

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza polyfenolických látek v superpotravinách IV.

Lenka Kuchařová

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Kuchařová**
Osobní číslo: **C16611**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Analýza polyfenolických látek v superpotravinách IV**
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 :

Tato práce navazuje na tři předchozí diplomové práce s touto tematikou, zaměřuje se na další představitele ze skupiny superpotravin.

1. V teoretické části diplomové práce charakterizujte pět superpotravin, vybraných pro tuto práci. Pro každou komoditu uveďte její charakteristiku, významné účinky na lidské zdraví, možnosti využití. Dále se zaměřte na analýzu biologicky aktivních látek v těchto superpotravinách, zejména látek polyfenolických.
2. Analyzujte superpotraviny popsané v teoretické části práce. Optimalizujte postup izolace polyfenolických látek ze vzorků a nalezněte vhodné podmínky chromatografické separace pro každý vzorek. K analýzám využijte kapalinový chromatograf vybavený elektrochemickým detektorem CoulArray. Stanovte také celkové množství polyfenolických látek a antioxidační aktivitu vzorků.
3. Všechny získané výsledky vyhodnoťte a příslušným způsobem komentujte. Dosažené výsledky porovnejte s doposud publikovanou literaturou.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Blanka Švecová, 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: 10.5. 2018

Lenka Kuchařová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala Ing. Blance Švecové, Ph.D. za zadání zajímavého tématu diplomové práce, za vedení v průběhu vypracování diplomové práce a za její cenné rady, připomínky a vstřícný přístup. Poděkování patří také Ing. Tomášovi Hájkovi, Ph.D. za praktické rady a technickou pomoc během měření na kapalinovém chromatografu.

Chtěla bych poděkovat také rodině za umožnění studia na této vysoké škole a za jejich podporu během studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá obsahem polyfenolových látek ve vybraných vzorcích superpotravin. Dále byl studován i vztah mezi obsahem polyfenolových látek a antioxidační aktivitou. V teoretické části jsou uvedeny charakteristiky superpotravin, jejich účinky na lidské zdraví, dále principy kapalinové chromatografie a extrakčních metod. V experimentální části byly polyfenolové látky identifikovány a kvantifikovány pomocí HPLC s detektorem CoulArray. Dále byl stanoven celkový obsah polyfenolových látek metodou dle Folin-Ciocalteu. Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí metod DPPH a ABTS. V závěru práce jsou získané výsledky diskutovány a jednotlivé superpotraviny jsou porovnány s publikovanou literaturou i mezi sebou na základě jejich antioxidační aktivity a obsahu polyfenolových látek.

KLÍČOVÁ SLOVA: Superpotravina, polyfenolické látky, antioxidační aktivita, granátové jablko, konopné semínko, červená řepa, skořice, česnek

TITLE

Analysis of Polyphenolic Compounds in Superfoods IV.

ANNOTATION

This diploma thesis deals with the content of polyphenols in selected samples of superfoods. The relation between the content of polyphenols and the antioxidant activity was also studied. The theoretical part is focused on the characteristics of superfoods, their effects on human health, further the principle of liquid chromatography and extraction methods. In the experimental section, polyphenols were identified and quantified by HPLC with CoulArray detector. In addition, the total amount of polyphenols was determined by the Folin-Ciocalteu method. Antioxidant activity was determined using the DPPH and ABTS methods. In the end of the thesis the results are discussed and the individual superfoods are compared with published literature and among each other on the basis of their antioxidant activity and the content of polyphenols.

KEYWORDS: Superfood, polyphenols, antioxidant activity, pomegranate, hemp seed, beetroot, cinnamon, garlic

Obsah:

ÚVOD	12
1. TEORETICKÁ ČÁST	13
1.1. Superpotravin	13
1.1.1. Skořice	14
1.1.2. Granátové jablko	15
1.1.3. Česnek	16
1.1.4. Konopné semínko	18
1.1.5. Červená řepa	19
1.2. Antioxidační aktivita	20
1.3. Fenolové látky	21
1.3.1. Flavonoidy	22
1.3.2. Fenolové kyseliny a jejich deriváty	23
1.3.3. Lignany, stilbeny a ostatní polyfenoly	23
1.4. Analýza polyfenolových látek	24
1.4.1. Stanovení celkového obsahu polyfenolů	24
1.4.2. Příprava vzorku před stanovením	24
1.4.3. Analýza polyfenolových látek pomocí kapalinové chromatografie	25
1.4.4. Elektrochemické detektory	25
1.5. Příklady analýz	27
1.5.1. Skořice	27
1.5.2. Granátové jablko	29
1.5.3. Česnek	30
1.5.4. Konopné semínko	32
1.5.5. Červená řepa	34
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
2.1. Přístroje a zařízení	36
2.1.1. Kapalinový chromatograf s detektorem CoulArray	36

2.1.2.	Kapalinový chromatograf s detektorem DAD.....	36
2.1.3.	Další zařízení	36
2.2.	Chemikálie a standardní látky.....	37
2.2.1.	Chemikálie.....	37
2.2.2.	Standardní látky	37
2.3.	Vzorky.....	37
2.4.	Pracovní postupy.....	38
2.4.1.	Úprava vzorků	38
2.4.2.	Chromatografická analýza.....	40
2.4.3.	Stanovení celkového obsahu fenolických látek.....	42
2.4.4.	Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH.....	42
2.4.5.	Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS	42
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	44
3.1.	Výsledky chromatografické analýzy	44
3.1.1.	Chromatografické a detekční charakteristiky standardů	44
3.1.2.	Meze detekce a stanovitelnosti, kalibrační závislosti.....	46
3.1.3.	Polyfenolové látky ve skořici	48
3.1.4.	Polyfenolové látky v granátovém jablku	54
3.1.5.	Polyfenolové látky v česneku.....	55
3.1.6.	Polyfenolové látky v konopném semínku	58
3.1.7.	Polyfenolové látky v červené řepě	59
3.2.	Celkový obsah polyfenolových látek ve vzorcích	62
3.3.	Stanovení antioxidační aktivity	63
4.	ZÁVĚR.....	66
5.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	67
6.	PŘÍLOHY	77

Seznam ilustrací

Obrázek 1: Ilustrační obrázek vybraných superpotravin	13
Obrázek 2: Ilustrační obrázek skořice	14
Obrázek 3: Ilustrační obrázek granátového jablka	15
Obrázek 4: Ilustrační obrázek česneku	16
Obrázek 5: Ilustrační obrázek konopného semínka	18
Obrázek 6: Ilustrační obrázek červená řepa	19
Obrázek 7: Kvercetin	23
Obrázek 8: Rutin	23
Obrázek 9: Kyselina chlorogenová	23
Obrázek 10: Kyselina ferulová	23
Obrázek 11: Trans-stilben	24
Obrázek 12: Resveratrol	24
Obrázek 13: Instrumentální uspořádání v HPLC	26
Obrázek 14: Porézní grafitová pracovní elektroda fritového typu	27
Obrázek 15: Chromatogram směsi standardních látek, systém HPLC-CoulArray	45
Obrázek 16: Analýza extraktu mleté skořice v 50% MeOH (extrakce pomocí ultrazvuku)	49
Obrázek 17: Chromatogram vodného extraktu mleté skořice (2x ředění)	53
Obrázek 18: Chromatogram analýzy šťávy z granátového jablka (10x ředění)	54
Obrázek 19: Analýza čerstvého česneku v 50% methanolu	56
Obrázek 20: Analýza vodného extraktu konopného semínka	58
Obrázek 21: Analýza vzorku šťávy z čerstvé řepy (5x naředěná)	60

Seznam tabulek

Tabulka 1: Gradientová eluce 1 pro analýzu skořice a čerstvého česneku	41
Tabulka 2: Gradientová eluce 2 pro analýzu sušeného česneku	41
Tabulka 3: Gradientová eluce 3 pro analýzu granátového jablka	41
Tabulka 4: Gradientová eluce 4 pro analýzu konopného semínka	41
Tabulka 5: Gradientová eluce 5 pro analýzu červené řepy	41
Tabulka 6: Chromatografické a detekční charakteristiky standardů	46
Tabulka 7: Kvantifikační parametry standardů	47
Tabulka 8: Obsah polyfenolových látek ve vzorku mleté skořice (ultrazvuk)	50
Tabulka 9: Obsah polyfenolových látek ve vzorku mleté skořice (Soxhlet)	50
Tabulka 10: Obsah polyfenolových látek ve vzorku celé skořice (ultrazvuk)	51
Tabulka 11: Obsah polyfenolových látek ve vzorku celé skořice (Soxhlet)	51
Tabulka 12: Koncentrace polyfenolových látek v mleté skořici - UV detekce	52
Tabulka 13: Obsah polyfenolových látek ve vzorku šťávy granátového jablka	55
Tabulka 14: Obsah polyfenolových látek ve vzorku čerstvého česneku	57
Tabulka 15: Obsah polyfenolových látek ve vzorku sušeného česneku	57
Tabulka 16: Obsah polyfenolových látek ve vzorku konopného semínka	59
Tabulka 17: Obsah polyfenolových látek ve vzorku šťávy z čerstvé řepy (5x naředěná)	60
Tabulka 18: Obsah polyfenolových látek ve vzorku šťávy z konz. řepy (5x naředěná)	61
Tabulka 19: Celkový obsah polyfenolů ve vzorcích superpotravin	62
Tabulka 20: Celkový obsah polyfenolů ve šťávách ze superpotravin	62
Tabulka 21: Antioxidační aktivita vzorků superpotravin stanovená metodou DPPH	64
Tabulka 22: Antioxidační aktivita šťáv ze superpotravin stanovená metodou DPPH	64
Tabulka 23: Antioxidační aktivita vzorků superpotravin stanovená metodou ABTS	65
Tabulka 24: Antioxidační aktivita šťáv ze superpotravin stanovená metodou ABTS	65

Seznam zkratek

ABTS	2,2'- azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
CE	Katechin ekvivalent
DAD	Detekce pomocí pole diod
DPPH	Difenylpikrylhydrazin
EDTAE	Ekvivalent kyseliny ethyldiamintetraoctové
ESI	Ionizace elektrosprejem
FAMEs	Methylestery mastných kyselin
FID	Plamenově ionizační detektor
FLD	Fluorescenční detekce
FRAP	Metoda stanovení schopnosti redukce železitých iontů
GAE	Ekvivalent kyseliny galové
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LDL	Nízkodenzitní lipoprotein
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrometrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NP-HPLC	HPLC v systému s normálními fázemi
OPA	O-ftalaldehyd
ORAC	Metoda eliminace kyslíkových radikálů
RP-HPLC	HPLC v systému s obrácenými fázemi
SPE	Extrakce tuhou fází
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
THC	Tetrahydrocannabiol
UAE	Extrakce s využitím ultrazvuku

ÚVOD

Zájem o zdravý životní styl a kvalitní a dostupné potraviny se v posledních letech stále zvyšuje. Velká pozornost je věnována také superpotravinám, což je souhrnný název pro potraviny s vysokým obsahem vitamínů, antioxidantů a výživových látek. Většina z této skupiny potravin má prokazatelný pozitivní účinek na lidské zdraví. Tyto pozitivní účinky jsou přisuzovány především obsaženým antioxidantům, které mohou zabránit vzniku volných radikálů v lidském těle, nebo je mohou převádět o méně reaktivních či nereaktivních forem. Volné radikály mohou škodit zdraví například narušováním buněčných struktur a dalšími negativními účinky. Většinu ze skupiny antioxidantů tvoří polyfenolové látky u kterých byly také prokázány jejich prospěšné účinky na lidské zdraví.

Celkové množství polyfenolových látek v potravinách je nejčastěji stanovováno metodou podle Folin-Ciocalteua. Ke stanovení polyfenolových látek je velmi často využíváno kapalinové chromatografie z různými typy detekce. Multikanálová elektrochemická detekce ve spojení s kapalinovou chromatografií je vysoce citlivá metoda, která po nalezení vhodných podmínek slouží k účinné separaci a stanovení elektroaktivních látek, tedy i antioxidantů.

Je známa souvislost mezi celkovým obsahem polyfenolových látek a antioxidační aktivitou. Antioxidační aktivita však nezávisí pouze na množství celkového obsahu polyfenolů, ale i na jiných faktorech. Mezi nejčastěji používané metody stanovení antioxidační aktivity patří metody DPPH, ABTS, FRAP a metoda ORAC.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Superpotraviny

Jako superpotraviny jsou označovány potraviny s velmi vysokým obsahem výživově bohatých a pro člověka prospěšných látek, jako jsou vitamíny, minerály, stopové prvky, čisté bílkoviny, zdravé tuky, enzymy a koenzymy, esenciální mastné kyseliny nebo antioxidanty [1].



Obrázek 1: Ilustrační obrázek vybraných superpotravin [2]

Superpotraviny jsou známy po tisíce let ve všech částech světa, již od dob starodávných civilizací. Vyživují tělo, mají pozitivní vliv na lidský organismus, mají schopnost zvyšovat energii, vitalitu, sílu, zvyšují produkci serotoninu, zlepšují sexuální aktivitu, podílí se na detoxikaci organismu. Pomáhají také vyživovat mozek, ledviny, plíce, srdce a játra, dále pak kosti, zuby, kůži, svaly nebo nehty. Konzumace superpotravin také pomáhá například i při rakovině, kardiovaskulárních nebo nervových onemocněních, artritidě, diabetu, žloutence, alergiích, astmatu, chronické únavě, depresích, při vysokém krevním tlaku, nespavosti, nebo při kožních onemocněních a celkově posilují imunitní systém [1,3].

Pojem superpotraviny zahrnuje celou řadu potravin. Mezi nejvýznamnější superpotraviny patří například acai, aloe vera, goji, chlorella, chia semínka, granátové jablko, konopná semínka, kakaové boby, rakytník řešetlákový, maca peruánská, panenský kokosový olej, kakaové boby, zelená káva, borůvky či červená řepa (Obr. 1) [1].

1.1.1. Skořice



Obrázek 2: Ilustrační obrázek skořice [4- 6]

Koření, včetně skořice, patří mezi přídatné látky, používané jako ochucovadla, barviva nebo konzervační látky po celém světě už po tisíce let a to zejména v Indii, Číně a mnoha dalších zemích jihovýchodní Asie. Skořice (*Cinnamomum Zeylanicum*) patří do botanické rodiny *Lauraceae*. Je to široce používané koření, jehož hlavním producentem je Čína, kde se skořice využívá mimo jiné také jako tradiční bylinné léčivo, stejně jako v dalších zemích, jako Vietnam, Srí Lanka, Madagaskar, Seychely nebo Indie [7-9].

Skořice (Obr. 2) se získává z usušené vnitřní kůry tropických stromů rodu *Cinnamomum*. V Americe a Evropě se můžeme setkat se dvěma druhy skořice - Ceylon a Kassia. Ceylonová skořice, známá také jako "pravá skořice", se získá z *Cinnamomum verum*, které se pěstuje na Srí Lance a v jižní Indii. Kassia skořice má několik původů. V jižní Číně a Barmě se pěstují čínská kassia (*Cinnamomum cassia Blume* a *Cinnamomum aromaticum Nees*). Ve Vietnamu se pěstuje další z kasií, Saigonová skořice (*Cinnamomum loureirii Nees*) a z Indonésie a Filipín pochází indonéská kassie (*Cinnamomum burmanini Blume*) [10].

Důležitými složkami skořicové kůry jsou silice, které obsahují velké množství terpenů a aromatických sloučenin. Dominantní složkou skořicových olejů je cinnamaldehyd, který je zodpovědný za štiplavou chuť a vůni skořice. Další významné látky obsažené ve skořici zahrnují kumarin, cinnamylalkohol, kyselinu skořicovou a eugenol [7,11].

