicku-rozhodne-nemela-chybet__s10010x7707.html
12. PROSO SETÉ [online]. 2018[cit. 2018-03-17]. Dostupné z: http://www.botanickafotogalerie.cz/fotogalerie.php?lng=cz&latName=Panicum%20miliaceum&czName=proso%20set%C3%A9&title=Panicum%20miliaceum%20|%20proso%20set%C3%A9&showPhoto_variant=photo_description&show_sp_descr=true&spec_syntax=species&sortby=lat
13. KUKUŘICE SETÁ [online]. 2018[cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <https://ozahrade.webnode.cz/products/kukurice-seta-zea-mays-/>
14. OVES [online]. 2018[cit. 2018-03-17]. Dostupné z: <https://www.schaer.com/cs-cz/a/oves-po-stopach-podcenovane-obilniny>
15. ZHU, K.X., LIAN, C. X., GUO, X. N., PENG, W., ZHOU, H. M.: *Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ*. Food Chemistry, 126 (2011), 1122–1126.
16. XU, J.-G., HU, Q.-P., WANG, H.-D., LUO, J.-Y., LIU, Y., TIAN, CH.-R.: *Changes in the main nutrients, phytochemicals and antioxidant activity in yellow corn grain during maturation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (2010), 5751-5756.
17. Význam žita a žitných výrobků ve výživě [online]. 2018[cit. 2018-03-17]. Dostupné z: http://www.ctpp.cz/data/files/Clanek_zito.pdf
18. MOZA, J., GUJRAL, H. S.: *Starch digestibility and bioactivity of high altitude hullless barley*. Food Chemistry, 194 (2016), 561–568.
19. XU, J., INGLETT, G. E., CHEN, D., LIU, S. X.: *Viscoelastic properties of oat β -glucan-rich aqueous dispersions*. Food Chemistry, 138 (2013), 186–191.
20. CHANDRASEKARA, A., SHAHIDI, F.: *Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation*. Journal of Functional Food, 4 (2012), 226-237.
21. PARVEEN, S., SIYAL, A. N., MEMON, N., MEMON, S. Q., KHUHAWAR, M. Y.: *Extraction and determination of phenolic acids and vitamin B of sieved and unsieved wheat grain by MEKC*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 38 (2015), 143–152.

22. OROZCO-MENA, R., SALMERÓN-OCHOA, I., ORTEGA-RIVAS, E., PEREZ-VEGA, S.: *Development of a sustainable process for the solid-liquid extraction of antioxidants from oat*. Sustainability, 6 (2014), 1504-1520.
23. LAOKULDILOK, T., SHOEMAKER, CH. F., JONGKAEWATTANA, S., TULYATHAN, V.: *Antioxidants and antioxidant activity of several pigmented rice brans*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (2011), 193–199.
24. CHANDRASEKARA, A., NACZK, M., SHAHIDI, F.: *Effect of processing on the antioxidant activity of millet grains*. Food Chemistry, 133 (2012), 1-9.
25. PETR, J., HÚSKA J. Speciální produkce rostlinná – I. 1. vyd. Praha: AF ČZU, 1997, 197. ISBN 80-213-0152-X.
26. Moudrý, J., Kalinová, J. Pěstování speciálních plodin. [online]. 2018[cit. 2018-04-01]. Dostupné z: http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/skripta/2/proso_sete.html
27. HAROS, C. M., SCHOENLECHNER, R. Pseudocereals: Chemistry and technology. Oxford: John Wiley & Sons, 2017, 18-19, 62-64, 106-109.
28. AMARANT [online]. 2018[cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <https://behejsrdcem.com/clanky/amarant-bezlepkova-zasobarna-bilkovin-nejvyssi-kvality/>
29. QUINOA [online]. 2018[cit. 2018-04-10]. Dostupné z: <https://botanic.cz/quinoa-bila-semena>
30. HON, Z., PATOČKA, J.: *Pohanka jako funkční potravina*. Kontakt 1, 10(2008), 229-231.
31. JANSSEN, F., PAULY, A., ROMBOUTS, I., JANSSENS, K. J. A., DELEU, L. J., DELCOUR, J. A.: *Proteins of Amaranth (Amaranthus spp.), Buckwheat (Fagopyrum spp.), and Quinoa (Chenopodium spp.): A Food Science and Technology Perspective*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 16 (2017), 39-58.
32. ZHANG, Z.-L., ZHOU, M.-L., TANG, Y., LI, F.-L., TANG, Y.-X., SHAO, J.-R., XUE, W.-T., WU, Y.-M.: *Bioactive compounds in functional buckwheat food*. Food Research International, 49 (2012), 389-395.
33. POHANKA SETÁ [online]. 2018 [cit. 2018-03-17]. Dostupné z: http://www2.zf.jcu.cz/~moudry/skripta/2/pohanka_seta.html
34. KREFT, I., FABJAN, N., YASUMOTO, N.: *Rutin content in buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) food materials and products*. Food Chemistry, 98 (2006), 508-512.

35. DANIHELOVÁ, M., ŠTURDÍK, E.: *Nutritional and health benefits of buckwheat*. *Potravinárstvo*, 6 (2012), 1-9.
36. KRKOŠKOVÁ, B., MRÁZOVÁ, Z.: *Prophylactic components of buckwheat*. *Food Research International*, 38 (2005), 561-568.
37. KIM, S.-L., KIM, S.-K., PARK, CH.-H.: *Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable*. *Food Research International*, 37 (2004), 319-327.
38. WIJNGAARD, H. H., ARENDT, E. K.: *Buckwheat*. *Cereal Chemistry*, 83 (2006), 391-401.
39. SEDEJ, I., SAKAČ, M., MANDIČ, A., MIŠAN, A., TUMBAS, V., ČANDAČOVIČ-BRUNET, J.: *Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain and fractions: antioxidant compounds and activities*. *Journal of Food Science*, 77 (2012), 954-959.
40. GIMÉNEZ-BASTIDA, J. A., ZIELINSKI, H.: *Buckwheat as a Functional Food and Its Effects on Health*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (2015), 7896-7913.
41. SUN, T., HO, C.-T.: *Antioxidant activities of buckwheat extracts*. *Food Chemistry*, 90 (2005), 743–749.
42. TŮMOVÁ, L., PÍCHOVÁ, M., DUŠEK, J.: *Pohanka obecná a její terapeutické využití*. *Praktické lékařství*, 4 (2007), 190-194.
43. BREWER, M. S.: *Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10 (2011), 221-247.
44. BENDARY, E., FRANCIS, R. R., ALI, H. M. G., SARWAT, M. I., HADY, S. EL.: *Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds*. *Annals of Agricultural Science*, 58 (2013), 173-181.
45. SKIBSTED, L. H. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications*. Woodhead Publishing Limited, 2010, Cambridge (UK). ISBN 978-1-84569-648-1, 3-35.
46. ROBBINS, R. J.: *Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003), 2866-2887.

47. BONDIA-PONS, I., AURA, A.-M., VUORELA, S., KOLEHMAINEN, M., MYKKÄNEN, H., POUTANEN, K.: *Rye phenolics in nutrition and health*. Journal of Cereal Science, 49 (2009), 323-336.
48. GULLÓN, B., LÚ-CHAU, T., MOREIRA, M. T., LEMA, J. M., EIBES, G.: *Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability*. Trends in Food Science & Technology, 67 (2017), 220-235.
49. GANESHPURKAR, A., SALUJA, A. K.: *The pharmacological potential of rutin*. Saudi Pharmaceutical Journal, 25 (2017), 149-164.
50. KELLY, G. S.: *Quercetin*. Alternative Medicine Review 16 (2011), 172-194.
51. SEGO, S.: *Alternative meds update: Quercetin*. The Clinical Advisor, 15 (2011), 114-116.
52. CELIK, N., VURMAZ, A., KAHRAMAN, A.: *Protective effect of quercetin on homocysteine-induced oxidative stress*. Nutrition, 33 (2017), 291-296.
53. LEE, D. H., LEE, CH. S.: *Flavonoid myricetin inhibits TNF- α -stimulated production of inflammatory mediators by suppressing the Akt, mTOR and NF- κ B pathways in human keratinocytes*. European Journal of Pharmacology, 784 (2016), 164-172.
54. MIYAZAKI, Y., ICHIMURA, A., SATO, S., FUJII, T., OISHI, S., SAKAI, H., TAKESHIMA, H.: *The natural flavonoid myricetin inhibits gastric H⁺, K⁺-ATPase*. European Journal of Pharmacology, 820 (2018), 217-221.
55. GRZESIK, M., NAPARLO, K., BARTOSZ, G., SADOWSKA-BARTOSZ, I.: *Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants*. Food Chemistry, 241 (2018), 480-492.
56. LONČARIĆ, A., LAMAS, J. P., GUERRA, E., KOPJAR, M., LORES, M.: *Thermal stability of catechin and epicatechin upon disaccharides addition*. International Journal of Food Science and Technology (2017), 1-8.
57. OU, S., KWOK, K.-CH.: *Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84 (2004), 1261-1269.
58. SRINIVASAN, M., RUKKUMANI, R., SUDHEER, A. R., MENON, V. P.: *Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 19 (2005), 491-496.