V současné době je skořice široce používána nejen jako koření, ale nachází využití i v kosmetickém, farmaceutickém i chemickém průmyslu a má významnou ekonomickou hodnotu. U skořice byly prokázány vynikající protizánětlivé, antioxidační, protinádorové a antibakteriální vlastnosti. Díky svým účinkům se používá jako tradiční lék pro léčbu zažívacích problémů, stabilizuje hladinu krevního cukru, působí proti zánětům, podporuje chuť k jídlu, mírní zápach z úst, působí jako přírodní afrodiziakum a může být využita také jako konzervant. Denní konzumace skořice pomáhá čistit krev a prodlužuje život [7,11].

1.1.2. Granátové jablko



Obrázek 3: Ilustrační obrázek granátového jablka [12-14]

Granátové jablko (*Punica granatum*) (Obr. 3) patří do rodiny *Punicaceae* a pěstuje se v teplé klimatické oblasti jihovýchodní Asie, Středomoří, Americe a dalších částech světa. Je to velice prospěšná potravina pro lidské zdraví, protože obsahuje několik skupin látek, které jsou užitečné při snižování rizika kardiovaskulárních onemocnění a dalších chronických poruch. Ovoce, kůra i kořeny granátového jablka jsou běžně používány jako součást bylinných léků místními léčiteli v mnoha zemích. Dochucená kůra z granátového jablka byla používána v tradiční medicíně pro léčbu průjmu a úplavice. V Jemenu a v dalších zemích Arabského poloostrova jsou sušené slupky běžně používány k léčbě průjmu, bolesti žaludku a pro hojení ran. Ve 3. tisíciletí před naším letopočtem „předek medicíny“ Hippokrates podával šťávu z granátového jablka při horečkách, při onemocnění trávicího traktu, či při poruchách nervového systému. Pro svoje omlazující, antioxidační a stimulační účinky je granátové jablko hojně využíváno také v kosmetickém průmyslu. Kromě toho je granátové jablko bohaté na taniny (obsah až 25 %), které mají pozoruhodnou mikrobiologickou aktivitu. Tyto pozitivní vlastnosti a účinky jsou spojovány především s vysokou antioxidační schopností. Ta závisí na kultivaru, způsobu pěstování, klimatu a zralosti a souvisí i s obsahem polyfenolických látek. Mezi nejvíce zastoupené fenoly v granátovém jablku patří antokyany a katechiny [15-17].

Většinou je granátové jablko konzumováno v čerstvé podobě a zbylá část je zpracovávána na šťávy a vína. Šťáva se získává z červených zrníček, které jsou pod slupkou. Tato šťáva se stala populární také díky jejím biologickým vlastnostem, jako je antioxidační aktivita nebo protinádorová funkce. Některé klinické studie naznačují, že šťáva z granátového jablka zlepšuje parametry krve, jako je hladina cholesterolu, může být také užitečná v boji proti srdečním onemocněním, zlepšuje kvalitu spermií a erektilní dysfunkce u mužů. Byly prokázány chemopreventivní, chemoterapeutické, antiaterosklerotické a protizánětlivé účinky této šťávy. Je důležitým zdrojem anthokyanů 3-glykosidů a 3,5-diglukosidů delfinidinu,

kyanidinu a pelargonidinu. Bylo také prokázáno, že šťáva obsahuje více antioxidantů než ostatní ovoce a ovocné šťávy [15,18-20].

Kůra granátového jablka tvoří přibližně 40% celého ovoce a je vedlejším produktem při výrobě džusu z granátového jablka. Tato kůra má antioxidační, antibakteriální a protizánětlivé vlastnosti. Díky obsaženým taninům vykazuje kůra antimikrobiální aktivitu proti patogenním bakteriím. Tyto přínosy pro zdraví jsou opět přičítány polyfenolovým sloučeninám. Mezi polyfenoly obsažené v kůře patří například punikalagin A, punikalagin B, kyseliny galová, ellagová, chlorogenová, kávová, dále také katechin, epikatechin, rutin nebo kvercetin [17,18].

1.1.3. Česnek



Obrázek 4: Ilustrační obrázek česneku [21-23]

Česnek (*Allium sativum* L.), plodina známá především svou typickou chutí a vůní, je konzumován po celém světě (Obr. 4). Je to jedna z neznámějších léčivých rostlin, patřící mezi nejstarší kultivované rostliny. Pěstuje se již od starověku, používá se jako koření a dochucovadlo. Je považován za jednu z nejlepších potravin zabraňujících nemocem, a proto se používá také jako lék. Česnek má široké pole terapeutických účinků, mezi které se řadí například jeho hepatoprotektivní, antitrombotická, protizánětlivá, antisklerotická, antialergenní nebo antihypertenzní aktivita. Studie prokázaly, že česnek může být použit jako bezpečný alternativní lék pro léčbu hypertenze pro pacienty, kteří nemohou užívat klasické léky proti hypertenzi. Dále má antioxidační, antikarcinogenní, antimutagenní, antiastmatické a antimikrobiální účinky. Díky vysoké antimikrobiální aktivitě, může být česnek použit i jako přírodní konzervační látka [24-29].

Bylo prokázáno, že česnek inhibuje růst gram pozitivních i gram negativních kyselinotvorných bakterií a tvorbu toxinů. Bakterie, proti nimž je česnek účinný jsou například *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium* a *Clostridium*. Česnekové výtažky působí baktericidně vůči

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrinus*, *Porphyromonas gingivalis* a *Prevotella intermedia* (gram-pozitivní bakterie), což jsou hlavní bakterie zodpovědné za zubní kaz. Česnek má také vysokou antivirovou aktivitu. Působí proti herpes simplex viru typu 1 a 2, viru chřipky A a B, proti lidskému cytomegaloviru, viru vezikulární stomatitidy, rhinoviru, viru lidské imunodeficiency (Human Immunodeficiency Virus, HIV), proti virové pneumonii a rotaviru. Při otravě těžkými kovy působí česnek jako antidotum a posiluje imunitní systém [30-31].

Některé studie také naznačují, že česnek může sloužit jako prevence před poškozením imunity různými činiteli jako je chemoterapie, UV záření a psychologický nebo fyzický stres [31].

Svémi účinky pomáhá česnek předcházet nemocem jako je rakovina, koronární onemocnění srdce, hypercholesterolemie, diabetes 2. typu, hypertenze, katarakta (šedý zákal) a poruchy zažívacího traktu nebo obezita [25,32-34].

Česnek byl jako lék používán již od starověku. Během prvních Olympijských her v Řecku bylo požití česneku před závodem zakázáno, česnek byl totiž považován za stimulant. V Indii je česnek používán po staletí jako součást antiseptického mléka pro omytí ran a vředů. V Číně se čaj z česneku doporučuje při horečkách, bolestech hlavy a úplavici [31,35].

Používání česneku jako protinádorového přípravku začíná již v padesátých letech 20. století, kdy Weisberger a Pensky (1958) na studiích in vitro a in vivo ukázali, že thiosulfínátové extrakty z česneku inhibují růst nádorových buněk. Studie uvádějí, že česnek snižuje riziko sarkomu a karcinomu v různých tkáních a orgánech, jako je žaludek, tlusté střevo, jícen, prostata, močový měchýř, játra, plíce, kůže a mozek. Byly provedeny také studie zaměřené na antimutagenní aktivitu, kde bylo dokázáno, že jisté sloučeniny síry obsažené v česneku, mají účinek na DNA, brání mutacím a tím brání i zahájení karcinogeneze [31].

Za všechny tyto vlastnosti česneku jsou zodpovědné především těkavé látky obsahující síru, zejména thiosulfínáty. Biologicky nejaktivnější látkou česneku je allicin (diallylthiosulfínát). V česneku je obsažena i spousta dalších prospěšných látek, například k antimikrobiální aktivitě česneku mohou, kromě sirných sloučenin, přispívat také některé bílkoviny, saponiny a fenolické sloučeniny. Flavonoly se překvapivě v česneku téměř nevyskytují [24,31,34-36].

Mezi další látky obsažené v česneku patří steroidní glykosidy, lektiny, prostaglandiny, fruktan, pektin, adenosin, vitamíny B₁, B₂, B₆, C a E, biotin, kyselina nikotinová, mastné kyseliny, glykolipidy, fosfolipidy a esenciální aminokyseliny [30].

Česnek sice obsahuje velké množství prospěšných látek, avšak některé studie dokazují, že tepelné zpracování česneku vede k degradaci obsažených bioaktivních sloučenin, zejména polyfenolových látek a snižuje se i jeho antioxidační aktivita [33].

1.1.4. Konopné semínko



Obrázek 5: Ilustrační obrázek konopného semínka [37- 39]

Konopí (*Cannabis sativa*) patří do rodu morušovitých. Tento rod je známý svou genetickou komplexností, která mu pomáhá přežít téměř ve všech klimatických podmínkách na zemi. Konopí je houževnatá rostlina původem ze střední Asie, produkující semena, která jsou považována za jednu z nejvýznamnějších, nejzdravějších a nejprospěšnějších potravin ze skupiny superpotravin [1,40-41].

Konopná semínka (Obr. 5) obsahují hodně bílkovin, nenasycených mastných kyselin (omega 3), minerálů (hořčík, železo, fosfor, draslík, vápník, zinek), vitamínů (E, B₁, B₂) a vlákniny. Poměr tuků, bílkovin a sacharidů v konopném semínku je 10:1:1. Je zdrojem kompletních bílkovin (bílkoviny obsahující všechny esenciální aminokyseliny), čímž podporuje růst svalové hmoty. Díky vysokému obsahu vlákniny jsou konopná semínka vhodná k použití i jako krmivo pro hospodářská zvířata. Olej ze semínek obsahuje největší množství esenciálních mastných kyselin ve srovnání s ostatními semínky, s ideálním poměrem omega 3 a omega 6 nasycených mastných kyselin (3:1). Díky vysokému obsahu kyseliny γ -linolenové v konopném oleji je tento olej ideální složkou k výrobě kosmetiky, mýdel, lehkých tělových olejů a krémů. Další významnou složkou konopného oleje je tokoferol, který má výrazné antioxidační vlastnosti, nebo fytosteroly [40-43].

Semínka obsahují přes 20 stopových prvků. Díky vysokému obsahu esenciálních mastných kyselin a bílkovin mohou sloužit jako vhodná alternativa pro vegany a lidi, kteří nekonzumují ryby. Kromě toho jsou konopná semínka zdrojem lecitinu, který podporuje funkci mozku, tetrahydrocannabinolu (THC), který může pomáhat při chronických bolestech a nevolnostech pacientům s rakovinou, nebo kyseliny γ -linoleové, která pomáhá při zánětech a vyrovnává hladinu hormonů [44-45].

Kromě vysoké nutriční hodnoty konopného semínka byly prokázány i jeho pozitivní přínosy pro zdraví. Snižuje hladinu cholesterolu v krvi a vysoký krevní tlak, podporuje mozkové funkce a obsahuje velké množství antioxidantů, které se podílí na prevenci rakoviny a srdečních onemocnění. Je vhodné pro vegany, sportovce nebo pro lidi trpící celiakií, protože neobsahuje lepek [40,45-46].

1.1.5. Červená řepa



Obrázek 6: Ilustrační obrázek červená řepa [47-49]

Červená řepa (Obr. 6) (*Beta vulgaris subsp. vulgaris (conditiva)*) je další potravina řadící se do skupiny superpotravin. Na rozdíl od poddruhu cukrové řepy (*Beta vulgaris subsp. vulgaris (altissima)*) má jen poloviční obsah cukru. Právě proto se červená řepa pěstuje především za účelem konzumace a ne výroby cukru. Dominantním cukrem v červené řepě je sacharóza a v malých množstvích jsou obsaženy i glukóza a fruktóza [50-51].

Červená řepa je bohatým zdrojem antioxidantů a její konzumace může přispět k ochraně před nemocemi spojenými s věkem a stárnutím. Dále může konzumace červené řepy sloužit jako prevence proti onemocněním jako je rakovina nebo kardiovaskulární onemocnění. Červená řepa obsahuje i další látky důležité pro lidské zdraví jako je draslík, hořčík, kyselina listová, železo, zinek, vápník, fosfor, sodík, niacin, biotin, B6 nebo rozpustná vláknina [52,53].

Intenzivně červená barva červené řepy je způsobena především vysokým obsahem přírodních pigmentů betalainů. Betalainy jsou fenolové sekundární metabolity rostlin. Používají se jako přírodní barviva v potravinářském průmyslu, mají antioxidantní, protizánětlivé a chemopreventivní účinky a snižují riziko vzniku rakoviny. Betalainy se dělí do dvou skupin, na červenofialové betacyaniny a žlutooranžové betaxantiny. Stejně jako ostatní přírodní pigmenty jsou betalainy velmi citlivé na působení tepla, světla, enzymů a kyslíku. Proto se při jejich analýze doporučují techniky neteplotního zpracování k zachování výživné hodnoty a barvy produktů [50-51,54].

Červená řepa je také bohatým zdrojem polyfenolových sloučenin, především fenolových kyselin. Fenolové kyseliny jsou silné antioxidanty. Bylo prokázáno, že vykazují protikarcinogenní, protizánětlivé, antibakteriální a antivirové účinky. Posilují také imunitní systém a podporují krevní oběh. Z fenolových kyselin se v červené řepě vyskytuje především kyselina 4-hydroxybenzoová následovaná kyselinou skořicovou, vanilovou, chlorogenovou, transferulovou a kávovou. Ve stopových množstvích se vyskytují i kyselina anisová a kumarová [52-53].

Sportovci, zvláště ti, kteří se zabývají vytrvalostními sporty, jsou hlavní cílovou skupinou různých výrobků z červené řepy, které jsou v současné době na trhu. Tyto komerční produkty, a to jak šťávy, tak prášky, jsou inzerovány jako povolené výživové doplňky zvyšující výkonnost. Aktivní složkou v těchto výrobcích je anorganický dusičnan (NO_3), který je redukován na oxid dusnatý (NO). Klinické studie naznačují pozitivní účinky zvýšené hladiny oxidu dusnatého na svalovou účinnost a odolnost proti únavě. U sportovců dochází ke zlepšení výkonů při vytrvalostních testech. Dále bylo zjištěno, že požívání dusičnanů snížilo krevní tlak v klidu a tím pádem dochází i ke snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění. Existují však zprávy o tom, že vysoké hodnoty oxidu dusnatého korelují s depresivními stavy, které je třeba vzít v úvahu při konzumaci nadměrného množství produktů z červené řepy. Navíc nedávné studie naznačují, že požití dusičnanů a dusitanů vede ke zvýšené endogenní nitrozaci, která může vést k tvorbě karcinogenních metabolitů [51].

1.2. Antioxidační aktivita

V lidském těle mohou vznikat volné radikály, které mají řadu biologických funkcí. V důsledku přítomnosti volných elektronů mohou poškozovat buněčné struktury, což může vést k poškození celých tkání nebo orgánů. Reparativní mechanismy organismu nedokáží samy o sobě eliminovat toto poškození biomolekul, proto významnou roli při ochraně před volnými radikály hraje prevence, tedy redukce příčin jejich vzniku. Volné radikály mohou být neutralizovány prostřednictvím antioxidantů, které činí volné radikály méně škodlivými. Antioxidanty mohou rychle ztratit elektron, aby uvolnily místo pro volný radikál a vytvořily s ním pár, čímž eliminují jeho negativní účinek. Mohou se vyskytovat přirozeně u rostlin, zvířat a mikroorganismů nebo mohou být syntetizovány chemickými prostředky. V poslední době se velký zájem přikládá přírodním antioxidantům, zejména polyfenolovým sloučeninám. Celkový denní příjem polyfenolů z různých zdrojů byl odhadnut na 1 g a je tedy vyšší než příjem antioxidačních vitaminů [55-58].

Vyhodnocení celkového antioxidačního potenciálu je však obtížné, protože rostliny obsahují dva hlavní typy antioxidantů, polární (např. fenolové látky) a nepolární (např. vitamín E) a neexistuje žádná metoda vhodná pro vyhodnocení obou typů. K vyhodnocení antioxidační aktivity se tedy doporučují vždy alespoň 2 metody, nejčastěji ABTS a DPPH [59].