59. HUNG, P. V., PHAT, N. H., PHI, N. T. L.: *Physicochemical properties and antioxidant capacity of debranched starch-ferulic acid complexes*. *Strach*, 65 (2013), 383-389.
60. HAO, Y., GAO, R., LIU, D., HE, G., TANG, Y., GUO, Z.: *Selective extraction and determination of chlorogenic acid in fruit juices using hydrophilic magnetic imprinted nanoparticles*. *Food Chemistry*, 200 (2016), 215-222.
61. WILLEMS, J. L., KHAMIS, M. M., SAEID, W. M., PURVES, R. W., KATSELIS, G., LOW, N. H., EL-ANEED, A.: *Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 933 (2016), 164-174.
62. HUANG, Y., CHEN, H., ZHOU, Y., WU, Y., HU, E., JIANG, Z.: *Inhibition effects of chlorogenic acid on benign prostatic hyperplasia in mice*. *European Journal of Pharmacology*, 809 (2017), 191-195.
63. FU, S., WU, CH., WU, T., YU, H., YANG, S., HU, Y.: *Preparation and characterisation of Chlorogenic acid-gelatin: A type of biologically active film for coating preservation*. *Food Chemistry*, 221 (2017), 657-663.
64. REIS, B., MARTINS, M., BARRETO, B., MILHAZES, N., GARRIDO, E. M., SILVA, P., GARRIDO, J., BORGES, F.: *Structure-Property-Activity Relationship of Phenolic Acids and Derivatives. Protocatechuic Acid Alkyl Esters*. *Journal of agricultural and food chemistry article*, 58 (2010), 6986-6993.
65. LIN, CH.-Y., TSAI, S.-J., HUANG, CH.-S., YIN, M.-Ch.: *Antiglycative effects of protocatechuic acid in the kidneys of diabetic mice*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011), 5117-5124.
66. TANAKA, T., KAWAGUCHI, N., ZAIMA, N., MORIYAMA, T., FUKUTA, Y., SHIRASAKA, N.: *Antiosteoporotic activity of a syringic acid diet in ovariectomized mice*. *J Nat Med*, 71 (2017), 632-641.
67. SHI, CH., SUN, Y., ZHENG, Z., ZHANG, X., SONG, K., JIA, Z., CHEN, Y., YANG, M., LIU, X., DONG, R., XIA, X.: *Antimicrobial activity of syringic acid against Cronobacter sakazakii and its effect on cell membrane*. *Food Chemistry*, 197 (2016), 100-106.
68. SMYK, B., MĘDZA, G., KASPAREK, A., PYRKA, M., GRZYCZYNSKI, I., MACIEJCZYK, M.: *Spectroscopic properties and conformational analysis*

- of methylester of sinapic acid in various environments.* The Journal of Physical Chemistry B, 121 (2017), 7299-7310.
69. RAJAN, V. K., MURALEEDHARAN, K.: *A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid.* Food Chemistry, 220 (2017), 93-99.
70. KANG, J., LI, Q., LIU, L., JIN, W., WANG, J., SUN, Y.: *The specific effect of gallic acid on Escherichia coli biofilm formation by regulating pgaABCD genes expression.* Applied Microbiology and Biotechnology, 102 (2018), 1837-1846.
71. PEI, K., OU, J., HUANG, J., OU, S.: *p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 96 (2016), 2952-2962.
72. KALINOWSKA, M.: *Synthesis, crystal structure, spectroscopic properties, and antimicrobial studies of a zinc(II) complex of -coumaric acid.* Journal of coordination chemistry, 66 (2013), 334-344.
73. NOUBIGH, A., ABDERRABLA, M.: *Solid-liquid phase equilibrium and thermodynamic properties of vanillic acid in different pure solvents.* Journal of Molecular Liquids, 223 (2016), 261-266.
74. GITZINGER, M., KEMMER, CH., FLURI, D.A., EL-BABA, A.D., WEBER, W., FUSSENEGGER, M.: *The food additive vanillic acid controls transgene expression in mammalian cells and mice.* Nucleic Acids Research, 40 (2012), 1-15.
75. YRBAS, M. DE LOS A., MORUCCI, F., ALONSO, R., GORZALCZANY, S.: *Pharmacological mechanism underlying the antinociceptive activity of vanillic acid.* Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 132, 88-95.
76. FAN, D., LI, F.H., SHI, S., CHEN, X.: *Hollow molecular imprinted polymers towards rapid, effective and selective extraction of caffeic acid from fruits.* Journal of Chromatography A, 1470 (2016), 27-32.
77. MALLIK, S. B., MUDGAL, J., NAMPOOTHIRI, M., HALL, S., ANOOPKUMAR-DUKIE, S., GRANT, G., RAO, C.M., ARORA, D.: *Caffeic acid attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour and neuroinflammation in mice.* Neuroscience Letters, 632 (2016), 218-223.
78. PELIKÁNOVÁ, K. *Hravě, zdravě, bezpečně: Jednoduché bezpečné recepty, po kterých se budete moci utlouct.* Praha: Grada, 2016, 25. ISBN 978-80-271-0111-5.

79. JENNINGS, J., CHENG, M.: *Does eating a raw food diet cause spleen qi deficiency?* Journal of Chinese Medicine, 97 (2011), 54-59.
80. LUO, CH., WANG, X., GAO, G., WANG, L., LI, Y., SUN, CH.: *Identification and quantification of free, conjugate and total phenolic compounds in leaves of 20 sweetpotato cultivars by HPLC–DAD and HPLC–ESI–MS/MS.* Food Chemistry, 141 (2013), 2697-2706.
81. STALIKAS, C. D.: *Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids.* Journal of Separation Science, 30 (2007), 3268-3295.
82. VERARDO, V., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA-CARRETERO, A., MARCONI, E., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A., CABONI, M. F.: *Determination of free and bound phenolic compounds in buckwheat spaghetti by RP-HPLC-ESI-TOF-MS: Effect of thermal processing from farm to fork.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (2011), 7700-7707.
83. PARVEEN, S., SIYAL, A. N., MEMON, N., MEMON, S. Q., Khuhawar, M. Y.: *Extraction and determination of phenolic acids and vitamin B of sieved and unsieved wheat grain by MEKC.* Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 38 (2015), 143-152.
84. DINELLI, G., CARRETERO, A. S., DI SILVESTRO, R., MAROTTI, I., FU, S., BENEDETTELLI, S., GHISELLI, L., GUTIÉRREZ, A. F.: *Determination of phenolic compounds in modern and old varieties of durum wheat using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 1216 (2009), 7229-7240.
85. KILCI, A., GOCMEN, D.: *Phenolic acid composition, antioxidant activity and phenolic content of tarhana supplemented with oat flour.* Food Chemistry, 151 (2014), 547-553.
86. WANG, T., ZHU, Y., SUN, X., RADDATZ, J., ZHOU, Z., CHEN, G.: *Effect of microfluidisation on antioxidant properties of corn bran.* Food Chemistry, 152 (2014), 37-45.
87. LI, F., ZHANG, X., ZHENG, S., LU, K., ZHAO, G., MING, J.: *The composition, antioxidant and antiproliferative capacities of phenolic compounds extracted from tartary buckwheat bran [Fagopyrum tartaricum (L.) Gaerth].* Journal of Functional Foods, 22 (2016), 145-155.

88. VAN HUNG, P., MORITA N. *Distribution of phenolic compounds in the graded flours milled from whole buckwheat grains and their antioxidant capacities*. Food Chemistry, 109 (2008), 325-331.
89. VAHER, M., MATSO K., LEVANDI, T., HELMJA, K., KALJURAND, M.: Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. *Procedia Chemistry*, 2 (2010), 76-82.
90. DENG, G.-F., XU, X.-R., GUO, Y.-J., XIA, E.-Q., LI, S., WU, S., CHEN, F., LING, W.-H., LI, H.-B.: *Determination of antioxidant property and their lipophilic and hydrophilic phenolic contents in cereal grains*. Journal of Functional Food, 4 (2012), 906-914.
91. ZHANG, Y., WANG, L., YAO, Y., YAN, J., HE, Z.: *Phenolic acid profiles of Chinese wheat cultivars*. Journal of Cereal Science, 56 (2012), 629-635.
92. MATTILA, P., PIHLAVA, J. - M., HELLSTRÖM, J.: *Contents of phenolic acid, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenantramides in commercial grain products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (2005), 8290-8295.
93. ANDREASEN, M. F., CHRISTENSEN, L. P., MEYER, A. S., HANSEN, A.: *Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79 (1999), 411-413.
94. MONTILLA, E. C., HILLEBRAND, S., ANTEZANA, A., WINTERHALTER, P.: *Soluble and bound phenolic compounds in different bolivian purple corn (Zea mays L.) cultivars*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (2011), 7068-7074.
95. HOUDE, M., KHODAEI, N., BENKERROUM, N., KARBOUNE, S.: *Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties*. Food Chemistry, 254 (2018).
96. LEE, K. - M., KALYANI, D., TIWARI, M. K., KIM, T. - S., DHIMAN, S. S., LEE, J. - K., KIM, I. - W.: *Enhanced enzymatic hydrolysis of rice straw by removal of phenolic compounds using a novel laccase from yeast Yarrowia lipolytica*. Bioresource Technology, 123 (2012), 636-645.
97. NARDINI, M., CIRILLO, E., NATELLA, F., MENCARELLI, D., COMISSO, A., SCACCINI, C.: *Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis*. Food Chemistry, 79 (2002), 119-124.