Metoda ABTS je založena na eliminaci radikálů. Je to jedna z nejpoužívanějších metod, při které se měří schopnost antioxidantů zachytit stabilní radikálový kation ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Výsledky se vyjadřují jako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), protože výsledky jsou srovnávány s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina). Zhášení radikálu antioxidanty, které se chovají jako donory vodíku, se sleduje spektrofotometricky (nejčastěji 734 nm) [55,56].

Další často používanou metodou založenou opět na eliminaci radikálů, je metoda DPPH. Tato metoda spočívá v reakci testované látky se stabilním radikálem difenylpikrylhydrazylem – DPPH. Při reakci dochází k redukci radikálu za vzniku DPPH-H (difenylpikrylhydrazin). Reakce je nejčastěji sledována spektrofotometricky. Pokles absorbance při 517 nm se měří buď po uplynutí určitého konstantního času, nebo se pracuje v kinetickém režimu. Metoda je velmi citlivá a vyžaduje jen malé množství vzorku [55,59].

Mezi další metody stanovení antioxidační aktivity patří například metoda ORAC, která je založena na eliminaci kyslíkových radikálů, nebo metody založené na hodnocení redoxních vlastností látek (metody chemické – FRAP, nebo metody elektrochemické - HPLC metoda s elektrochemickou detekcí) a spousta dalších [55,59].

1.3. Fenolové látky

Fenolové sloučeniny jsou sekundární rostlinné metabolity, potřebné pro normální růst a vývoj rostlin. Jsou také považovány za součást obranných mechanismů v rostlinách. Ve své struktuře obsahují jeden nebo více aromatických kruhů s jednou nebo více připojenými hydroxylovými skupinami. Prvním členem této třídy je fenol (C₆H₅OH), někdy také nazývaný jako kyselina karbolová. Všechny další látky jsou známé jako deriváty fenolu. Mohou se vyskytovat volné nebo vázané. Vázané fenoly jsou napojeny na strukturní složky buněčné stěny, jako je celulóza, lignin a proteiny. Mají antikarcinogenní, hepatoprotektivní, protizánětlivé, antioxidační, antivirové a antialergické účinky. Slouží jako ochrana rostlin proti nepříznivým faktorům, jako je sucho, UV záření nebo infekce. Jejich silný antioxidační

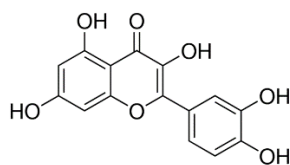
účinek je dán především schopností vázat těžké kovy do chelátů. Dále mají schopnost snižovat tvorbu volných radikálů a jejich likvidaci [57-65].

Antioxidační aktivita fenolových sloučenin závisí na struktuře, zejména počtu a polohách hydroxylových skupin a povaze substitucí na aromatických kruzích. Pokud má fenolová sloučenina jednu nebo více hydroxylových skupin navázaných na aromatickém kruhu, jedná se o sloučeninu polyfenolovou. Doposud je známo více než 8 000 přirozeně se vyskytujících polyfenolů. V posledních letech získaly polyfenoly velkou pozornost díky různorodosti jejich biologických funkcí. Podle epidemiologických studií souvisí spotřeba ovoce a zeleniny s vysokým obsahem fenolů se sníženým výskytem kardio- a cerebrovaskulárních onemocnění, s nižším rizikem diabetu a s nižší úmrtností na rakovinu [17,19,57,58,66].

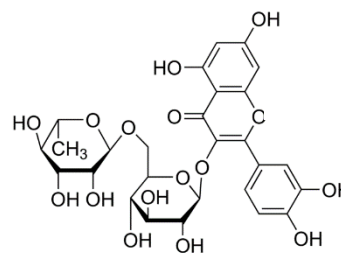
Na celkovém příjmu polyfenolů v potravě se podílí nejvíce flavonoidy a to ze dvou třetin, zhruba z jedné třetiny se podílejí fenolové kyseliny a miniaturní podíl mají ostatní polyfenoly, jako např. lignany nebo stilbeny [67].

1.3.1. Flavonoidy

Flavonoidy jsou přírodní látky přítomné v naší stravě. Jsou známy svou rozmanitou biologickou aktivitou a jsou považovány za silnější antioxidanty než vitamíny C a E. Kromě jejich antikarcinogenních, antioxidačních nebo protizánětlivých účinků, byl prokázán také vztah flavonoidů s nižší úmrtností na koronární srdeční onemocnění a také s nižším výskytem infarktu myokardu. Podle své molekulární struktury se flavonoidy rozdělují do několika chemických tříd, jako jsou flavanoidy, flavony, flavanony, isoflavony, isoflavany, pterokarpány, kumestány, antokyanidiny, flavanoly a flavonoly. Ze skupiny flavanoidů se v potravinách nejčastěji vyskytují flavan-3-oly (neboli katechiny), které hrají důležitou roli při prevenci některých onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění a určité formy rakoviny. Bylo prokázáno, že mají antioxidační vlastnosti, podílí se na likvidaci volných radikálů, inhibují iniciaci nádoru a mají antibakteriální vlastnosti. Katechiny jsou obsaženy především v čaji, ovoci a čokoládě. Mezi další významné flavonoidy patří například kvercetin (Obr. 7) a rutin (Obr. 8), které patří k nejčastěji studovaným. Anthokyany jsou barevné pigmenty, přispívající k červené, modré nebo fialové barvě mnoha druhů ovoce nebo červeného vína a jsou také dobře známé svou antioxidační aktivitou. Isoflavony se řadí mezi fytoestrogeny a vyskytují se především v sóji [28,67-70].



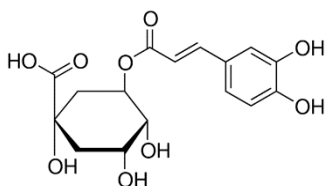
Obrázek 7: Kvercetin [71]



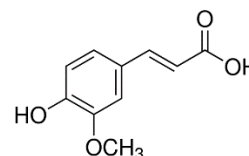
Obrázek 8: Rutin [71]

1.3.2. Fenolové kyseliny a jejich deriváty

Fenolové kyseliny a jejich sekundární metabolity jsou v popředí zájmu zejména kvůli jejich potenciálním ochranným rolím v oblasti lidského zdraví. Fenolové kyseliny jsou známy svou schopností inhibovat oxidaci LDL cholesterolu a blokovat singletový kyslík nebo chelátové prooxidační kovy. Patří mezi ně například kyselina skořicová, benzoová a jejich deriváty. V rostlinách se nejčastěji nachází ve formě esterů. Nejběžnější a nerozšířenější z fenolových kyselin je kyselina chlorogenová (Obr. 9), která se vyskytuje ve vysokém množství v kávě (50-150 mg/šálek kávy), dále v bramborách a dalších druzích ovoce a zeleniny. Kyselina ferulová (Obr. 10) a její dehydrodimerové deriváty jsou hlavními fenolickými sloučeninami v obilovinách, kde se vyskytují také ve formě esterů. Kyselina ferulová je mimo jiné také součástí vlákniny [64,67,72-73].



Obrázek 9: Kyselina chlorogenová [71]



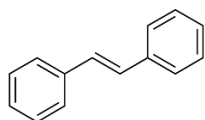
Obrázek 10: Kyselina ferulová [71]

1.3.3. Lignany, stilbeny a ostatní polyfenoly

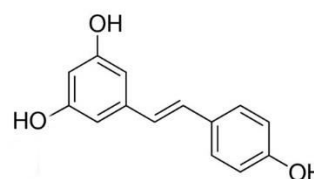
Lignany jsou skupina jednoduchých difenolů. V tělech rostlin patří k nejrozšířenějším metabolitům, které zde fungují jako chemická ochrana rostlin před působením hmyzu, mikrobiálními patogeny, nebo i proti působení jiných rostlin. Dále chrání buňky před účinky škodlivých volných radikálů a účastní se kontroly růstu rostliny. Mohou se chovat jako fytoestrogeny nebo antioxidanty. V potravě se nacházejí především v celozrnných výrobcích z obilovin a ve lněném oleji, dále v různých semenech, rýži, luštěninách, ořechách a v některých druzích ovoce a zeleniny. Mají protektivní roli vůči několika typům rakoviny

(prsů, prostaty, tlustého střeva), působí preventivně proti rozvoji kardiovaskulárních chorob, osteoporózy a snižují hladinu LDL cholesterolu [74,75].

Stilbeny (stilbenoidy) se řadí do skupiny sekundárních metabolitů syntetizovaných fenylpropanoidovou cestou. Vyskytují se v těle rostlin, kde jsou syntetizovány především z důvodu obrany rostlin proti mikrobiálním patogenům a býložravcům, řadí se do skupiny fytoalexinů. Stilbeny mohou být potenciálními látkami při léčbě mikrobiálních infekcí a mají také široký potenciál v léčbě jiných civilizačních chorob. Mezi nejvýznamnější stilbeny jsou řazeny stilben (Obr. 11) a resveratrol (Obr. 12), které mají schopnost napodobovat účinky ženských hormonů estrogenů [76].



Obrázek 11: Trans-stilben [71]



Obrázek 12: Resveratrol [71]

1.4. Analýza polyfenolových látek

1.4.1. Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Stanovení celkového obsahu polyfenolů se provádí nejčastěji za použití činidla Folin-Ciocalteu. Vzorek je smísen s 10x zředěným činidlem Folin-Ciocalteu, nejčastěji v poměru 1:5, přidá se uhličitan sodný a destilovaná voda. Směs se nechá reagovat při laboratorní teplotě 60-90 minut a poté je proměřena absorbance roztoku při 760 nebo 765 nm [16,17,19,20].

1.4.2. Příprava vzorku před stanovením

Příprava vzorku je jedním z nejdůležitějších kroků analýzy. Principem extrakce je distribuce látek mezi dvě fáze, která probíhá do ustavení rovnováhy. K izolaci polyfenolických látek z pevných vzorků se využívá především extrakce s využitím ultrazvuku nebo extrakce v Soxhletově extraktoru [77].

Extrakce s využitím ultrazvuku - Ultrasound Assisted Extraction (UAE) je běžná, jednoduchá, účinná a rychlá extrakční technika. Extrakce látek se provádí v ultrazvukové lázni nebo pomocí ultrazvukové sondy. Při extrakci se využívá ultrazvukových vln, které se šíří prostředím a způsobují rozpad tuhého vzorku. U rostlinných materiálů dochází

k narušení buněčných stěn, čímž je umožněna lepší penetrace rozpouštědla do vzorku a snadnější uvolnění extrahovaných látek. Provedení je velmi jednoduché. Vzorek je ponořen do rozpouštědla, na které je po určitou dobu (15-30 min) aplikována ultrazvuková energie. Po extrakci ultrazvukem následuje úprava vzorku zahrnující filtraci, odstředění nebo i jiné operace, jako např. SPE [78,80].

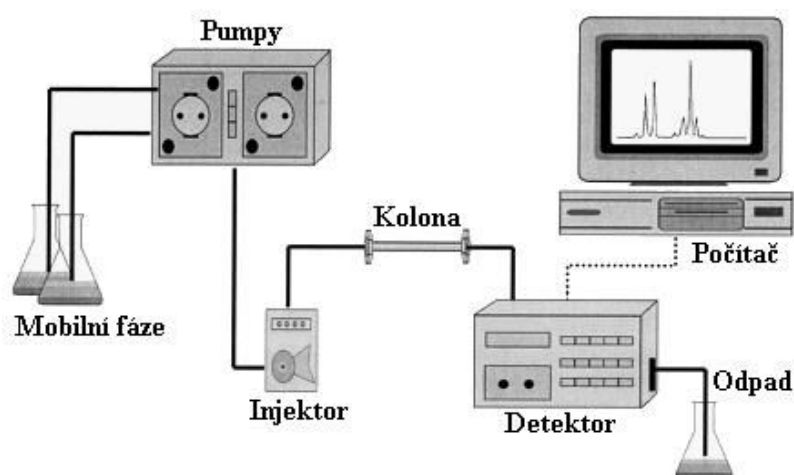
Soxhletova extrakce je jedna z nejstarších extrakčních technik. Často bývá používána jako srovnávací metoda pro nově vyvíjené extrakční techniky. Jedná se o jednoduchou kontinuální metodu, při které je pevný vzorek vložen do extrakční patrony, umístěné v Soxhletově aparatuře. Rozpouštědlo se zahřeje na bod varu a v podobě par přechází do chladiče, kde následně kondenzuje a kape do patrony se vzorkem a vymývá ze vzorku rozpustné komponenty. Rozpouštědlo s vyextrahovanými analyty se přepadem vrací zpět do varné baňky a celý proces se opakuje. Vzorek je vždy extrahován čistým rozpouštědlem a ve varné baňce jsou koncentrovány netěkavé složky vyextrahované ze vzorku. Izolované látky tedy musí být stabilní při teplotě varu použitého extrakčního rozpouštědla. Výhodou Soxhletovy extrakce je, že často není nutná optimalizace extrakčních podmínek, protože se jedná o metodu normovanou. Další výhodou jsou nízké pořizovací náklady a malé nároky na obsluhu. Naopak nevýhodou je dlouhá doba extrakce a vysoká spotřeba rozpouštědel [78,81-82].

1.4.3. Analýza polyfenolových látek pomocí kapalinové chromatografie

Polyfenolové látky jsou nejčastěji analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). HPLC je v dnešní době jedna z nejvíce používaných chromatografických technik. Tato technika separace látek je téměř univerzální, přesná a použitelná i pro separaci složitějších nebo neznámých směsí látek. Principem separace je různá distribuce látek mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (pevnou) fází. Mobilní fází je vždy kapalina, stacionární fází může tvořit kapalina nebo tuhá látka. Stacionární fází bývá nejčastěji silikagel nebo modifikovaný silikagel. Metodu HPLC lze využít v systému s normálními fázemi (Normal Phase; NP), kdy je stacionární fáze polárnější než fáze mobilní nebo v systému s obrácenými fázemi (Reverse Phase, RP), kdy je stacionární fáze naopak méně polární než fáze mobilní. Využívá se buď isokratické eluce, při které je průtok mobilní fáze konstantní nebo gradientové eluce, během které se průběžně mění složení mobilní fáze a tím dochází ke zrychlení analýzy a lepší separaci a nižšímu rozmývání píků [83-88].

1.4.4. Elektrochemické detektory

Různé látky jsou díky svým specifickým vlastnostem v koloně na stacionární fázi rozdílně zadržovány. Látky, které se v koloně více zadržují, prochází tedy kolonou déle než látky, které se v koloně nezadržují vůbec, nebo méně. Látky jsou po průchodu kolonou detekovány pomocí vhodného detektoru. Mezi nejpoužívanější detektory v kapalinové chromatografii patří spektrofotometrický, fluorimetrický, refraktometrický, elektrochemický nebo hmotnostní detektor. Počítačovým zpracováním naměřeného signálu je chromatogram. Identifikace látky se provede na základě retenčního času píku (čas, při kterém byla daná látka eluována z kolony a byl zaznamenán pík této látky) a obsah dané látky se vyhodnotí na základě plochy daného píku. Instrumentální uspořádání v HPLC je zobrazeno na obrázku č. 13.

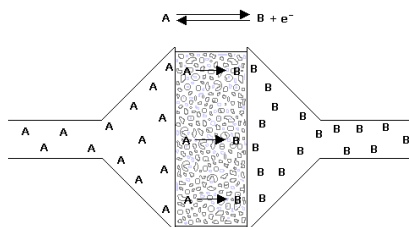


Obrázek 13: Instrumentální uspořádání v HPLC [89]

Elektrochemické detektory se používají pro detekci látek schopných elektrochemické reakce. Mezi tyto látky patří většina polutantů, léčiv nebo přírodních látek. Tyto detektory měří určitou elektrochemickou veličinu (elektrodotový potenciál, proud), která byla vyvolána průchodem látky průtokovou celou detektoru. V průtokové cele jsou umístěny elektrody (Obr. 14), na které je vloženo pracovní napětí, které je nezbytné k uskutečnění elektrochemické reakce. Naměřený signál je úměrný látkovému množství dané látky. Elektrochemické detektory tedy sledují závislost mezi elektrickou veličinou a koncentrací stanovované látky [90-92].