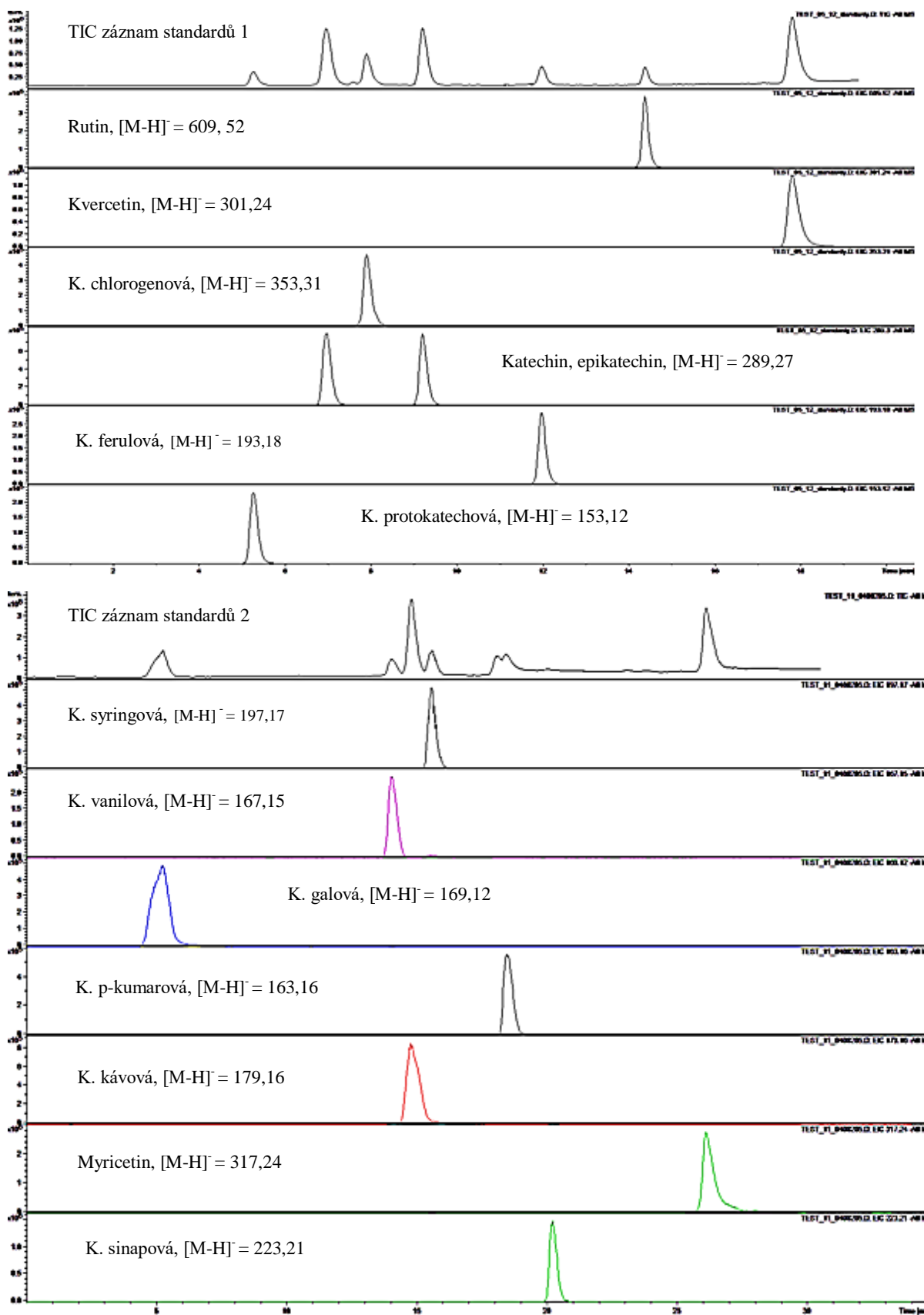
98. EXTRAKČNÍ TECHNIKY [online]. 2018[cit. 2018-04-10]. Dostupné z:
https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968
99. MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ ČR: *Český lékopis 2002. díl 1*, Praha: Grada, 2002.
100. HERMAN, F. M.: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2013, 1-26. ISBN 978-04-7007-369-8.
101. CHURÁČEK, J.: *Analytická separace látek*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1990. ISBN 80-03-00569-8.
102. SCHÉMA HPLC PŘÍSTROJE [online]. 2018[cit. 2018-04-10]. Dostupné z:
http://www.laboratory-journal.com/sites/git-labor.de/files/images/special/53056402__original.jpg
103. DOUŠA, M., HPLC portál [online]. 2018[cit. 2018-04-10]. Dostupné z:
<http://www.hplc.cz/>
104. HOLČAPEK, M., JANDERA, P.: *Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*. Chemické listy, 92 (1998), 278-286.
105. NORKOVÁ, R., JAKLOVÁ DYTRTOVÁ, J., KAŠIČKA, V.: *Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí*. Chemické listy, 107 (2013), 949-955.
106. HOLČAPEK, P.: *Přednášky z předmětu Hmotnostní spektrometrie*. Univerzita Pardubice (2017).
107. IONTOVÁ PAST [online]. 2018[cit. 2018-04-20]. Dostupné z:
<https://www.slideshare.net/stupkar/hmotnostn-spektroskopie>
108. TERPINC, T., CIGIČ, B., POLAK, T., HRIBAR, J., POŽRL, T.: *LC-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting*. Food Chemistry, 210 (2016), 9-17.
109. YA-PING, Y., CHENG-RIU, T., WEI, C.: *Anti-oxidative constituents of ethanol extract from buckwheat seeds by HPLC- electro-spray MS*. Agricultural Science in China, 7 (2008), 1-7.
110. JAMBREC, D., SAKAČ, M., MIŠAN, A., MANDLIČ, A., PESTORIČ, M.: *Effect of autoclaving and cooking on phenolic compounds in buckwheat-enriched whole wheat tagliatelle*. Journal of Cereal Science, 66 (2015), 1-9.

111. SYTAR, O.: *Phenolic acids in the inflorescences of different varieties of buckwheat and their antioxidant activity*. Journal of King Saud University-Science, 27 (2015), 136-142.
112. ZAPLETAL, T.: *Vliv nízkých teplot sušení na kvalitu pohankových sušenek*. Diplomová práce (2017), 1-78.
113. HOFMEISTER, P.: *Vliv úpravy vzorku na obsah a zastoupení fenolických látek v obilovinách*. Diplomová práce (2017), 1-95.
114. GALLARDO, C., JIMENEZ, L., GARCIA-CONESA, M. - T.: *Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions*. Food Chemistry, 99 (2006), 455–463.
115. INNS, E. L., BUGGEY, L. A., BOOER, C., NURSTEN, H. E., AMES, J. M.: *Effect of heat treatment on the antioxidant activity, color, and free phenolic acid profile of malt*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(2007), 6539–6546.

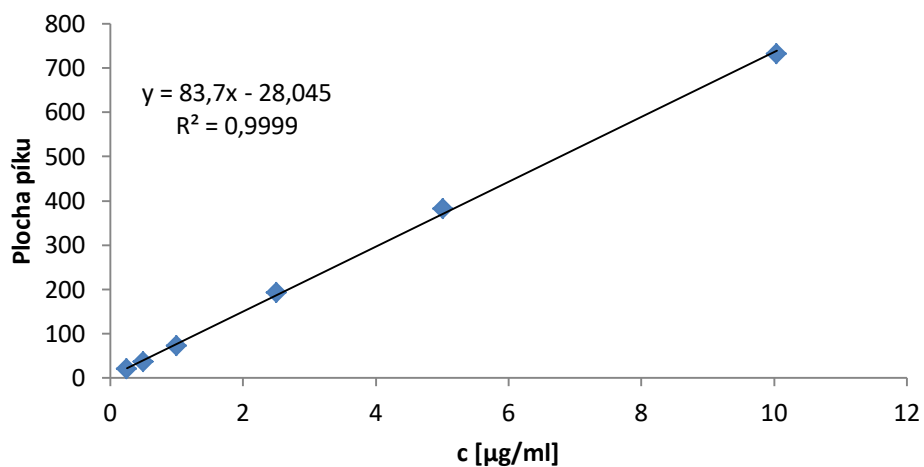
7. Přílohy

P 1 Rekonstruovaný chromatogram standardů 1, 2	7778
P 2 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny galové ($\lambda = 280$ nm)	7879
P 3 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny protokatechové ($\lambda = 280$ nm).....	7879
P 4 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace katechinu ($\lambda = 280$ nm).....	7880
P 5 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny chlorogenové ($\lambda = 280$ nm)	7980
P 6 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny vanilové ($\lambda = 280$ nm)	7980
P 7 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny kávové ($\lambda = 280$ nm).....	7981
P 8 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny syringové ($\lambda = 280$ nm)	8081
P 9 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace epikatechinu ($\lambda = 280$ nm)	8081
P 10 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny p-kumarové ($\lambda = 280$ nm)	8082
P 11 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny ferulové ($\lambda = 280$ nm).....	8182
P 12 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny sinapové ($\lambda = 280$ nm).....	8182
P 13 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace rutinu ($\lambda = 280$ nm)	8183
P 14 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace myricetinu ($\lambda = 280$ nm)	8283
P 15 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kvercetinů ($\lambda = 280$ nm).....	8284
P 16 Chromatogram 2 hodinové hydrolýzy	8384
P 17 Chromatogram 3 hodinové hydrolýzy	8384
P 18 Chromatogram 4 hodinové hydrolýzy	8385
P 19 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích čisté pohanky	8486
P 20 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích raw sušenek sušených při 40 °C.....	8486
P 21 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích raw sušenek sušených při 50 °C	8587
P 22 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích raw sušenek sušených při 60 °C.....	8587
P 23 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích raw sušenek sušených při 70 °C.....	8688
P 24 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích těsta raw sušenek	8688
P 25 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích pro opakovatelnost a reprodukovatelnost hydrolýzy.....	8789
P 26 Chromatogram vzorku Chlad. t. 40 °C	8890
P 27 Chromatogram vzorku Chlad. t. 50 °C	8891
P 28 Chromatogram vzorku Lab. t. 60 °C.....	8991
P 29 Chromatogram vzorku Lab. t. 70 °C.....	8992
P 30 Chromatogram pohanka.....	9092
P 31 Chromatogram těsto 60 °C.....	9093

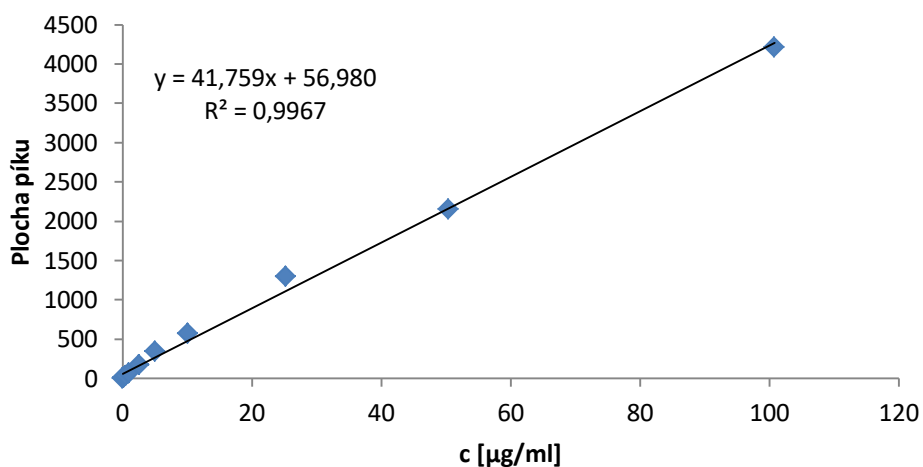
P 1 Extrahované chromatogramy molekulových iontů standardů.