Amperometrický detektor měří proud vyvolaný průchodem oxidované nebo redukované látky průtokovou celou detektoru. **Coulometrický detektor** měří náboj potřebný k oxidaci nebo redukcii celkového množství látky při průtoku látky měrnou celou detektoru. Jedná se o velmi citlivý, selektivní, stabilní a účinný detektor. Další výhodou coulometrických

detektorů je možnost zapojení více elektrod do série. Na každou z elektrod je vloženo různé konstantní napětí a tím dochází k dalšímu zvýšení selektivity detektoru. Zapojením čtyř až šestnácti coulometrických elektrod je možné získat detektor obdobný detektoru diodového pole, tzv. CoulArray [90].



Obrázek 14: Porézni grafitová pracovní elektroda fritového typu [90]

Detektor CoulArray může mít 4, 8, 12 nebo 16 coulometrických elektrod spojených v sérii. Na každou z cel je vkládáno jiné, ale konstantní napětí. Každá elektrochemicky aktivní látka je při určitém potenciálu (charakteristickém pro danou látku) buď oxidována (ztrácí elektrony), nebo redukována (přijímá elektrony), což vyvolá průtok proudu. Závislost intenzity měřeného signálu na čase se nazývá chromatogram a převedením na závislost intenzity na napětí vzniká voltamogram. Pro každou látku je charakteristický jak retenční čas odečtený z chromatogramu, tak i průběh voltamografické křivky. Každá látka se oxiduje nebo redukuje při jiném potenciálu a má i typický poměr před-dominantního, dominantního a post-dominantního píku, čehož se využívá při identifikaci látek. Detektor CoulArray poskytuje 3D pohled na vzorek, je velmi citlivý, selektivní, bez interferencí, vyžaduje pouze jednoduchou přípravu vzorku, poskytuje dobrá data k identifikaci sloučenin. Velmi často je využíván v chemickém a farmakologickém výzkumu, v klinické diagnostice, neurovědě, u potravin a nápojů nebo při analýzách životního prostředí [90,93].

1.5. Příklady analýz

1.5.1. Skořice

Vzorky skořice jsou zpravidla před analýzou vysušeny vzduchem a následně rozemlety. Práškový vzorek je většinou extrahován 80% methanolem v ultrazvukové lázni nebo lze využít i extrakci v Soxhletově extraktoru. V případě druhé zmíněné extrakce se extrahuje do acetonu a přebytečné rozpouštědlo se následně odpaří ve vakuové sušárně za sníženého tlaku. Před analýzou pomocí HPLC je nezbytné extrakty přefiltrovat. [8-9,11].

V extraktu skořice lze stanovit celkový obsah polyfenolů pomocí činidla Folin-Ciocalteu. K identifikaci konkrétních polyfenolových látek se využívá kapalinové chromatografie.

K analýze je nejčastěji využívána kolona typu C18 (např. Nucleosil či Gemini, délky 250 mm a velikosti částic 5 µm), vždy s ochrannou předkolonkou se stejnou stacionární fází jakou má kolona. Využívá se gradientové eluce. Mobilní fázi tvoří roztok 2,5% kyseliny mravenčí nebo 0,1% kyseliny fosforečné a organická rozpouštědla jako methanol nebo acetonitril. Detekce analytů se provádí pomocí DAD (diodového pole) při 280 nm (pro flavanony, flavanoly, kyselinu hydroxybenzoovou, taniny, fenolové diterpeny a těkavé sloučeniny), 320 nm (pro kyselinu hydroxyskořicovou a flovanony) a při 370 nm (pro flavonoly). K detekci látek může být využita hmotnostní detekce i některé další [9,11].

Nejhojnější polyfenolovou látkou obsaženou ve vzorcích bývá cinnamaldehyd (86 – 171 mg/g), následovaný eugenolem (14,4 mg/g), kumarinem (5,8 mg/g), cinnamylalkoholem (1,13 mg/g) a kyselinou skořicovou (0,87 mg/g). V těkavém oleji z listů skořicovníku byl jako dominantní látka kvantifikován eugenol (87,3 %). Hlavními složkami těkavého oleje z kůry jsou cinnamaldehyd (49,9 %) a kumarin (16,6 %). Dále se ve skořici nachází katechin a jeho deriváty (4,5 – 10,6 mg/g) a fenolové kyseliny – především kyselina kávová (0,15 – 0,24 mg/g) [8-9,11,94].

Antioxidační aktivitu skořice lze např. stanovit metodami ABTS (10), DPPH nebo pomocí kyseliny linoleové. [8].

Mezi jednotlivými druhy skořice byly zjištěny rozdíly v obsahu polyfenolových látek i v antioxidační aktivitě. Antioxidační aktivita *Cinnamomum cassia Presl* původem z Číny byla stanovena 62 mmol Troloxu/100 g, ale u *Cinnamomum Zeylanicum N.* (skořice celá) původem z Indonésie byla hodnota vyšší, 108 mmol Troloxu/100 g. Lišil se i obsah celkových polyfenolů 6,34 a 12 g GAE/100 g. Rozdíl byl i ve složení polyfenolových látek. *Cinnamomum cassia Presl* obsahovala především flavonoidy (katechin a jeho deriváty), ale *Cinnamomum Zeylanicum N.* obsahovala 3x menší množství katechinů a dominantní polyfenolovou látkou byl cinnamaldehyd. Z dané studie není zcela jasné, čím jsou způsobené dané rozdíly ve výsledcích. Obsah polyfenolových látek totiž může být ovlivněn hned několika faktory jako je odrůda, země původu nebo, zda se jedná o skořici mletou nebo celou [9].

Pomocí hydrodestilace jsou ze skořice získávány těkavé látky, které se pak analyzují pomocí plynové chromatografie. K analýze těchto látek se používají kapilární kolony (např. RTx-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm nebo HP-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,1 µm). Jako nosný plyn je nejčastěji využíváno helium. Teplota injektoru se pohybuje od 150 °C do 240 °C, teplota

detektoru FID je nejčastěji 250 °C, nástřik je zpravidla 1 µl s využitím nástřiku typu split a hmotnostní detekcí. [7,8,94].

V neposlední řadě byly také zjištěny antibakteriální, antipatogenní a antifungicidní účinky extraktů skořice. Antifugální účinky extraktů z oleje z listů skořicovníku byly prokázány například proti *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium citrinum* nebo *Penicillium viridicatum* [8].

1.5.2. Granátové jablko

Granátové jablko je nejčastěji analyzováno ve formě džusů nebo vín. Příprava vzorku zahrnuje extrakci, odstředění a filtraci [19].

Granátové jablko je bohaté na fenolové látky, k jejichž identifikaci a kvantifikaci se nejčastěji využívá kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi s kolonou typu C18, ochrannou předkolonkou se stejnou stacionární fází jako má kolona a s různými typy detekce. Jako mobilní fáze se využívá voda, methanol a jejich směsi v různém poměru o průtoku většinou 1 ml/min. Detekce polyfenolů je často provedena pomocí DAD při 280, 350 a 510 nm. Kromě této detekce může být např. využita i hmotnostní detekce s ionizací elektrosprejem a kvadrupólovým detektorem [18,19].

Fenolové sloučeniny v granátovém jablku můžeme rozdělit do 4 hlavních skupin. První skupinou jsou anthokyanidinové pigmenty, které lze stanovit pomocí HPLC s detekcí při 510 nm. Druhou skupinu fenolových látek tvoří hydrolyzovatelné taniny gallagylového typu. Tyto látky mají charakteristické UV spektrum se dvěma maximy (258 a 378 nm). Mezi tyto látky patří například izomery punicalginu nebo punicalin, které byly identifikovány pomocí HPLC-UV a HPLC-MS. Třetí skupinu tvoří kyselina ellagová a její glykosidy. Kyselina ellagová má charakteristické UV spektrum a lze ji stanovit pomocí HPLC s UV detekcí při 350 nm nebo pomocí HPLC-MS. Poslední skupinu fenolových látek tvoří široká skupina hydrolyzovatelných taninů s necharakteristickými UV spektry. Tyto látky se analyzují pomocí HPLC-MS, kdy 173 hmotnostních jednotek odpovídá kyselině galové, 301 kyselině ellagové, 451 kyselině tetragalové atd. [15,19,69].

Mezi nejhojněji zastoupené polyfenoly způsobující zbarvení granátového jablka patří hlavně anthokyanidiny delphinidin, cyanidin, 3-glukosid pelargonidinu nebo 3,5-diglukosid pelargonidinu. Obsah anthokyanidinů se pohybuje zhruba od 8 do 37 mg/100 g džusu. Ve velkém množství jsou v granátovém jablku obsaženy i galokatechiny (galokatechin,

epigalokatechin). V kůře granátového jablka je obsažen nejvíce punicalgin, pak katechin, kyselina ellagová, kyselina galová, epikatechin, rutin, kyselina chlorogenová a nejméně zastoupená je kyselina kávová [18-19,68-69].

V prostudovaných publikacích se celkové množství polyfenolů lišilo mezi jednotlivými vzorky. Obsah polyfenolů se pohyboval v rozmezí 1,8 -10 g/l. Důvodem různorodosti výsledků může být například odlišnost jednotlivých kultivarů [16,17,19-20].

Bylo zjištěno, že s obsahem polyfenolů souvisí i antioxidační aktivita. Metodou DPPH bylo zjištěno, že největší podíl na antioxidační aktivitě mají punicalginy a hydrolyzovatelné taniny. Protože se při komerčním zpracování šťáv zpracovává celé ovoce, včetně kůry, jsou komerční šťávy bohatší na punicalginy a mají většinou vyšší antioxidační aktivitu než čerstvé šťávy připravené ze zrníček granátového jablka v laboratoři (obsahují pouze hydrolyzovatelné taniny). Inhibiční koeficient se pohyboval v rozmezí od 15,6 do 40,7 % dle kultivaru [17,19-20,69].

Granátové jablko vykazuje také vysokou antimikrobiální aktivitu, kterou lze stanovit určením inhibice růstu různých mikroorganismů, respektive měřením velikosti vzniklých inhibičních zón. Bylo zjištěno, že granátové jablko potlačuje růst mikroorganismů jako *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* a některých dalších [17].

1.5.3. Česnek

Vzorek česneku k analýze může být připraven buď hydrolýzou pomocí 1,2 M HCl v 50% methanolu, nebo extrakcí do okyseleného methanolu, vody, či macerací v 80% methanolu (76 hod). Další úprava vzorku většinou zahrnuje zchlazení, filtraci či odstředění. Extrakt může být připraven i v Soxhletově extraktoru, nejčastěji do methanolu (6 hod). Extrakt se poté zchladí a zakoncentruje ve vakuu [28,30,32-34,95].

Celkový obsah polyfenolových látek v česneku se pohybuje v rozmezí 5–100 mg GAE/100 g. Identifikace jednotlivých polyfenolů se provádí nejčastěji pomocí HPLC. Česnek lze ale analyzovat řadou metod s různými typy detekce a různými podmínkami. Mezi často používané metody patří například HPLC-UV (s předkolonovou derivatizací s OPA (o-ftalaldehyd) i bez derivatizace) v systému s normálními i s obrácenými fázemi, HPLC-FLD v systému s obrácenými fázemi a iontově párovým činidlem, HPLC-MS, HPLC-DAD (s předkolonovou derivatizací s OPA nebo s postkolonovou fotochemickou

derivatizací), nebo HPLC-ED. Ke stanovení polyfenolů v česneku lze využít i plynovou chromatografii s MS nebo FID detekcí, vždy ale s předkolumnovou derivatizací. K analýzám lze využít také NMR [25,30,32-33,36].

Díky tomu, že jsou všechny antioxidanty elektroaktivní, je možné jejich voltametrické rozlišení jako funkce jejich reakčního potenciálu. Antioxidanty v česneku mohou být stanoveny tedy také metodou HPLC s elektrochemickou detekcí – konkrétně byl použit detektor CoulArray. Detektor měl 12 elektrod zapojených v sérii, na které byl vložen potenciál od 0 do 770 mV v přírůstcích po 70 mV. Analyty byly charakterizovány jak podle retenčních časů, tak podle hydrodynamických voltamogramů [96].

Nejvíce zastoupenou fenolovou kyselinou v česneku je kyselina vanilová, dále pak kyselina *p*-hydroxybenzoová. Další kyseliny vyskytující se v česneku jsou například kyselina protokatechuová, kávová, anisová nebo kyselina sinapová [33].

Celkový obsah flavonoidů lze stanovit spektrofotometricky metodou založenou na vytvoření komplexu flavonoid-hliník, který absorbuje při 430 nm. Při tomto stanovení je 1 ml vzorku smíchan s 1 ml 2% $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, směs se nechá 15 minut reagovat při laboratorní teplotě a poté je proměřena absorbance při 430 nm [30].

Obsah flavonoidů v česneku se pohyboval kolem 1,76-3,37 mg CE/g (Catechin Equivalent; CE). Flavonoly byly obsaženy v koncentracích mezi 3-6,71 mg CE/100 g a bylo také zjištěno, že flavonoly kaempferol, myricetin a kvercetin se v česneku vůbec nevyskytují [28,32-33].

Antioxidační aktivitu česneku lze stanovit pomocí několika metod. Pomocí metody DPPH, FRAP, ABTS, či metodou s β -karotenem a s linolovou kyselinou [32-35].

Česnek obsahuje vysoké množství polyfenolových látek a má i vysokou antioxidační aktivitu, tu lze stanovit několika metodami... spojit s předchozím odstavcem. Některé studie ale dokazují, že tepelné zpracovávání česneku vede k degradaci obsažených bioaktivních sloučenin, jako jsou polyfenolové látky, snižuje se antioxidační aktivita a mění se i profil obsažených bílkovin. Celkový obsah bílkovin lze stanovit elektroforeticky, kdy se extrakt dávkuje do gelu [33].

K extrakci a analýze těkavých látek v česneku lze využít metodu mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Micro Extraction; SPME), kdy se jehla napíchne přes septum do vialky se vzorkem, vysune se vlákno, které na sebe sorbuje těkavé látky za předem optimalizovaných podmínek. Jehla s vláknem se pak ihned vloží do injektoru plynového chromatografu, kde

dojde k tepelné desorpci silic a jejich následné separaci. Při této metodě je vhodné použít například kapilární kolonu HP-FFAP (30 m x 25 mm; 0,25 μm). Ze silic je v česneku nejvíce zastoupený diallyl disulfid, dále pak trisulfid a methylallyl trisulfid [24].

Další důležitou látkou, kterou lze v česneku stanovit je S-allylcystein. Jedná se o derivát aminokyseliny cysteinu, který má potenciální chemopreventivní účinky a podílí se také na snižování cholesterolu v krvi. Stanovení S-allylcysteinu se provádí pomocí HPLC-UV. K analýze je vhodné použít například kolonu Elite C18 (15 x 3 mm; 3μm) a k detekci se využívá vlnové délky 208 nm. Ke stanovení lze také využít metodu HPLC-FLD, kdy se k extraktu přidá fluor-borátový pufr a činidlo. Vzniklé deriváty jsou poté analyzovány. K analýze lze využít například kolonu typu C18. Obsah S-allylcysteinu v česneku je cca 22 μg/g [95].

V neposlední řadě se při analýze česneku využívá také senzorická analýza pomocí detektoru elektrochemického nosu či pomocí plynové chromatografie, kdy se analyzují plyny obsahující síru [26].