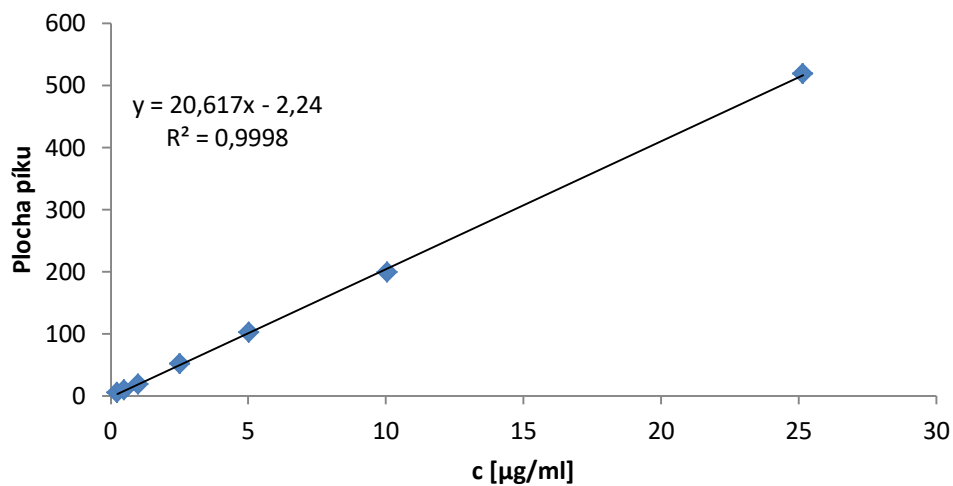
P 2 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny galové ($\lambda = 280$ nm)



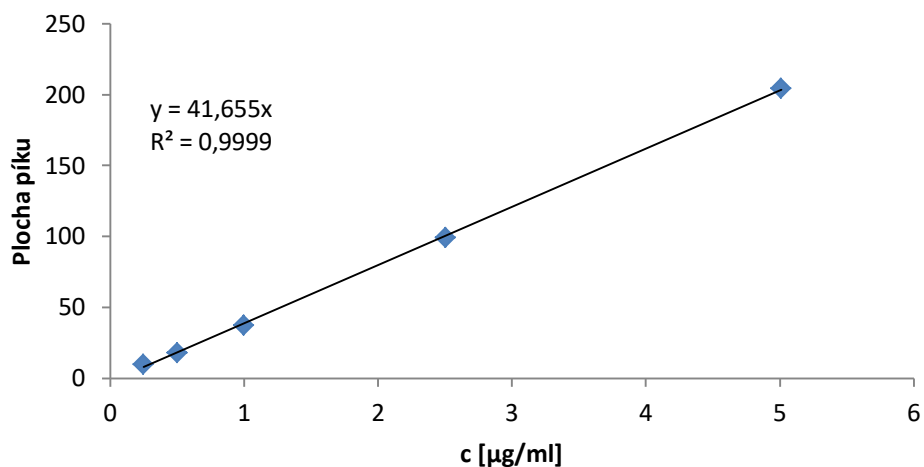
P 3 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny protokatechové ($\lambda = 280$ nm)



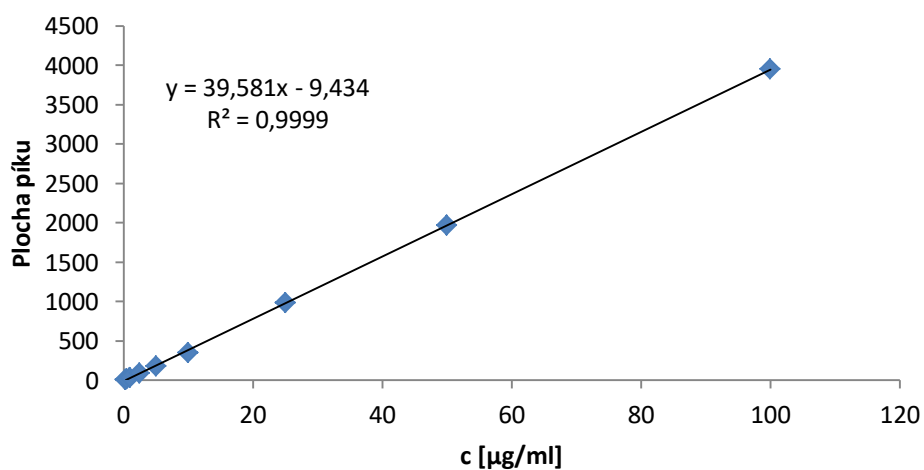
P 4 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace katechinu ($\lambda = 280$ nm)



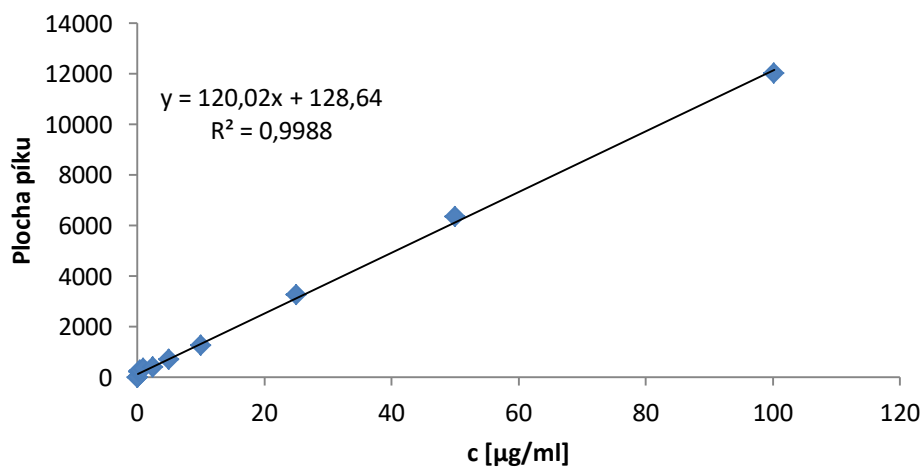
P 5 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny chlorogenové ($\lambda = 280$ nm)



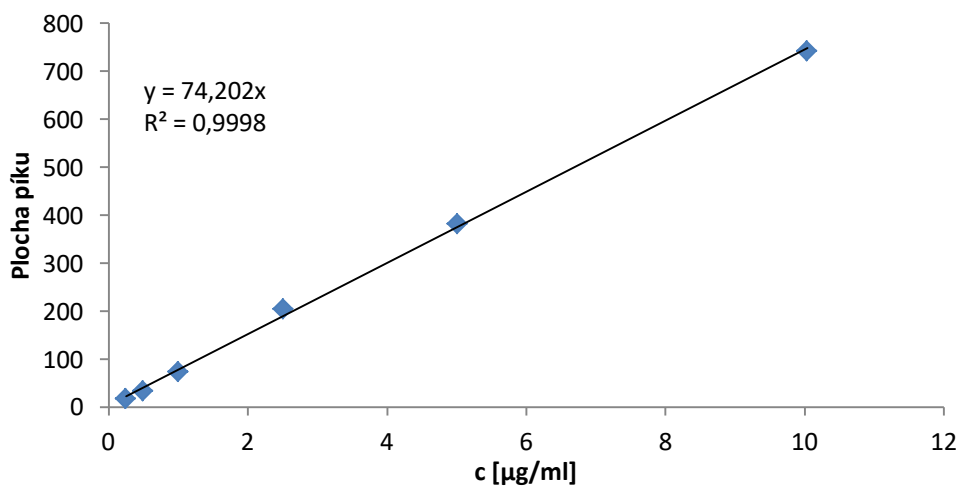
P 6 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny vanilové ($\lambda = 280$ nm)



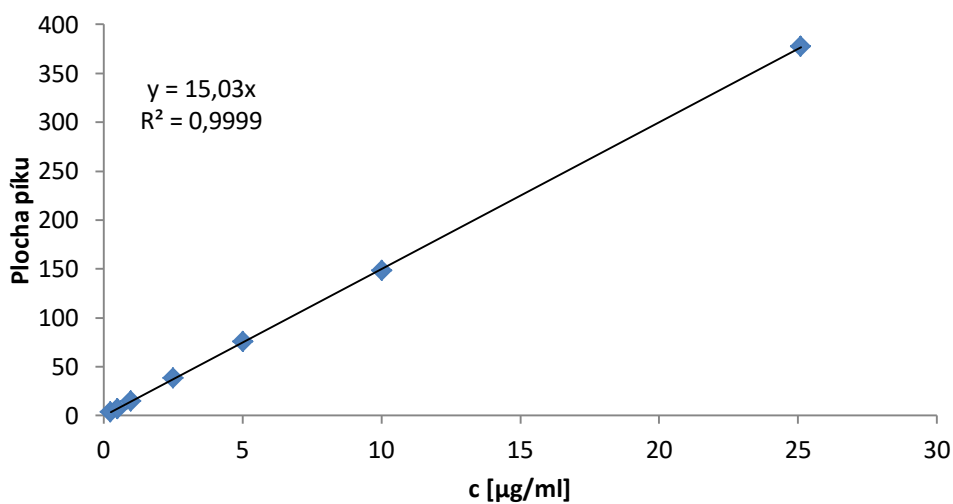
P 7 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny kávové ($\lambda = 280$ nm)



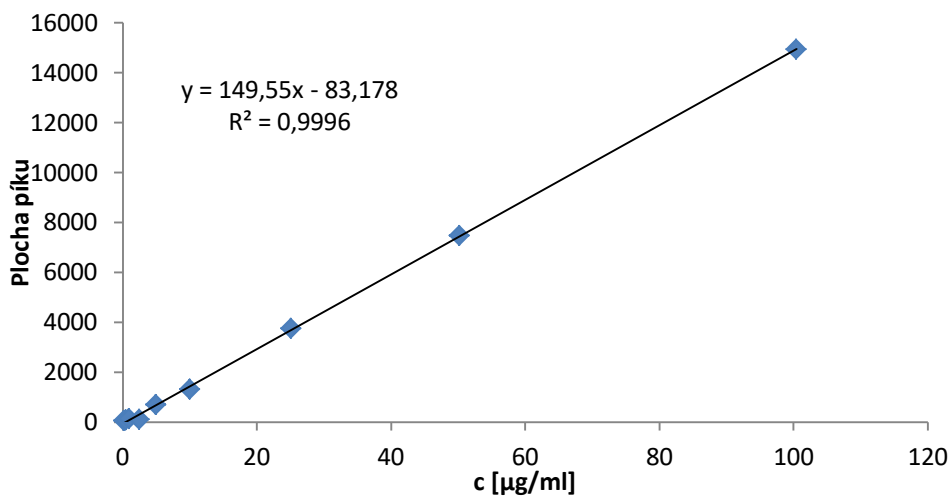
P 8 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny syringové ($\lambda = 280 \text{ nm}$)



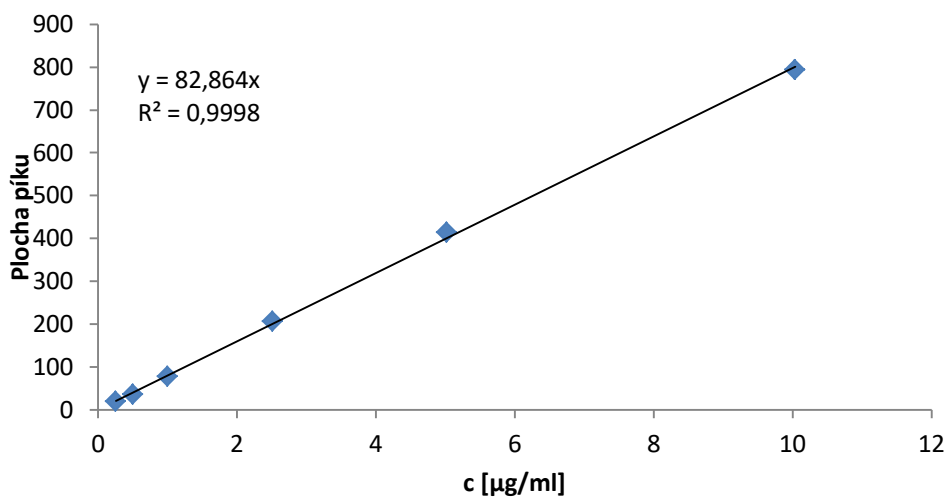
P 9 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace epikatechinu ($\lambda = 280 \text{ nm}$)



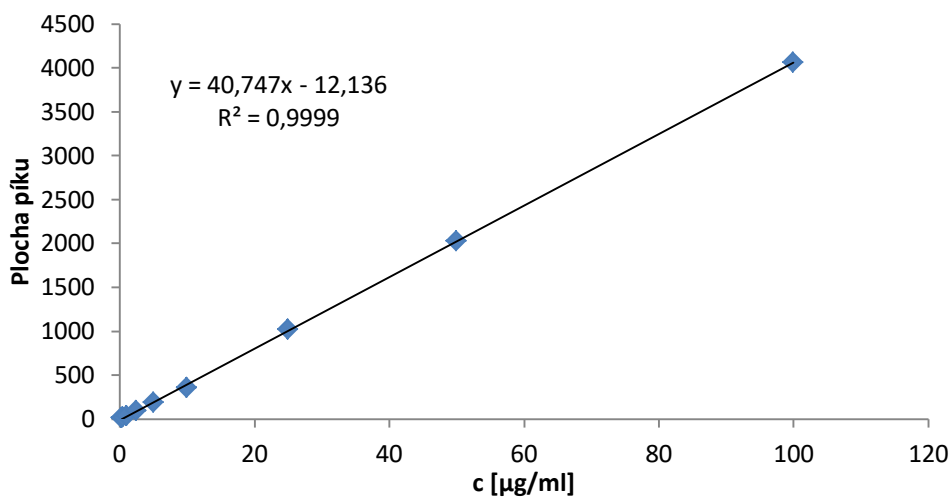
P 10 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny p-kumarové ($\lambda = 280 \text{ nm}$)



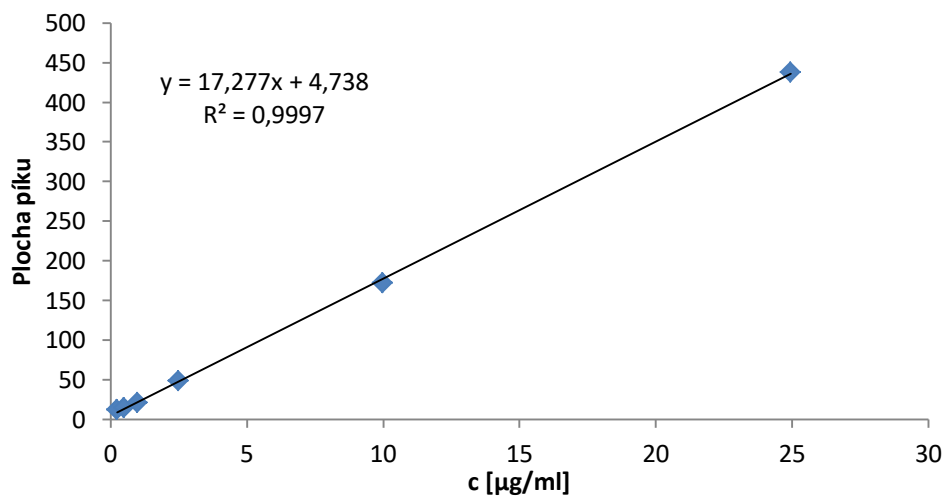
P 11 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny ferulové ($\lambda = 280 \text{ nm}$)



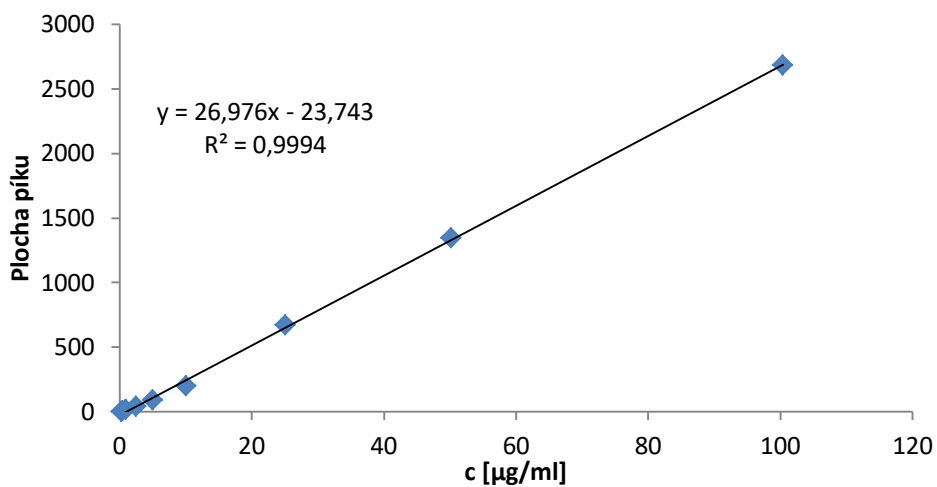
P 12 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kyseliny sinapové ($\lambda = 280 \text{ nm}$)



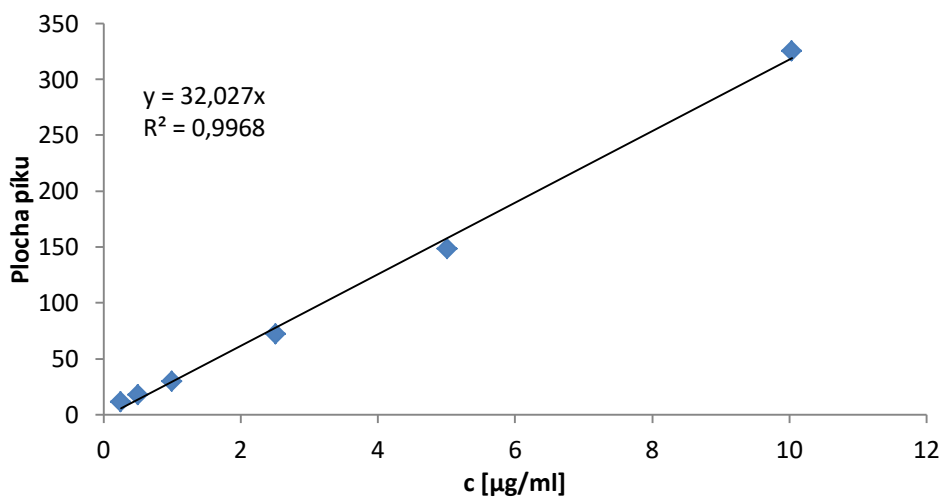
P 13 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace rutinu ($\lambda = 280 \text{ nm}$)