1.5.4. Konopné semínko

Konopné semínko bývá před samotnou analýzou většinou homogenizováno, extrahováno vytřepáním do rozpouštědla (methanol, aceton, voda) nebo extrahováno v ultrazvukové lázni. Poté může být extrakt odstředěn a supernatant může být dále přečištěn pomocí extrakce tuhou fází (Solid Phase Extraction, SPE). V jedné studii byl zkoumán vliv objemu rozpouštědla, doby provedení a teploty na výtěžnost extrakce. Bylo zjištěno, že k extrakci je nejlepší použít 75 ml rozpouštědla, teplotu 70 °C a dobu extrakce 20 minut [44,97].

Konopné semínko je často analyzováno také ve formě oleje, který se získává izolací v Soxhletově extraktoru (8 h; 70 °C; n-hexan). V uvedené studii bylo pro extrakci použito 30 g konopných semínek a 240 ml rozpouštědla. Nadbytečné rozpouštědlo bylo po extrakci odpařeno ve vakuu při 60 °C [41].

Přečištění a zakoncentrování extraktů fenolových sloučenin se provádí pomocí SPE, kdy sorbent může být například diolová skupina. Obsah polyfenolů se vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny galové (Gallic Acid Equivalent, GAE). Celkový obsah polyfenolů v konopném semínku byl v prostudovaných publikacích stanoven metodou dle Folin-Ciocalteu v hodnotě 0,44 mg GAE/g [46,98].

Separace a identifikace fenolových sloučenin bývá provedena pomocí kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi (např. kolona Kinetex nebo NovaPak C₁₈) s gradientovou elucí (MF – A: methanol (čistý nebo s přidavkem kyseliny mravenčí); B: voda (s přidavkem kyseliny octové nebo mravenčí)). Nejčastěji je využíváno hmotnostní nebo spektrofotometrické detekce. K hmotnostní detekci je nejčastěji využíván kvadrupólový detektor s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu (ESI⁺). Při detekci UV-VIS má konopný olej charakteristické pásy (412, 453, 482 a 670 nm). UV detekce fenolových kyselin se provádí při 250 a 320 nm. Bylo zjištěno, že absorbance při vlnových délkách 410-480 nm je spojena se žlutou barvou oleje. Konopný olej také silně absorbuje v UVA (100-290 nm) i UVB (290-320 nm) oblasti a vykazuje také významnou transmitanci, z čehož vyplývá, že by mohl být použit také jako prostředek k ochraně proti UV záření s vysokým stínícím výkonem (Sun Protection Factor; SPF) a ochranným faktorem (Protection Factor; PFA) [40,44,98].

Celkový obsah flavonoidů v konopném semínku lze stanovit smícháním 1 ml extraktu zředěného 3 ml destilované vody se 100 µl 2-aminoethylesteru kyseliny difenylborité (1 % v/v) a proměřením absorbance při 404 nm. Výsledky jsou uvedeny jako ekvivalent luteolinu, který se používá jako standard [97].

Nejčastěji detekovanou látkou v konopných semínkách je tetrahydrocannabinol (THC), který je většinou obsažen v koncentraci kolem 0,8 mg THC/kg, což je nižší hodnota než maximální dovolený limit v EU (12 mg THC/kg). Z polyfenolových látek konopné semínko obsahuje kyselinu *p*-hydroxybenzoovou (6 µg/100 g oleje), sinapovou (3 µg/100 g oleje), *p*-kumarovou (2 µg/100 g oleje), vanilovou (2 µg/100 g oleje) a kyselinu ferulovou (1 µg/100 g oleje) [44,98].

Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí několika metod. Metodou DPPH, ORAC, FRAP nebo ABTS. Mimo jiné lze měřit také chelatační schopnost konopných semínek, která se vyjadřuje jako ekvivalent kyseliny ethyldiamintetraoctové (EDTAE) která byla zjištěna v hodnotě 10,5 EDTAE mg/g [46,97].

V konopném semínku bývá stanovován i obsah mastných kyselin pomocí plynové chromatografie. Separace volných mastných kyselin může být provedena na koloně CP7489 (100 m x 0,25 mm) nebo se esterifikací s 2 M KOH v methanolu a *n*-hexanu připraví methylestery mastných kyselin (Fatty Acid Methyl Esters FAMES), které jsou separovány na koloně SP-2380 (30 m x 0,32 mm x 0,2 µm). Jako nosný plyn je používáno helium

a k detekci je využíván plamenově ionizační detektor (FID). Mezi nejvíce zastoupené mastné kyseliny patří kyselina linolová (56 %), α -linolenová (16 %) a olejová (12 %). V menším množství byla obsažena také kyselina palmitová. Poměr polynenasycených, mononenasycených a nasycených mastných kyselin byl 81:11:7 [40-42].

Konopné semínko je bohaté i na další látky ze skupiny antioxidantů. Například tokoferoly v konopném semínku byly stanoveny v průměrných koncentracích: γ -tokoferol 2,48 mg/g a δ -tokoferol 0,77 mg/g [41].

1.5.5. Červená řepa

Vzorek červené řepy je před analýzou oloupan, omyt, nakrájen na kusy, případně odstávněn [50,99].

Extrakce polyfenolů je provedena smícháním vzorku s rozpouštědlem (např. 50% ethanol), následována odstředěním a odebráním supernatantu. Stejný postup je zpravidla opakován vícekrát. Jinou možností extrakce je extrakce vzorku v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Získané extrakty mohou být odpařeny do sucha za sníženého tlaku nebo přečištěny pomocí SPE [51,54,99-100].

Obsah betalainů (barviva) bývá stanoven pomocí HPLC. Šťáva se smíchá s 50% ethanolem a před nástřikem se prefiltruje přes PTFE filtr. Pracuje se v systému s obrácenými fázemi. Jako kolona bývá použita kolona se stacionární fází typu C8 a s ochrannou předkolonkou se stejnou stacionární fází. Mobilní fáze může být například: roztok A – 0,2 % kyselina mravenčí ve vodě a roztok B – acetonitril. Využívá se gradientové eluce, průtok 1 ml/min, teplota 30 °C. Betalainy jsou detekovány pomocí DAD při vlnových délkách 476 a 538 nm. Celkový obsah betalainů byl zjištěn mezi 0,8 a 1,3 g/l čerstvé šťávy (60 % betacyaninů a 40 % betaxanthinů). Betalainy představovaly 70-100 % z celkových polyfenolů [50,51].

Obsah celkových polyfenolů se pohyboval kolem 1 g/l. Identifikace fenolů v červené řepě se provádí pomocí HPLC, kdy separace látek je nejčastěji provedena na koloně typu C18. Mobilní fázi tvoří roztok 0,1% kyselina trifluoroctové ve vodě a 80% okyselený acetonitril (také kyselinou trifluoroctovou). V jedné z metod byl aplikován lineární gradient, průtok 0,8 ml/min a teplota kolony byla nastavena na 40 °C. Jako detektor byl použit DAD. Antokyany byly detekovány jako nerozlišené vícenásobné vrcholy vykazující UV-absorpci mezi vlnovými délkami 280 až 550 nm, hydroxycinnamové kyseliny byly detekovány při

310 nm a flavonoly při 360 nm. Kyselina chlorogenová nemohla být kvantifikována kvůli společné eluci s hlavními betacyaniny [51,53-54,99].

Ve šťávě se kromě betalainů (betanin, isobetanin a vulgaxanthin I) vyskytovaly také fenolové kyseliny. Nejvíce obsaženou fenolovou kyselinou byla kyselina 4-hydroxybenzoová následovaná kyselinou skořicovou, vanilovou, chlorogenovou, transferulovou a kyselinou kávovou. Dále se v červené řepě vyskytovaly i kyseliny anisová, kumarová, galová protokatechuová, syringová a deriváty kvercetinu. Z flavonoidů byly identifikovány katechin, epikatechin, rutin a deriváty kvercetinu [51-52,54,99,101].

Červená řepa je velmi silný antioxidant. Antioxidační aktivita šťávy z červené řepy byla stanovena metodou FRAP a pohybovala se kolem 24,8 $\mu\text{mol/l}$, což je hodnota vyšší než například antioxidační aktivita granátového jablka která byla naměřena v rozmezí hodnot 16,8-20,1 $\mu\text{mol/l}$. Při stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH dosáhly všechny extrakty úplné eliminace DPPH radikálu v koncentraci 1,0 mg/ml. Radikál ABTS byl inhibován z 92,1-92,3 % [53,54,102].

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Přístroje a zařízení

2.1.1. Kapalinový chromatograf s detektorem CoulArray

Pro identifikaci a kvantifikaci elektroaktivních polyfenolických látek ve vzorcích byl použit kapalinový chromatograf výrobce ESA (Chelmsford, MA, USA), který se skládá z pumpy ESA582, termostatu, dávkovací smyčky, a detektoru CoulArray s 8 elektrochemickými elektrodami. K odstranění vzduchových bublin z mobilní fáze byl před pumpami zapojen degasér DG3014 (Ecom, Praha, ČR). Separace látek byly provedeny na monolitické koloně Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm) od výrobce Merck (Darmstadt, Německo).

2.1.2. Kapalinový chromatograf s detektorem DAD

Pro identifikaci a kvantifikaci polyfenolových látek, které nejsou elektroaktivní, byl použit kapalinový chromatograf 1290 Infinity 2D-LC Solution od výrobce Agilent (Palo Alto, CA, USA). Přístroj byl vybaven vysokotlakou binární pumpou, termostatem, autosamplerem, degasérem a DAD detektorem. Separace látek probíhala na koloně Ascentis express C18(150 x 3 mm, 2,7 µm) od výrobce Phenomenex (Torrance, CA, USA).

2.1.3. Další zařízení

Ke stanovení celkového množství polyfenolických látek a k měření antioxidační aktivity byl použit spektrofotometr Hélios γ (Thermo Spectronic, Cambridge, VB).

Vzorky byly extrahovány v ultrazvukové vodní lázni Bandelin SONOREX TK 52 (Bandelin Electronic, Berlín, Německo).

Soxhletův extraktor (Fisher Scientific, Pardubice ČR)

Odšťavňovač Catler JE 4010

Dále byla používána následující zařízení: analytické váhy KERN ABT220-4M (Kern & Sohn, Balingen, Německo), odstředivka NF 400 (Nüve, Ankara, Turecko), pH metr SCHOTT GC 842 (Schott Glas, Mainz, Německo), sada automatických pipet (Biohit, Helsinky, Finsko), filtrační aparatura mobilní fáze (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a běžné laboratorní sklo a nádobí.

2.2. Chemikálie a standardní látky

2.2.1. Chemikálie

Redestilovaná voda	Univerzita Pardubice, ČR
Octan sodný, $\geq 99\%$	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
Kyselina mravenčí, $\geq 99,8\%$	(Penta, Chrudim, ČR)
Acetonitril pro HPLC, 99 % p. a.	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
Ethanol, $\geq 96\%$ p. a.	(Lach-Ner, Neratovice, ČR)
Methanol, 99,9% p. a.	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
Folin-Ciocalteuvo činidlo	(Merck, Darmstadt, Německo)
Uhličitan sodný	(Lachema, Neratovice, ČR)
ABTS - 10 mg tableta	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
Peroxodisíran draselný $\geq 99\%$	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)
DPPH	(Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo)

2.2.2. Standardní látky

K identifikaci látek byly použity následující standardní látky od firmy Fluka (Buchs, Švýcarsko): kyselina galová ($\geq 98\%$), protokatechuová ($\geq 97\%$), vanilová ($\geq 97\%$), sinapová ($\geq 97\%$), ellagová ($\geq 96\%$) a vanilin ($\geq 98\%$). Od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo) byly použity následující standardy: kyselina kávová ($\geq 99\%$), chlorogenová ($\geq 95\%$), ferulová ($\geq 99\%$), syringová ($\geq 95\%$), gallokatechin ($\geq 98\%$), katechin ($\geq 98\%$), epigallokatechin ($\geq 95\%$), epikatechin ($\geq 90\%$), epigallokatechin galát ($\geq 95\%$), gallokatechin galát ($\geq 99\%$), epikatechin galát ($\geq 98\%$), kvercetin ($\geq 95\%$) a eugenol ($\geq 99\%$).

2.3. Vzorky

Skořice mletá	KOTÁNYI (Wolkersdorf, Rakousko)
Skořice celá	KOTÁNYI (Wolkersdorf, Rakousko)
Česnek čerstvý	domácí, oblast Kolínsko
Česnek sušený	Vitana, granulovaný (Byšice, ČR)

Granátové jablko	Tesco, země původu Indie
Konopné semínko	BIO, Country life (Nové Město, ČR)
Červená řepa čerstvá	Albert hypermarket, země původu Polsko
Červená řepa nakládaná	Efko cz (Veselí nad Lužnicí, ČR)

2.4. Pracovní postupy

2.4.1. Úprava vzorků

K extrakci vzorků byla na základě postupů ze třech předcházejících diplomových prací, zabývajících se stejnou tematikou, použita extrakce za pomoci ultrazvuku [104-106].

Skořice mletá

Bylo naváženo 200 mg mleté skořice a smícháno s 50 ml rozpouštědla – voda, 50% methanol, methanol. Směs byla umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně. Získané extrakty byly přefiltrovány přes skládaný filtr a filtrát byl odstředěn (při 3000 ot/min po dobu 5 minut). Získaný supernatant byl poté přefiltrován přes stříkačkový filtr – vodný extrakt přes PA (Polyamid), methanolicke extrakty přes PTFE (polytetrafluorethylen) filtr (0,45 μm). Takto připravené roztoky byly podle potřeby zředěny a analyzovány pomocí HPLC-CoulArray a HPLC-DAD.

Polyfenolové látky byly ze skořice extrahovány také v Soxhletově extraktoru. Do extrakční patronky bylo naváženo 600 mg mleté skořice a do extrakční aparatury bylo nalito 150 ml rozpouštědla – voda, 50% methanol, methanol. Extrakce probíhala 4 hodiny. Získané extrakty byly odstředěny (při 3000 ot/min po dobu 5 minut) a přefiltrovány přes stříkačkový filtr. Připravené extrakty byly analyzovány pomocí HPLC-CoulArray.

Skořice celá

Extrakty celé skořice byly připravovány stejným způsobem jako extrakty skořice mleté. Rozdíl byl pouze v navážkách. Pro extrakci pomocí ultrazvukové lázně bylo k 1 g celé skořice přilito 50 ml rozpouštědla - voda, 50% methanol, methanol. Extrakce probíhala 15 minut, poté byl získaný extrakt přefiltrován přes stříkačkový filtr - vodný extrakt přes PA, methanolicke extrakty přes PTFE filtr (0,45 μm) a poté byl analyzován pomocí HPLC-CoulArray.

Polyfenoly z celé skořice byly také extrahovány i v Soxhletově extraktoru. Do extrakční patronky byl navážen 1 g celé skořice a do extrakční aparatury bylo nalito 150 ml

rozpouštědla – voda, 50% methanol, methanol. Po 4 hodinách byla extrakce ukončena, získané extrakty byly přefiltrovány a analyzovány pomocí HPLC-CoulArray.

Granátové jablko

Granátové jablko bylo omyto destilovanou vodou, rozkrojeno, zrníčka granátového jablka byla vyjmuta lžičkou a ve třecí misce byla nadrcena. Uvolněná šťáva byla přefiltrována přes skládaný filtr a poté přes stříkačkový filtr PA (0,45 μm) a analyzována pomocí HPLC- CoulArray.

Česnek čerstvý

Čerstvý česnek byl nejprve rozdělen na stroužky, oloupan a následně nastrouhán. Byl navážen 1 g česneku, ke kterému bylo přilito 20 ml rozpouštědla - voda, 50% methanol, methanol. Tato směs byla umístěna na 15 minut do ultrazvukové lázně. Poté byly extrakty přefiltrovány přes skládaný filtr a přes stříkačkový filtr PA pro vodný extrakt, PTFE pro methanolicke extrakty (0,45 μm) a analyzovány pomocí HPLC-CoulArray.

Česnek sušený

Extrakty sušeného česneku byly připraveny stejným způsobem jako extrakty z čerstvého česneku.