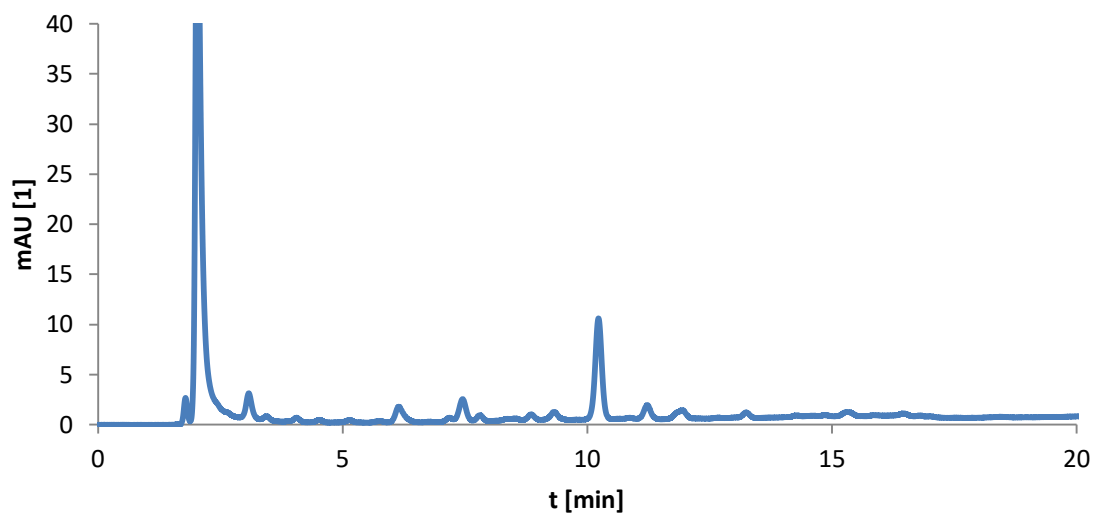
P 14 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace myricetinu ($\lambda = 280 \text{ nm}$)



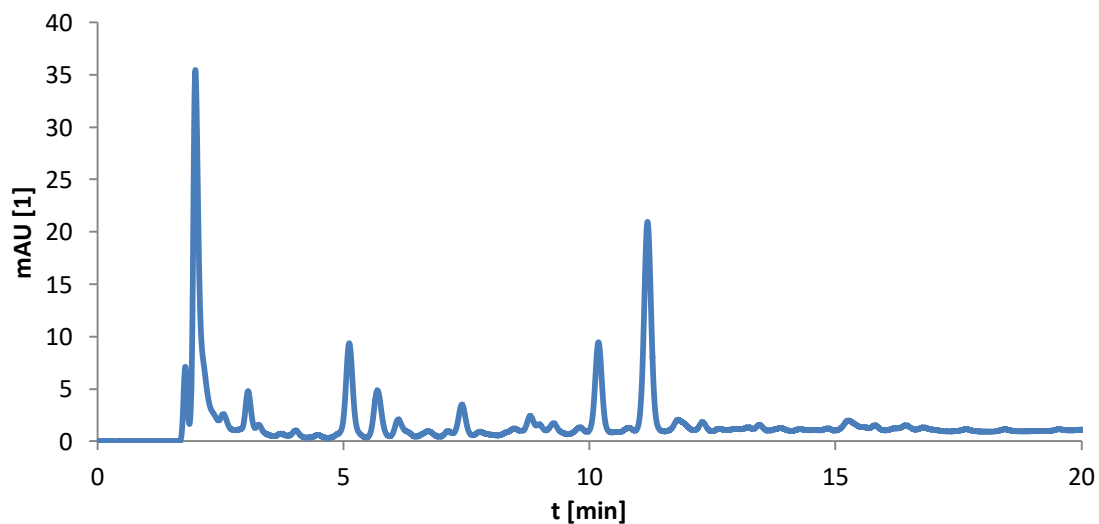
P 15 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace kvercetinu ($\lambda = 280 \text{ nm}$)



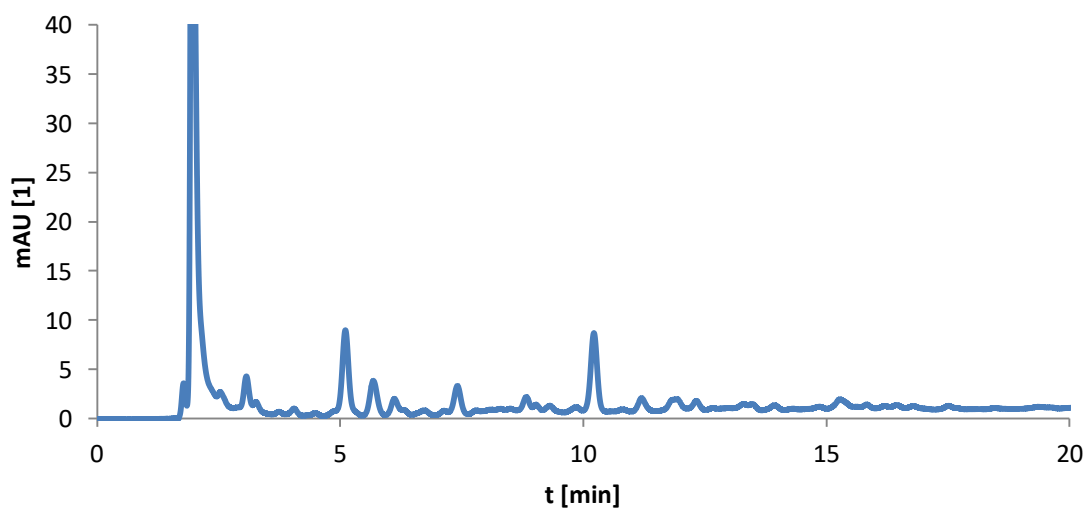
P 16 Chromatogram 2 hodinové hydrolýzy



P 17 Chromatogram 3 hodinové hydrolýzy



P 18 Chromatogram 4 hodinové hydrolýzy



P 19 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích čisté pohanky (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N = 4)

Látka	Fenolická látka	Pohanka [$\mu\text{g/g}$ vzorku]
1	Galová kys.	$18,23 \pm 1,66$
2	Protokatechová kys.	$1,53 \pm 0,68$
3	Katechin	$21,65 \pm 5,14$
4	Chlorogenová kys.	<LOD
5	Vanilová kys.	$4,81 \pm 1,21$
6	Káвовá kys.	<LOD
7	Syringová kys.	$6,53 \pm 0,97$
8	Epikatechin	$12,37 \pm 2,77$
9	p-kumarová kys.	$8,25 \pm 0,64$
10	Ferulová kys.	$6,41 \pm 1,18$
11	Sinapová kys.	$13,35 \pm 1,12$
12	Rutin	$14,68 \pm 2,52$
13	Myricetin	$6,84 \pm 0,39$
14	Kvercetin	$3,93 \pm 1,04$

P 20 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích raw sušenek sušených při 40 °C (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N = 4)

Látka	Fenolická látka	Lab. t. 40 °C [$\mu\text{g/g}$ vzorku]	Chlad. t. 40 °C [$\mu\text{g/g}$ vzorku]
1	Galová kys.	$32,38 \pm 0,59$	$38,65 \pm 0,50$
2	Protokatechová kys.	$502,22 \pm 14,98$	$622,22 \pm 45,20$
3	Katechin	$11,98 \pm 5,99$	<LOD
4	Chlorogenová kys.	$6,24 \pm 0,29$	$5,64 \pm 0,57$
5	Vanilová kys.	$17,46 \pm 0,65$	$9,96 \pm 2,97$
6	Káвовá kys.	$5,04 \pm 1,07$	$1,61 \pm 1,15$
7	Syringová kys.	$11,51 \pm 2,82$	$5,54 \pm 0,60$
8	Epikatechin	$0,00 \pm$	$0,00$
9	p-kumarová kys.	$10,81 \pm 0,85$	$7,64 \pm 0,77$
10	Ferulová kys.	$13,66 \pm 0,27$	$6,52 \pm 0,19$
11	Sinapová kys.	$14,37 \pm 1,49$	$10,53 \pm 1,83$
12	Rutin	$25,26 \pm 1,56$	$22,46 \pm 7,62$
13	Myricetin	$19,91 \pm 3,90$	$15,80 \pm 4,01$
14	Kvercetin	$11,33 \pm 1,47$	$5,61 \pm 0,95$

P 21 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích raw sušenek sušených při 50 °C (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N = 4)

Látka	Fenolická látka	Lab. t. 50 °C [μg/ g vzorku]	Chlad. t. 50 °C [μg/ g vzorku]
1	Galová kys.	18,59 ± 0,25	23,15 ± 0,98
2	Protokatechová kys.	11,62 ± 0,99	28,88 ± 5,78
3	Katechin	32,16 ± 10,98	31,54 ± 11,95
4	Chlorogenová kys.	<LOD	<LOD
5	Vanilová kys.	14,92 ± 1,71	24,37 ± 0,34
6	Kávová kys.	6,21 ± 0,39	19,75 ± 3,02
7	Syringová kys.	11,91 ± 0,59	19,25 ± 0,78
8	Epikatechin	34,63 ± 14,34	19,10 ± 19,00
9	p-kumarová kys.	13,44 ± 0,63	19,37 ± 1,87
10	Ferulová kys.	12,71 ± 1,36	23,00 ± 2,15
11	Sinapová kys.	15,35 ± 1,63	20,20 ± 2,61
12	Rutin	16,07 ± 5,54	35,24 ± 5,24
13	Myricetin	18,90 ± 2,52	25,10 ± 2,58
14	Kvercetin	2,79 ± 0,26	5,01 ± 0,24

P 22 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích raw sušenek sušených při 60 °C (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N = 4)

Látka	Fenolická látka	Lab. t. 60 °C [μg/ g vzorku]	Chlad. t. 60 °C [μg/ g vzorku]
1	Galová kys.	20,56 ± 0,60	20,79 ± 0,78
2	Protokatechová kys.	15,86 ± 1,76	15,85 ± 2,02
3	Katechin	37,91 ± 8,91	23,83 ± 1,71
4	Chlorogenová kys.	<LOD	<LOD
5	Vanilová kys.	20,97 ± 2,29	18,80 ± 1,61
6	Kávová kys.	20,92 ± 5,06	24,93 ± 0,81
7	Syringová kys.	17,92 ± 1,24	18,06 ± 1,82
8	Epikatechin	30,89 ± 6,92	22,58 ± 12,49
9	p-kumarová kys.	19,98 ± 1,46	22,16 ± 3,11
10	Ferulová kys.	12,74 ± 8,95	23,38 ± 2,60
11	Sinapová kys.	20,97 ± 1,81	26,24 ± 4,20
12	Rutin	30,54 ± 11,46	22,99 ± 8,04
13	Myricetin	27,71 ± 8,91	28,36 ± 10,04
14	Kvercetin	5,59 ± 3,82	4,90 ± 0,34

P 23 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích raw sušenek sušených při 70 °C (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N = 4)

Látka	Fenolická látka	Lab. t. 70 °C [μg/ g vzorku]	Chlad. t. 70 °C [μg/ g vzorku]
1	Galová kys.	25,40 ± 4,91	22,23 ± 2,50
2	Protokatechová kys.	27,27 ± 0,33	28,29 ± 1,06
3	Katechin	24,29 ± 2,51	26,66 ± 1,63
4	Chlorogenová kys.	<LOD	<LOD
5	Vanilová kys.	22,58 ± 1,57	21,17 ± 0,48
6	Kávová kys.	31,01 ± 8,96	21,22 ± 17,57
7	Syringová kys.	18,91 ± 0,37	18,40 ± 1,70
8	Epikatechin	15,18 ± 13,96	14,82 ± 9,91
9	p-kumarová kys.	21,58 ± 2,71	19,17 ± 4,21
10	Ferulová kys.	21,80 ± 5,43	23,34 ± 7,29
11	Sinapová kys.	28,93 ± 10,88	18,54 ± 5,83
12	Rutin	39,45 ± 14,34	31,57 ± 6,42
13	Myricetin	30,88 ± 8,46	25,48 ± 7,69
14	Kvercetin	8,78 ± 4,55	5,59 ± 0,56

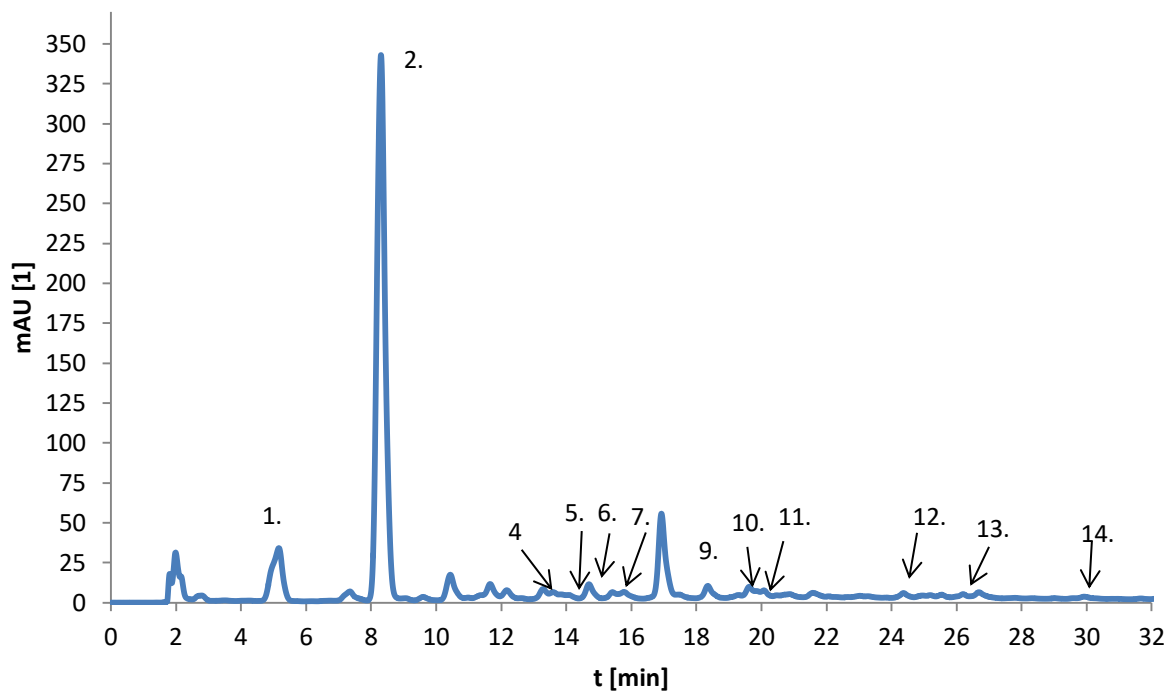
P 24 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích těsta raw sušenek (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N = 2)

Látka	Fenolická látka	Těsto 50 °C [μg/ g vzorku]	Těsto 60 °C [μg/ g vzorku]	Těsto 70 °C [μg/ g vzorku]
1	Galová kys.	11,26 ± 0,01	12,61 ± 0,03	5,43 ± 0,01
2	Protokatechová kys.	4,41 ± 0,02	7,00 ± 0,09	0,50 ± 0,01
3	Katechin	13,51 ± 0,06	33,98 ± 0,01	8,67 ± 0,06
4	Chlorogenová kys.	2,72 ± 0,03	<LOD	<LOD
5	Vanilová kys.	7,22 ± 0,02	11,60 ± 0,01	5,49 ± 0,03
6	Kávová kys.	<LOD	6,31 ± 0,02	3,46 ± 0,03
7	Syringová kys.	10,97 ± 0,02	10,91 ± 0,04	5,37 ± 0,10
8	Epikatechin	<LOD	18,82 ± 0,01	5,79 ± 0,00
9	p-kumarová kys.	7,02 ± 0,01	10,58 ± 0,00	4,76 ± 0,01
10	Ferulová kys.	7,14 ± 0,02	11,63 ± 0,02	3,14 ± 0,01
11	Sinapová kys.	7,06 ± 0,02	12,22 ± 0,03	3,60 ± 0,55
12	Rutin	12,48 ± 0,06	16,02 ± 0,06	1,67 ± 0,96
13	Myricetin	10,33 ± 0	14,03 ± 0,06	5,52 ± 0,36
14	Kvercetin	2,82 ± 0,69	1,54 ± 0,14	2,42 ± 0,03

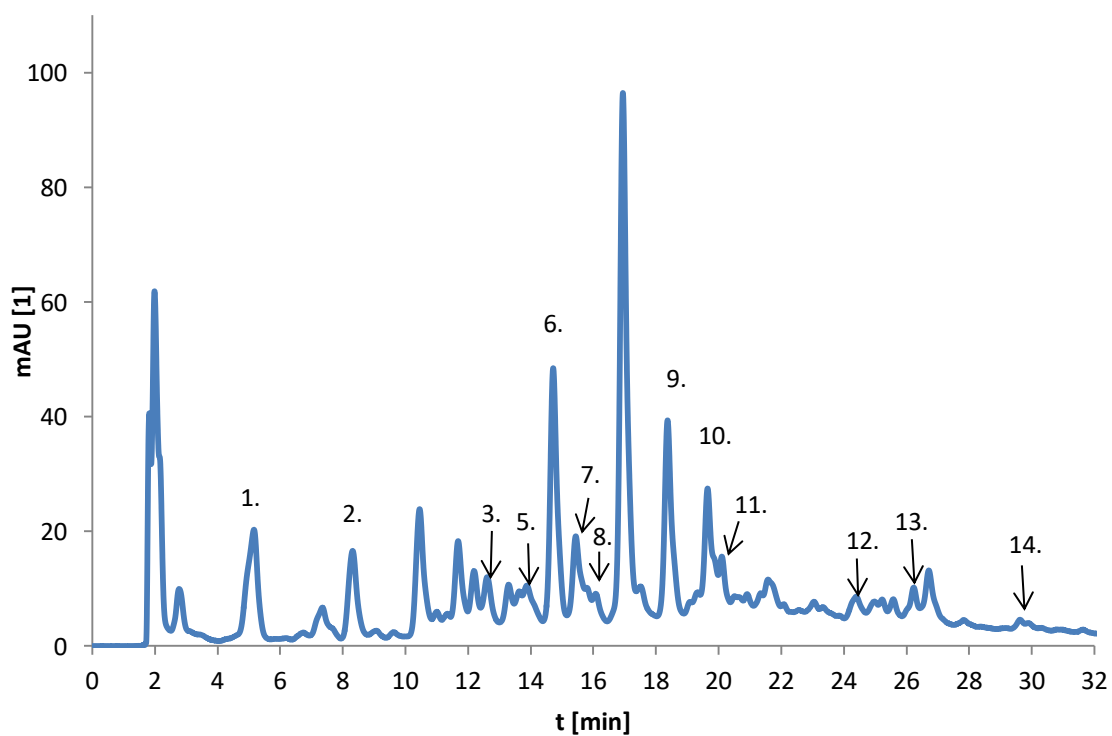
P 25 Naměřené hodnoty obsahu fenolických látek ve vzorcích pro opakovatelnost a reprodukovatelnost hydrolýzy (průměrná hodnota ± směrodatná odchylka, N = 2)