Konopné semínko

Vzorek loupaného konopného semínka byl nadrcen v třecí misce. 2 g nadrceného vzorku byly smíchány s 20 ml rozpouštědla (voda, 50% methanol, methanol). Polyfenolové látky byly extrahovány 15 minut v ultrazvukové lázni. Po extrakci byl roztok odstředěn, supernatant byl přefiltrován přes skládaný filtr a poté přes stříkačkový filtr - vodný extrakt přes PA, methanolicke extrakty přes PTFE filtr (0,45 μm). Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí HPLC-CoulArray.

Červená řepa

Červená řepa byla omyta destilovanou vodou, nakrájena a odšťavněna. Šťáva byla poté přefiltrována přes skládaný filtr a přes stříkačkový filtr PA (0,45 μm) a poté analyzována pomocí HPLC- CoulArray.

Nakládaná řepa byla odšťavněna a postup přípravy vzorku byl stejný jako u řepy čerstvé.

2.4.2. Chromatografická analýza

Příprava mobilní fáze

Mobilní fázi A byl 10 mM roztok octanu sodného okyseleného kyselinou mravenčí na pH 3. Navážka 0,7708 g byla převedena do odměrné baňky o objemu 1 l a doplněna redestilovanou vodou po rysku. Poté bylo upraveno pH kyselinou mravenčí (2,1 ml) na pH 3. Připravená mobilní fáze byla přefiltrována přes membránový filtr PTFE (0,45 µm). Mobilní fáze B se skládala z 80 % acetonitrilu a 20 % připravené mobilní fáze A. Takto připravené mobilní fáze byly použity pro analýzu na obou chromatografech.

Příprava zásobních roztoků standardních látek

Zásobní roztoky stanovovaných standardních látek o koncentraci 100 mg/l byly připraveny navážením 10 mg do 100 ml odměrných baněk. Standardy fenolových kyselin byly rozpuštěny v 50% methanolu a standardy flavonoidů byly rozpuštěny v methanolu.

Směsný roztok standardů byl připraven navážením 10 mg každého standardu fenolových kyselin a 20 mg standardu flavonoidů a doplněním směsi 85% methanolem po rysku. Roztok byl přefiltrován přes stříkačkový filtr PTFE (0,45 µm) a jeho ředěním byla připravena kalibrační řada.

Podmínky separace látek

- **HPLC – CoulArray**

Kolona: Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm)

Mobilní fáze A: 10 mM octan sodný s kyselinou mravenčí (pH 3)

Mobilní fáze B: 20 % MF A, 80 % acetonitril

Průtok mobilní fáze: 1 ml/min

Gradientová eluce: Pro každý vzorek byl použit jiný gradient (Tab. 1-5)

Teplota kolony: 35 °C

Dávkovaný objem: 20 µl

Detekce při potenciálech: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 a 800 mV

Tabulka 1: Gradientová eluce 1 pro analýzu skořice a čerstvého česneku

Čas [min]	0	20	30	35	40
Obsah mobilní fáze B [%]	0	13	40	70	70

Tabulka 2: Gradientová eluce 2 pro analýzu sušeného česneku

Čas [min]	5	10	25	35	40	45
Obsah mobilní fáze B [%]	0	4	4	30	70	70

Tabulka 3: Gradientová eluce 3 pro analýzu granátového jablka

Čas [min]	0	25	35	40	50	55	60	65
Obsah mobilní fáze B [%]	0	4	4	10	20	40	70	70

Tabulka 4: Gradientová eluce 4 pro analýzu konopného semínka

Čas [min]	0	5	10	20	25
Obsah mobilní fáze B [%]	0	5	15	70	70

Tabulka 5: Gradientová eluce 5 pro analýzu červené řepy

Čas [min]	0	5	20	30	35
Obsah mobilní fáze B [%]	0	0	15	70	70

- **HPLC-DAD**

Kolona: Ascentis Express C18 (150 x 3 mm; 2,7 µm)

Mobilní fáze A: 10 mM octan sodný s kyselinou mravenčí (pH 3)

Mobilní fáze B: 20 % MF, 80 % acetonitril

Průtok mobilní fáze: 0,4 ml/min

Gradientová eluce: 0 min: 0 % B, 20 min: 40 % B, 30 min: 50 % B, 40 min: 70 % B

Teplota kolony: 35 °C

Dávkovaný objem: 10 µl

Detekce: 280 nm

2.4.3. Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Celkové množství polyfenolových látek bylo stanovováno metodou podle Folin Ciocalteua. Ze zásobního roztoku kyseliny galové o koncentraci 500 µg/ml byla připravena kalibrační řada roztoků o koncentracích 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 a 200 µg/ml do 10 ml odměrných baněk. Do zkumavek byl napipetován 1 ml vzorku, kalibračního roztoku nebo slepého pokusu. Jako slepý pokus bylo vždy použito rozpouštědlo, do něhož byl vzorek extrahován (redestilovaná voda, 50% methanol, methanol) a extrakty vzorků k analýze byly připraveny stejným způsobem jako extrakty pro chromatografickou analýzu. Dále byl do všech zkumavek napipetován 1 ml 95% ethanolu, 5 ml destilované vody a 0,5 ml činidla dle Folin-Ciocalteua (1 M roztok). Po pěti minutách stání byl přidán 1 ml 5% uhličitanu sodného, zkumavky byly uzavřeny a nechaly se stát 60 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby reakce byla proměřena absorbance roztoků při 765 nm proti slepému pokusu. Výsledky byly vyjádřeny jako ekvivalent kyseliny galové.

2.4.4. Stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Do 100 ml odměrné baňky byl připraven základní roztok látky Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) o koncentraci 250 µg/ml v ethanolu. Z tohoto základního roztoku byla připravena kalibrační řada o koncentracích 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 a 40 µg/ml do 10 ml odměrných baněk. Do zkumavek bylo pipetováno 500 µl vzorku, kalibračního roztoku nebo slepého pokusu. Jako slepý pokus bylo vždy použito rozpouštědlo, do něhož byl vzorek extrahován (redestilovaná voda, 50% methanol, methanol) a extrakty vzorků byly připraveny stejně jako pro chromatografickou analýzu. Do všech zkumavek bylo přidáno 5 ml methanolickeho roztoku DPPH (2,2'-difenyl-1-pykrylhydrazyl) radikálu o koncentraci 25 µg/ml. Zkumavky se nechaly 10 minut reagovat na temném místě a po uplynutí reakční doby byla proměřena absorbance vzorků při vlnové délce 517 nm. Z naměřených hodnot byla vypočítána procenta radikálu inhibovaného při reakci.

2.4.5. Stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Tableta ABTS (10 mg) byla rozpuštěna v 5 ml destilované vody. K roztoku přidáno 100 µl roztoku $K_2S_2O_8$ ($c = 0,064$ mol/l). Takto připravený roztok se nechal reagovat bez přístupu světla při laboratorní teplotě 12-16 hodin. Pro přípravu zásobního roztoku bylo pipetováno 2,5 ml roztoku kation radikálu $ABTS^{+\bullet}$ do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku. Ve zkumavkách bylo smícháno 100 µl vzorku, zředěného

vzorku, kalibračního roztoku nebo slepého pokusu se 3 ml pracovního roztoku kationtu radikálu ABTS^{+•}. Jako slepý pokus bylo vždy použito rozpouštědlo, do něhož byl vzorek extrahován (redestilovaná voda, 50% methanol, methanol) a extrakty vzorků byly připraveny stejně jako pro chromatografickou analýzu. Reakční směs se nechala reagovat 30 minut bez přístupu světla. Po uplynutí této doby byla proměřena absorbance roztoků při vlnové délce 734 nm. Rozsah kalibrační řady pro metodu ABTS a postup při samotném stanovení vycházel z optimalizace podmínek metody v diplomové práci Dany Krejčové z roku 2012. Z naměřených hodnot byla vypočítána procenta radikálu inhibovaného při reakci [107].

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Výsledky chromatografické analýzy

HPLC-CoulArray

Optimalizace chromatografických podmínek spočívá v nalezení nejvhodnějších podmínek tak, aby došlo k separaci látek v přijatelném čase. Chromatografické podmínky byly optimalizovány tak, aby se stanovované látky dělily, jak ve směsi standardních látek, tak i v extraktech ze zkoumaných vzorků. Podmínky byly optimalizovány na základě prostudované literatury a předchozích diplomových prací.

Nejprve byla použita klasická kolona typu C18, ale signál detektoru nebyl úplně stabilní, proto byla vyzkoušena monolitická kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), která vykazovala lepší stabilitu signálu a proto byla tato kolona používána i při dalších analýzách.

Poté bylo optimalizováno složení mobilní fáze. Při elektrochemické detekci je důležité, aby byla mobilní fáze vodivá. Z tohoto důvodu je nezbytná přítomnost elektrolytu v mobilní fázi. Bylo vyzkoušeno několik pufrů – octan amonný, octan sodný a mravenčan amonný. Jako nejvhodnější pufr se ukázal octan sodný, při použití tohoto pufru byl signál nejvíce ustálený. Na základě předchozích diplomových prací, zabývajících se podobnou tematikou, byl jako mobilní fáze A použit roztok 10 mM octanu sodného okyseleného kyselinou mravenčí na pH 3. Jako roztok mobilní fáze B byl nejdříve používán acetonitril, který byl poté nahrazen 80% acetonitrem připraveným naředěním acetonitrilu mobilní fází A, protože samotný acetonitril byl pro analýzu příliš silné eluční činidlo. Průtok mobilní fáze byl zvolen 1 ml/min. Při nižších průtocích docházelo k rozmývání píků.

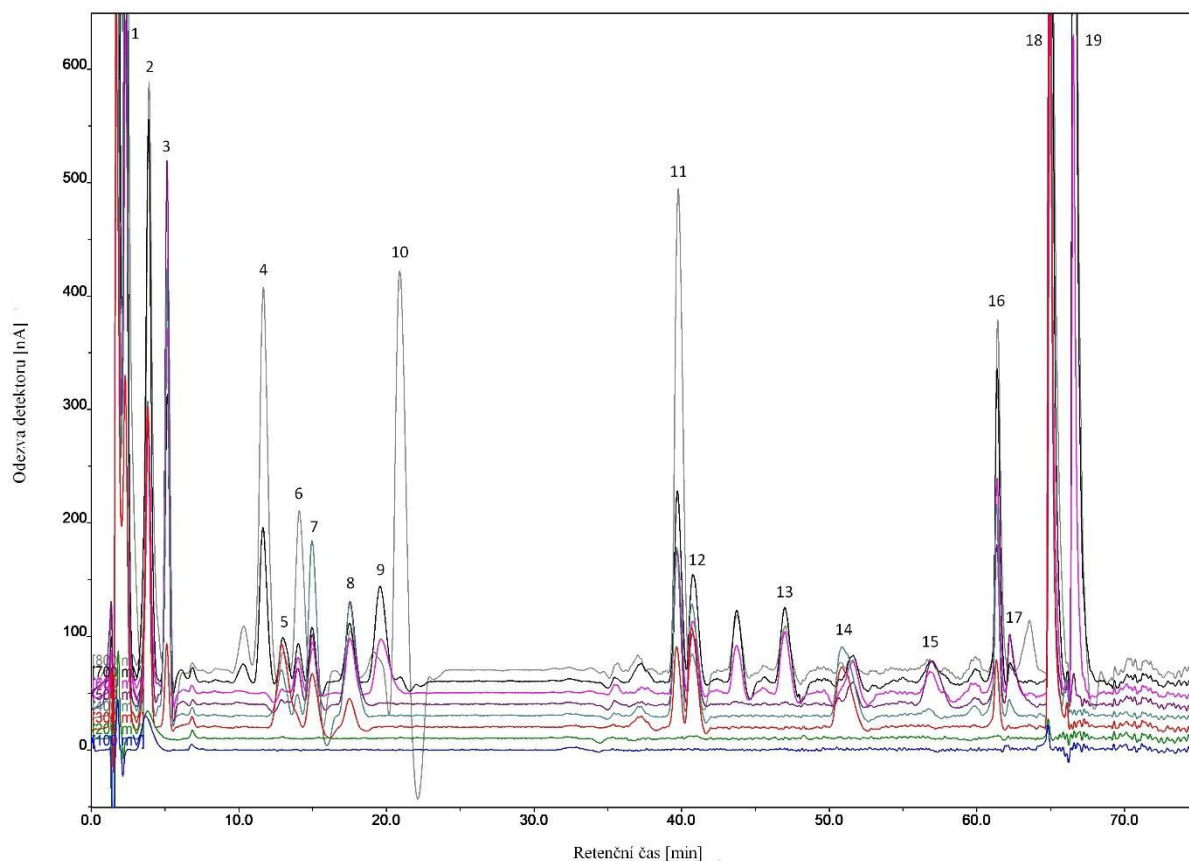
Detekce byla provedena pomocí 8 elektrochemických cel, na které bylo na základě prostudované literatury vloženo napětí 100-800 mV s přírůstkem po 100 mV.

Optimalizace gradientové eluce, tedy složení mobilní fáze v čase, byla provedena pro každý vzorek zvlášť, protože každý z analyzovaných vzorků obsahoval jiný typ látek.

3.1.1. Chromatografické a detekční charakteristiky standardů

K chromatografické analýze bylo vybráno 19 standardních látek, vyskytujících se ve zkoumaných vzorcích superpotravin. Nejprve byl připraven směsný zásobní roztok standardních látek, ve kterém byly fenolové kyseliny v koncentraci 100 mg/l a flavonoidy

v koncentraci 200 mg/l. Takto připravený směsný roztok standardů byl přefiltrován, naředěn podle potřeby a analyzován pomocí HPLC-CoulArray. Pro separaci směsi standardů byl použit následující gradientový program: 0 min: 0 % MF B; 5-6 min: 1 % MF B, 30 min: 8 % MF B, 55 min: 8 % MF B, 60 min: 20 % MF B, 70 min: 100 % MF B, 75 min: 100 % MF B. Ukázkový chromatogram směsi standardních látek je uveden na obrázku 15.



Obrázek 15: Chromatogram směsi standardních látek, systém HPLC-CoulArray

Podmínky analýzy: kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min: 0 % MF B; 5 min: 1 %, 6 min: 1 %, 30 min: 8 %, 55 min: 8 %, 60 min: 20 %, 70 min: 100 %, 75 min: 100 %, dávkovaný objem: 20 μ l, detekce: 100-800 mV. (kyseliny 1 mg/l, flavonoidy 2 mg/l)

Legenda: 1. kyselina galová, 2. gallokatechin, 3. kyselina protokatechuová, 4. kyselina vanilová, 5. epigallokatechin, 6. katechin, 7. kyselina chlorogenová, 8. kyselina kávová, 9. kyselina syringová, 10. vanilin, 11. epikatechin, 12. epigallokatechin galát, 13. kyselina ferulová, 14. gallokatechin galát, 15. kyselina sinapová, 16. epikatechin galát, 17. kyselina ellagová, 18. kvercetin, 19. eugenol

Z ukázkového chromatogramu byly odečteny chromatografické a detekční charakteristiky standardů. U každé standardní látky zaznamenán její dominantní kanál, tedy při jakém potenciálu má daná látka nejvyšší odezvu. Dále byly vypočítány poměry ploch predominantního a dominantního píku a také poměry ploch postdominantního a dominantního píku. Vypočítané hodnoty pro každou ze standardních látek jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Chromatografické a detekční charakteristiky standardů

(č.)	Standardní látka	Retenční čas [min]	Dominantní kanál [mV]	Poměr ploch predom./dom. pík	Poměr ploch postdom./dom. pík
(1)	Kyselina galová	2,78	400	0,13	0,52
(2)	Gallokatechin	3,87	800	0,95	x
(3)	Kyselina protokatechuová	5,21	500	0,85	0,73
(4)	Kyselina vanilová	11,84	800	0,17	x
(5)	Epigallokatechin	12,91	300	x	0,73
(6)	Katechin	14,56	800	0,24	x
(7)	Kyselina chlorogenová	14,98	800	0,32	x
(8)	Kyselina kávová	17,82	400	0,09	0,50
(9)	Kyselina syringová	19,91	700	0,31	0,98
(10)	Vanilin	21,32	800	0,07	x
(11)	Epikatechin	39,96	800	0,57	x
(12)	Epigallokatechin galát	41,21	800	0,75	x
(13)	Kyselina ferulová	47,13	700	0,27	0,34
(14)	Gallokatechin galát	51,86	800	0,71	x
(15)	Kyselina sinapová	57,32	600	0,74	0,55
(16)	Epikatechin galát	61,56	800	0,94	x
(17)	Kyselina ellagová	62,63	600	0,89	0,33
(18)	Kvercetin	65,08	800	0,83	x
(19)	Eugenol	67,31	700	0,29	0,90

Jednotlivé standardní látky se liší jak svou retencí, což znamená, že některé z látek jsou v koloně zadržovány více než ostatní a mají vyšší retenční čas. Dominantní kanál udává potenciál, při kterém se daná látka oxiduje. Poměr predominantního a postdominantního píku s dominantním patří také k důležitým faktorům při identifikaci látek v neznámých vzorcích. Na základě charakteristik uvedených v tabulce 7, byly tyto polyfenolové látky identifikovány i ve vzorcích superpotravin. Pro každou standardní látku byl sestaven také hydrodynamický voltamogram, což je závislost plochy píku na vloženém potenciálu. Hydrodynamické voltamogramy standardních látek jsou uvedeny v příloze I.

3.1.2. Meze detekce a stanovitelnosti, kalibrační závislosti

Mez detekce (Limit of Detection, LOD) je nejmenší množství stanovované látky, které lze detektorem zaznamenat a rozlišit od šumu. Mez detekce odpovídá signálu trojnásobku šumu základní linie. Mez stanovitelnosti (Limit of Quantification, LOQ) je pak množství látky, které u kterého lze s určitou přesností stanovit její koncentraci. Mez stanovitelnosti většinou odpovídá hodnotě desetinásobku šumu. Meze detekce a stanovitelnosti jsou veličiny určující citlivost analytické metody.

Šum základní linie byl vyhodnocen odečtením výšky šumu ze tří nástřiků mobilní fáze A, vždy z deseti míst blízko píku daného standardu. Z hodnot šumu a z výšek píků nejnižších naměřených koncentrací standardů byly vypočítány meze detekce a meze stanovitelnosti pro každý standard (Tab. 8).

Kalibrační závislosti byly připraveny pro 19 standardních látek, které byly identifikovány v analyzovaných vzorcích. Ze zásobního směsného roztoku standardních látek, ve kterém byly fenolové kyseliny obsaženy o koncentraci 100 mg/l a flavonoidy 200 mg/l byly ředěním připraveny kalibrační roztoky, které byly následně analyzovány Podmínky analýzy – viz kapitola 2.4.2. Každý kalibrační roztok byl proměřen dvakrát. Rovnice kalibračních závislostí spolu se spolehlivostí jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 7: Kvantifikační parametry standardů

(č)	Standardní látka	Kalibrační závislost	Spolehlivost	LOD [µg/l]	LOQ [µg/l]
(1)	Kyselina galová	$y = 8,3973x + 1,3231$	0,9912	2,2	7,3
(2)	Gallokatechin	$y = 2,5069x + 0,6965$	0,9933	47,6	158,6
(3)	Kyselina protokatechuová	$y = 4,9822x + 0,4768$	0,9943	4,5	15,2
(4)	Kyselina vanilová	$y = 4,3194x + 2,1542$	0,9913	10,8	36,1
(5)	Epigallokatechin	$y = 0,2659x + 0,0656$	0,9967	12,3	41,1
(6)	Katechin	$y = 1,7898x - 0,1999$	0,9911	57,7	192,2
(7)	Kyselina chlorogenová	$y = 1,5826x - 0,6525$	0,9988	12,4	41,4
(8)	Kyselina kávová	$y = 2,9218x + 0,595$	0,9920	12,4	41,4
(9)	Kyselina syringová	$y = 3,015x + 0,1037$	0,9980	19,8	66,1
(10)	Vanilin	$y = 2,3414x - 0,0188$	0,9883	24,7	82,4
(11)	Epikatechin	$y = 4,2142x + 1,9572$	0,9721	41,9	139,8
(12)	Epigallokatechin galát	$y = 1,0666x + 0,2276$	0,9919	154,0	513,2
(13)	Kyselina ferulová	$y = 7,9784x - 0,7245$	0,9948	113,7	378,9
(14)	Gallokatechin galát	$y = 1,3034x + 1,0655$	0,9852	182,1	607,1
(15)	Kyselina sinapová	$y = 1,7656x + 0,2546$	0,9857	197,4	658,0
(16)	Epikatechin galát	$y = 1,7504x + 0,7848$	0,9857	45,0	150,0
(17)	Kyselina ellagová	$y = 1,1236x + 0,7569$	0,9928	157,8	526,0
(18)	Kvercetin	$y = 4,6244x + 1,2919$	0,9933	9,0	30,1
(19)	Eugenol	$y = 9,2452x + 1,166$	0,9995	12,8	42,7

Nejnižší meze měla kyselina galová, s mezí detekce 2,2 µg/l a mezí stanovitelnosti 7,3 µg/l. Naopak vyšší meze detekce a stanovitelnosti měly flavonoidy, kyselina ellagová a nejvyšší meze měla kyselina sinapová s mezí detekce 197,4 µg/l a mezí stanovitelnosti 658 µg/l.

Rozsah kalibračních řad se pohyboval od 0,025 mg/l do 10 mg/l pro fenolové kyseliny a od 0,05 – 20 mg/l flavonoidy. Každá kalibrační řada byla tvořena nejméně 5 body

(epigallokatechin, vanilin). Kalibrace eugenolu, kvercetinu, gallokatechin galátu a kyseliny protokatechové byly tvořeny dokonce 9 body. Počet bodů kalibrace a rozsah kalibračních řad byl zvolen podle předem odhadnutých koncentrací látek ve vzorcích superpotravin a podle mezí detekce jednotlivých standardních látek. Grafické kalibrační závislosti jednotlivých standardů jsou uvedeny v příloze II. Spolehlivost kalibračních křivek byla vysoká, kalibrační řady byly lineární. Nejlepší hodnotu spolehlivosti měla kalibrace kyseliny chlorogenové ($R^2 = 0,9988$). Naopak nejnižší spolehlivost kalibrace ($R^2 = 0,9721$) měla kalibrační řada epikatechinu.

HPLC-DAD

Pro získání většího množství informací o analyzovaných vzorcích byla použita metoda HPLC-DAD. Tato metoda umožňovala stanovení látek, které nejsou elektrochemicky aktivní. Jedná se o metodu méně citlivou než HPLC-CoulArray, ale touto metodou je možné stanovit všechny polyfenolové látky, protože všechny polyfenolové látky absorbují v UV oblasti díky aromatickým jádrům, obsaženým v jejich struktuře.

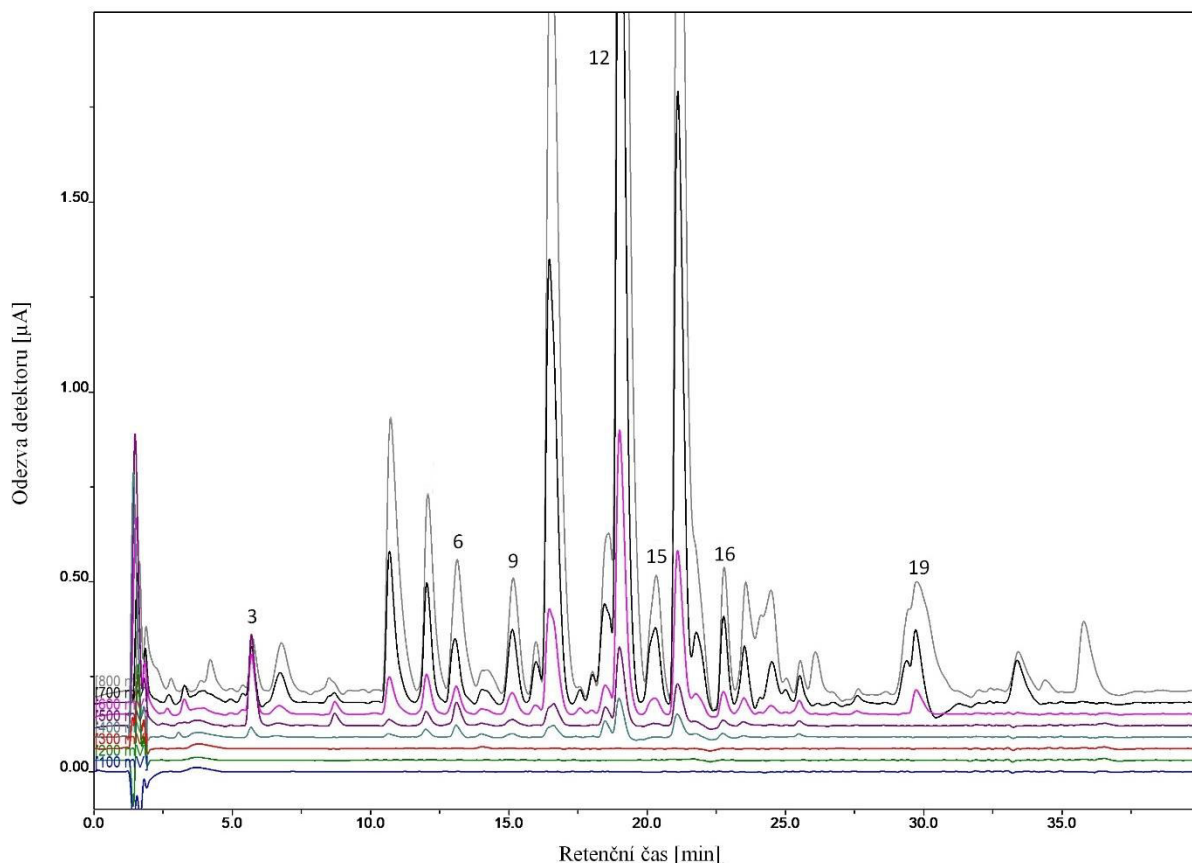
Separace látek pomocí tohoto systému byla provedena na koloně Ascentis Express C18 (150 x 3 mm; 2,7 μm), která byla vyhřívána na teplotu 35 °C. Mobilní fáze byla použita stejná jako při měření s elektrochemickou detekcí, průtok byl zvolen 0,4 ml/min dle parametrů kolony a gradient byl volen pro každý vzorek zvlášť. Na základě prostudované literatury byla zvolena detekce při 280 a 360 nm.

Z naměřených chromatogramů byly látky identifikovány na základě retenčních časů a vlnové délky maxim absorpčních spekter. Obsah látek byl stanoven metodou přímého srovnání.

3.1.3. Polyfenolové látky ve skořici

Vzorek mleté skořice byl nejprve extrahován pomocí extrakce v ultrazvukové lázni. Bylo naváženo 200 mg vzorku, které bylo extrahováno do 50 ml rozpouštědla 15 minut v ultrazvukové lázni. Jako rozpouštědlo byla použita voda, 50% methanol a methanol. Do každého rozpouštědla byly připraveny vždy dva extrakty. Pro porovnání byla vyzkoušena i extrakce mleté skořice v Soxhletově extraktoru. Při extrakci v Soxhletově extraktoru bylo nutné použít větší množství rozpouštědla, tak aby došlo k jeho přepadu. Bylo použito 150 ml rozpouštědla a navážka vzorku byla 600 mg, aby se zachoval stejný poměr vzorek/rozpouštědlo jako při extrakci v ultrazvukové lázni a bylo možné porovnat účinnost obou extrakcí.

Pro porovnání byla analyzována i celá skořice, která byla extrahována také oběma typy extrakce. Pro extrakci v ultrazvukové lázni byl navážen 1 g celé skořice, který byl extrahován do 50 ml rozpouštědla a pro extrakci v Soxhletově extraktoru byl použit 1 g vzorku a 150 ml rozpouštědla. Jako rozpouštědlo byla opět použita voda, 50% methanol a methanol a od každého rozpouštědla byly připraveny dva extrakty a každý extrakt byl proměřen dvakrát. Nejvíce polyfenolových látek bylo vyextrahováno do 50% methanolu. Ukázkový chromatogram analýzy 50% methanolového extraktu mleté skořice je uveden na obrázku 16.



Obrázek 16: Analýza extraktu mleté skořice v 50% MeOH (extrakce pomocí ultrazvuku)

Podmínky analýzy: *Podmínky analýzy:* kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min: 0 % MF B; 20 min: 13 %, 30 min: 40 %, 35 min: 70 %, 40 min: 70 %, dávkovaný objem: 20 µl, detekce: 100-800 mV.

Legenda: 3. kyselina protokatechuová,, 6. katechin, 9. kyselina syringová,, 12. epigallokatechin galát, 15. kyselina sinapová, 16. epikatechin galát, 19. eugenol

Z chromatogramu lze vyčíst, že nejvyšší odezvu měl pík v devatenácté minutě. Tento pík byl identifikován jako epigallokatechin galát. Další z dominantní píky (v 16. a 21. minutě) se nepodařilo identifikovat, ale podle absorpčních spekter těchto látek získaných z pozdější analýzy extraktu pomocí HPLC-DAD lze předpokládat, že se jedná o další katechiny nebo epikatechiny. Dále byla ve vzorku mleté skořice stanovena kyselina protokatechuová, katechin, kyselina syringová, kyselina sinapová, epikatechin galát a eugenol. Vypočítané

koncentrace těchto látek ve vzorku mleté skořice jsou uvedeny v tabulce 8. Odchytky stanovení byly vypořítány vždy ze 4 měření.

Tabulka 8: Obsah polyfenolových látek ve vzorku mleté skořice (ultrazvuk)

Stanovovaná látka	Obsah látky [mg/g] vodný extrakt	Obsah látky [mg/g] extrakt v 50% MeOH	Obsah látky [mg/g] methanolový extrakt
Kyselina protokatechuová	0,20 ± 0,04	0,40 ± 0,09	0,08 ± 0,01
Katechin	1,35 ± 0,05	2,05 ± 0,37	0,91 ± 0,12
Kyselina syringová	0,59 ± 0,02	1,00 ± 0,10	0,31 ± 0,03
Epigallokatechin galát	13,08 ± 1,35	18,58 ± 2,60	7,49 ± 0,62
Kyselina sinapová	0,16 ± 0,03	0,36 ± 0,05	0,04 ± 0,02
Epikatechin galát	< LOQ	1,01 ± 0,19	< LOQ
Eugenol	0,23 ± 0,05	0,60 ± 0,13	0,42 ± 0,09

K identifikaci dalších polyfenolových látek nebyly dostupné standardy a proto nemohly být identifikovány ani kvantifikovány. Nejvíce obsaženou polyfenolovou látkou ve vzorku skořice byl epigallokatechin galát, který se vyextrahoval nejvíce do 50% methanolu v množství 18,6 mg/g vzorku.

V extraktech mleté skořice získaných pomocí Soxhletovy extrakce byly stanoveny stejné látky jako v extraktech získaných metodou extrakce pomocí ultrazvuku. Stanovené koncentrace jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce 9. Směrodatné odchytky byly opět vypořítány ze 4 měření.