Látka	Fenolická látka	Vz.1 [μg/ g vzorku]	Vz.2 [μg/ g vzorku]	Vz.3 [μg/ g vzorku]	Vz.4 [μg/ g vzorku]
1	Galová kys.	21,86 ± 0,03	20,35 ± 0,05	20,07 ± 0,48	25,14 ± 0,05
2	Protokatechová kys.	186,36 ± 0,48	92,45 ± 86,17	212,53 ± 3,80	226,88 ± 0,22
3	Katechin	25,72 ± 0,18	13,44 ± 2,10	23,69 ± 3,92	18,41 ± 1,17
4	Chlorogenová kys.	4,77 ± 0,07	4,80 ± 0,01	3,69 ± 0,14	4,34 ± 0,00
5	Vanilová kys.	22,95 ± 0,08	16,39 ± 0,01	19,06 ± 1,56	16,76 ± 0,12
6	Káвовá kys.	9,65 ± 0,01	10,08 ± 0,04	8,42 ± 0,51	8,01 ± 0,14
7	Syringová kys.	8,89 ± 0,01	8,24 ± 0,13	10,81 ± 0,38	9,97 ± 0,12
8	Epikatechin	0,05 ± 0,05	11,52 ± 5,76	11,11 ± 11,11	7,85 ± 7,85
9	p-kumarová kys.	14,62 ± 0,00	14,52 ± 0,03	13,48 ± 0,48	13,61 ± 0,14
10	Ferulová kys.	11,10 ± 0,03	18,17 ± 0,11	17,01 ± 0,80	17,39 ± 0,35
11	Sinapová kys.	15,00 ± 0,01	15,76 ± 0,07	14,50 ± 0,76	16,10 ± 0,29
12	Rutin	28,64 ± 0,20	24,89 ± 0,34	32,14 ± 2,50	25,55 ± 1,90
13	Myricetin	28,83 ± 0,05	30,08 ± 0,36	24,33 ± 1,43	24,92 ± 1,24
14	Kvercetin	1,79 ± 0,18	11,62 ± 0,89	13,83 ± 1,49	3,93 ± 0,91

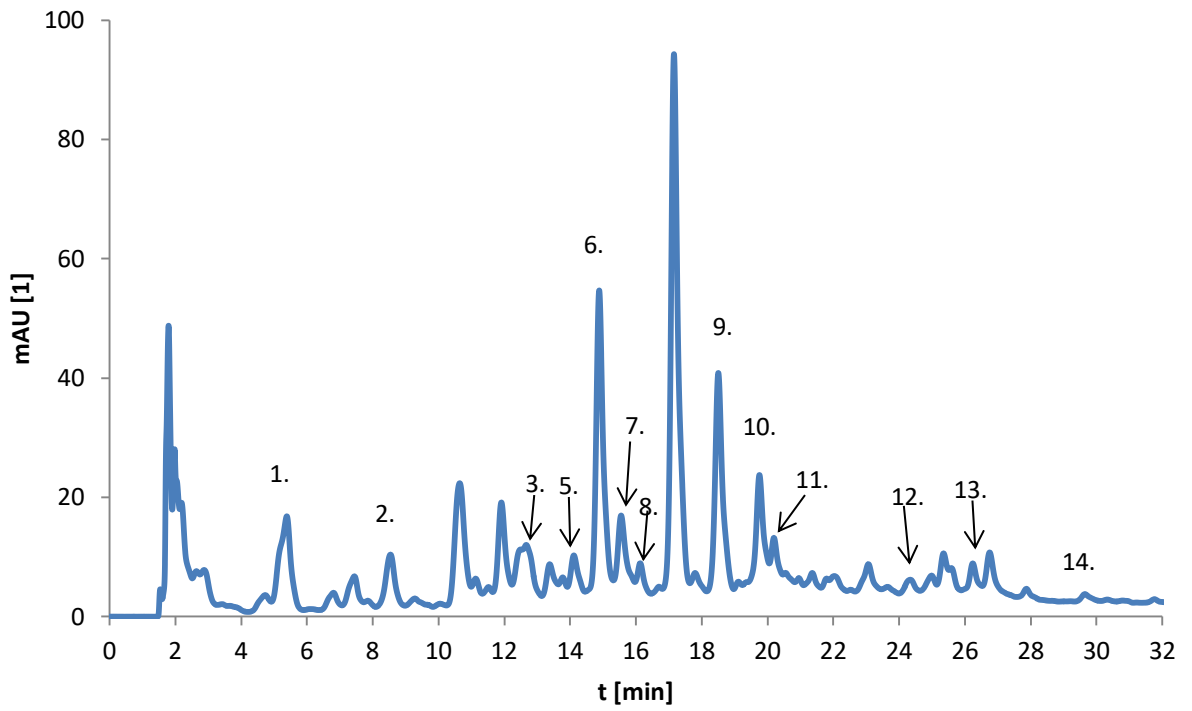
P 26 Chromatogram vzorku Chlad. t. 40 °C



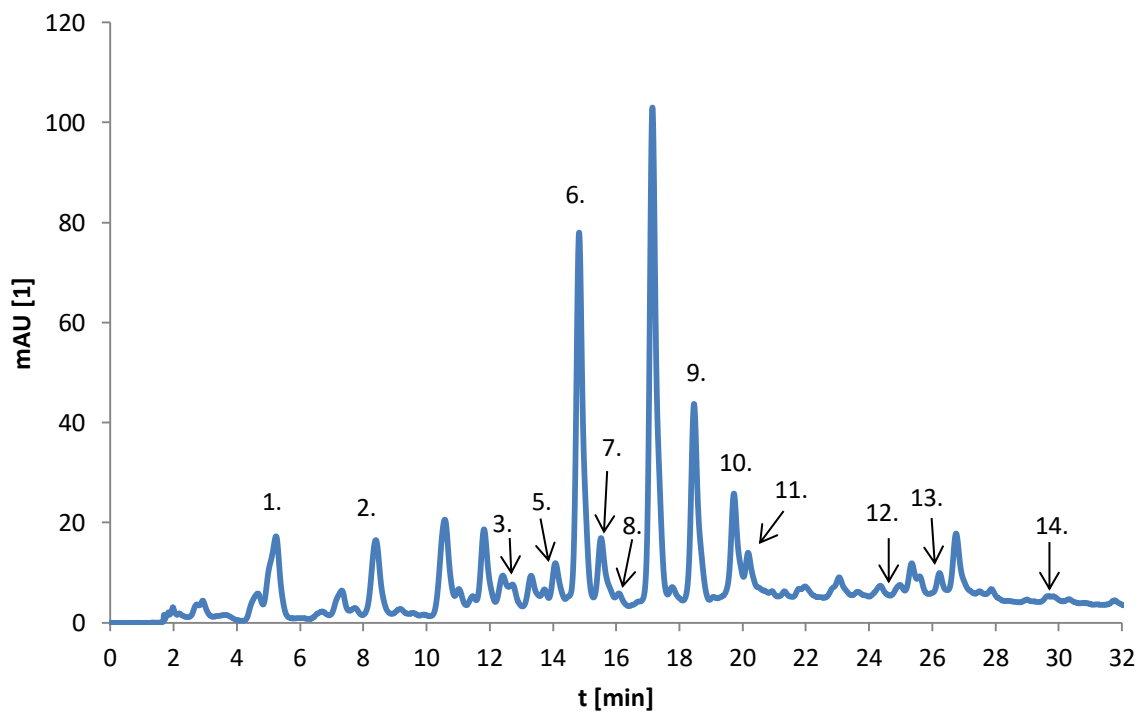
P 27 Chromatogram vzorku Chlad. t. 50 °C



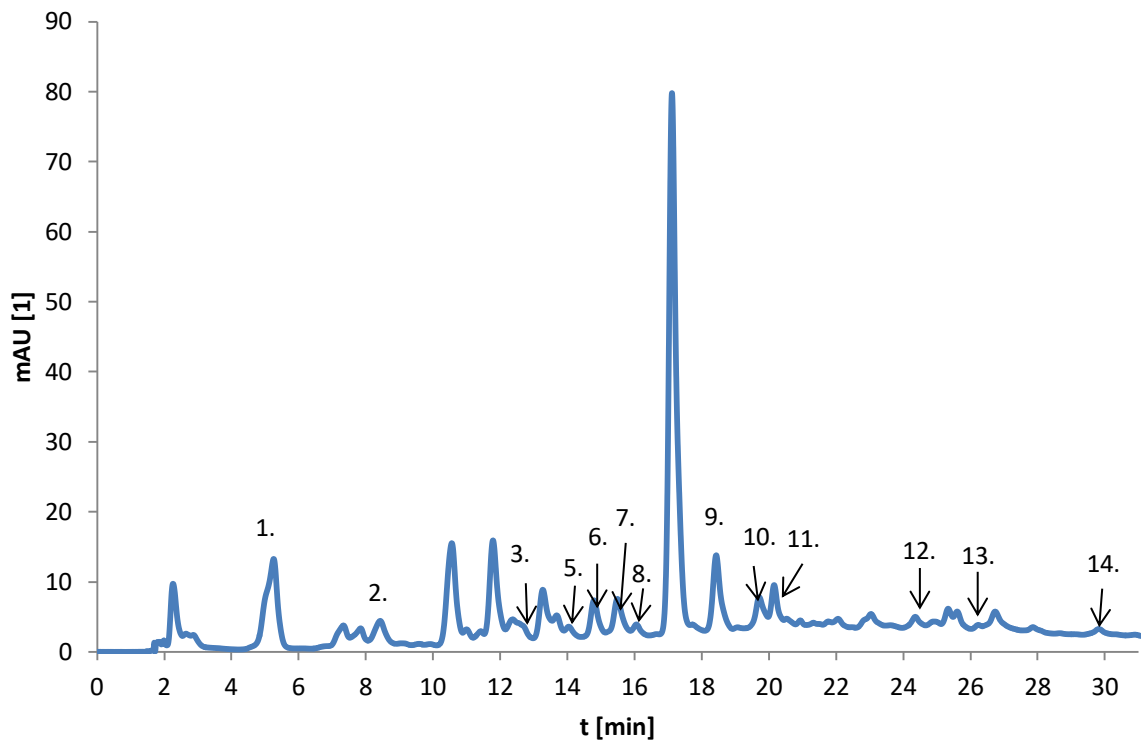
P 28 Chromatogram vzorku Lab. t. 60 °C



P 29 Chromatogram vzorku Lab. t. 70 °C



P 30 Chromatogram pohanka



P 31 Chromatogram těsto 60 °C