Tabulka 9: Obsah polyfenolových látek ve vzorku mleté skořice (Soxhlet)

Stanovovaná látka	Obsah látky [mg/g] vodný extrakt	Obsah látky [mg/g] extrakt v 50% MeOH	Obsah látky [mg/g] methanolový extrakt
Kyselina protokatechuová	0,90 ± 0,05	0,52 ± 0,03	0,13 ± 0,01
Katechin	2,59 ± 0,12	4,28 ± 0,21	1,51 ± 0,02
Kyselina syringová	0,66 ± 0,04	0,51 ± 0,02	0,23 ± 0,01
Epigallokatechin galát	7,30 ± 0,43	17,35 ± 0,75	9,93 ± 0,73
Kyselina sinapová	< LOQ	0,18 ± 0,01	< LOQ
Epikatechin galát	0,74 ± 0,06	1,17 ± 0,03	0,35 ± 0,05
Eugenol	0,40 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,46 ± 0,02

Nejvíce zastoupenou látkou byl i při této metodě extrakce epigallokatechin galát. Celkový profil polyfenolových látek byl při porovnání chromatogramů z obou typů extrakcí velmi podobný. Z důvodu časové náročnosti Soxhletovy extrakce, byla pro další vzorky používána extrakce za použití ultrazvuku. Pro další porovnání účinnosti extrakce, byla analyzována také

skořice celá. Skořice celá byla zakoupena od stejné firmy jako skořice mletá, ale před samotnou extrakcí nebyla skořice namleta nebo drcena, ale byla extrahována vcelku.

I při extrakci celé skořice bylo nejvíce polyfenolových látek vyextrahováno do 50% methanolu. V tabulce 10 jsou uvedeny stanovené polyfenolové látky a jejich koncentrace ve všech rozpouštědlech získané extrakcí pomocí ultrazvuku a v tabulce 11 jsou uvedeny koncentrace stanovených látek po extrakci v Soxhletově extraktoru.

Tabulka 10: Obsah polyfenolových látek ve vzorku celé skořice (ultrazvuk)

Stanovovaná látka	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] vodný extrakt	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] extrakt v 50% MeOH	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] methanolový extrakt
Kyselina protokatechuová	$7,37 \pm 0,51$	$5,98 \pm 0,27$	x
Epigallokatechin galát	< LOQ	$222,05 \pm 12,31$	< LOQ
Eugenol	$21,01 \pm 1,01$	$23,71 \pm 0,89$	$30,89 \pm 0,71$

V extraktech celé skořice získaných pomocí ultrazvuku byla identifikována pouze kyselina protokatechuová, epigallokatechin galát a eugenol. Všechny tyto látky byly obsaženy jen v malých množstvích a jejich koncentrace v tabulce jsou oproti mleté skořici uvedeny v řádově odlišných jednotkách, tedy v $\mu\text{g/g}$. Kyselina protokatechuová byla stanovena v největším množství ve vodném extraktu. Nejvíce zastoupenou látkou byl i v tomto případě epigallokatechin galát, ale jeho množství bylo cca 80x nižší než ve vzorku mleté skořice.

Tabulka 11: Obsah polyfenolových látek ve vzorku celé skořice (Soxhlet)

Stanovovaná látka	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] vodný extrakt	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] extrakt v 50% MeOH	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] methanolový extrakt
Kyselina galová	$35,29 \pm 0,05$	$119,76 \pm 0,07$	x
Kyselina protokatechuová	$24,50 \pm 0,01$	$145,82 \pm 0,08$	$49,55 \pm 0,04$
Katechin	< LOQ	$324,45 \pm 0,06$	$94,49 \pm 0,07$
Epigallokatechin galát	$168,65 \pm 0,07$	$2538,14 \pm 0,08$	$462,32 \pm 0,07$
Epikatechin galát	< LOQ	$375,65 \pm 0,05$	< LOQ
Eugenol	$330,14 \pm 0,08$	$198,59 \pm 0,01$	$284,57 \pm 0,12$

V extraktech celé skořice získaných Soxhletovou extrakcí byly stanovené koncentrace látek opět mnohonásobně nižší oproti mleté skořici. Koncentrace v tabulce jsou opět uvedeny v $\mu\text{g/g}$. Směrodatné odchylky byly vypočítány celkem ze čtyř měření. Oproti extrakci celé skořice v ultrazvuku byla v získaných extraktech navíc stanovena kyselina galová, katechin a epikatechin galát. Dominantní látkou byl i v celé skořici epigallokatechin galát. Ukázkové

chromatogramy extraktu mleté skořice získaného Soxhletovou extrakcí a ukázkové chromatogramy analýzy celé skořice pomocí HPLC-CoulArray jsou uvedeny v příloze III.

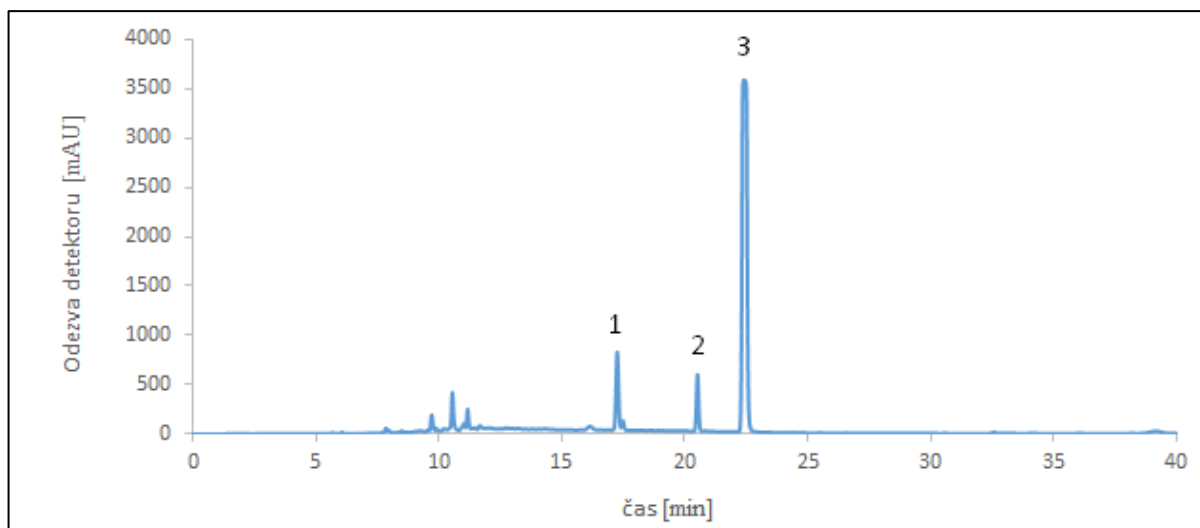
Při analýze mleté skořice byla účinnost obou extrakčních metod srovnatelná. Při porovnání a po vyhodnocení chromatogramů obou typů extrakcí bylo zjištěno, že byly vyextrahovány totožné polyfenolové látky ve velmi podobných koncentracích. Při porovnávání účinnosti extrakce polyfenolových látek z celé skořice bylo patrné, že při obou typech extrakcí byla z celé skořice vyextrahována pouze část z celkových obsažených polyfenolů. Pro extrakci celé skořice se jevila jako vhodnější extrakce v Soxhletově extraktoru, ovšem ze získaných dat bylo jasné, že i tato metoda extrakce nebyla dostačující, a že pro vyextrahování většiny polyfenolových látek ze vzorku je namletí vzorku a tedy jeho povrch velmi důležitým faktorem.

Pro získání dalších informací o vzorku a především pro stanovení polyfenolových látek, které nejsou elektrochemicky aktivní, byla skořice navíc analyzována pomocí metody HPLC-DAD. Všechny polyfenolové látky absorbují v UV oblasti díky aromatickým jádrům obsažených v jejich struktuře. Touto metodou byla ve skořici stanovována kyselina skořicová, kumarin a cinnamaldehyd. Látky byly identifikovány na základě retenčních časů a absorpčních spekter. Absorpční spektra stanovovaných látek jsou uvedena v příloze IV. Stanovené koncentrace látek jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Koncentrace polyfenolových látek v mleté skořici - UV detekce

Stanovovaná látka	Obsah látky [mg/g] vodný extrakt	Obsah látky [mg/g] extrakt v 50% MeOH	Obsah látky [mg/g] methanolvý extrakt
Kumarin	1,88	2,50	2,53
Kyselina skořicová	0,51	0,55	0,56
Cinnamaldehyd	16,26	21,24	23,98

Koncentrace stanovovaných látek byly vypočítány metodou přímého srovnání. Cinnamaldehyd byl stanoven v nejvyšší koncentraci 24 mg/g v methanolvém extraktu skořice. Cinnamaldehyd je látka zodpovědná za štiplavou chuť a vůni skořice. Kyselina skořicová a kumarin byly stanoveny také v poměrně vysokých koncentracích, ale koncentrace epigallokatechin galátu stanoveného pomocí elektrochemické detekce byla vyšší, i když při prvním pohledu na chromatogram (obrázek 17) se zdá, že je obsažen v nižší koncentraci. Důvodem je vyšší odezva kyseliny skořicové a kumarinu při UV detekci a naopak nižší odezva epigallokatechin galátu.



Obrázek 17: Chromatogram vodného extraktu mleté skořice (2x ředění)

Podmínky analýzy: kolona Ascentis Express C18 (150 x 3 mm; 2,7 μm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 0,4 ml/min, dávkovaný objem 10 μl, gradientová eluce: 20 min:40% MF B; 30 min: 50%; 40 min: 70%, detekce: 280 nm.

Legenda: 1. Kumarin, 2. Kyselina skořicová, 3. Cinnamaldehyd

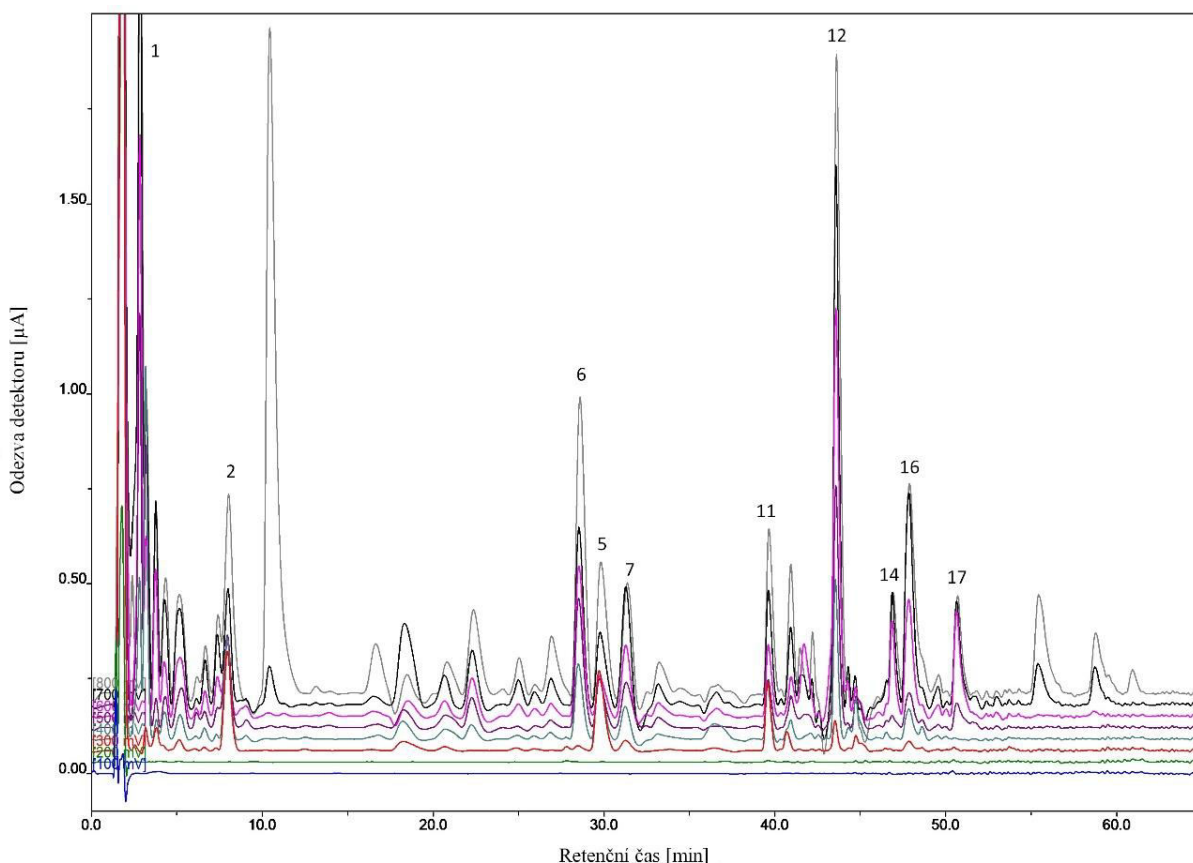
Jak lze vidět na obrázku 18, kumarin, kyselina skořicová i cinnamaldehyd jsou dominantními polyfenolovými látkami ve skořici. Píky zaznamenané kolem 10 minuty představují polyfenolové látky stanovené elektrochemickou detekcí.

Ve vzorku skořice byl tedy cinnamaldehyd majoritní sloučeninou následovaný epigallokatechin galátem a kumarinem. Dále byly ve skořici ve vyšších koncentracích stanoveny kyselina syringová, eugenol, kyselina skořicová. Obsažena byla i kyselina galová, protokatechuová, sinapová a eugenol.

Získané výsledky byly porovnány s dostupnou literaturou. V prostudovaných publikacích byl cinnamaldehyd uváděn jako majoritní polyfenolová sloučenina skořice. **Shan a kol.** stanovili koncentraci cinnamaldehydu ve skořici 16,2 – 17,11 mg/g [9]. Jako další polyfenolové látky v publikacích byly uváděny katechin, kyselina kávová, cinnamylalkohol, kyselina skořicová, katechiny, eugenol, kumarin, kvercetin a proanthokyanidiny. Získané výsledky v této diplomové práci byly podobné výsledkům v dostupných publikacích. Na rozdíl od literárních výsledků se v této práci při analýze skořice nepodařilo stanovit kyselinu kávovou, cinnamylalkohol, kvercetin a proanthokyanidiny. Na druhou stranu se podařilo stanovit kyselinu galovou a deriváty katechinů.

3.1.4. Polyfenolové látky v granátovém jablku

Granátové jablko bylo nejdříve omyto destilovanou vodou, nakrájeno, zrníčka z vnitřku jablka byla vyloupána do třecí misky, ve které byla zrníčka rozmělněna. Uvolněná šťáva ze zrníček byla přefiltrována a analyzována pomocí HPLC-CoulArray. Získaný chromatogram je uveden na obrázku 18.



Obrázek 18: Chromatogram analýzy šťávy z granátového jablka (10x ředění)

Podmínky analýzy: kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min: 0 % MF B; 25 min: 4 %, 35 min: 4 %, 40 min: 10 %, 50 min: 20 %, 55 min: 40 %, 60 min: 70 %, 65 min: 70 %, dávkovaný objem: 20 µl, detekce: 100-800 mV.

Legenda: 1. kyselina galová, 2. gallokatechin, 5. epigallokatechin, 6. katechin, 7. kyselina chlorogenová, 11. epikatechin, 12. epigallokatechin galát, 14. gallokatechin galát, 16. epikatechin galát, 17. kyselina ellagová

Šťáva granátového jablka byla bohatá na polyfenolové látky. Ve šťávě byly obsaženy hlavně katechiny, epikatechiny a jejich deriváty. Elektrochemickou detekcí byla zaznamenána kyselina galová, gallokatechin, katechin, epigallokatechin, kyseliny chlorogenová a syringová, epikatechin, epigallokatechin galát, gallokatechin galát, epikatechin galát a kyselina ellagová. Píky na počátku chromatogramu by mohly být anthokyany – přírodní

barviva. Vypočítané koncentrace stanovených látek včetně odchylek ze tří analýz jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13: Obsah polyfenolových látek ve vzorku šťávy granátového jablka

Stanovovaná látka	Obsah látky [mg/l]
Kyselina galová	15,22 ± 0,48
Gallokatechin	87,38 ± 3,18
Katechin	160,35 ± 2,23
Epigallokatechin	584,22 ± 7,52
Kyselina chlorogenová	91,64 ± 4,11
Kyselina syringová	14,57 ± 0,33
Epikatechin	24,42 ± 1,31
Epigallokatechin galát	343,35 ± 9,85
Gallokatechin galát	46,49 ± 0,96
Epikatechin galát	120,34 ± 1,43
Kyselina ellagová	93,39 ± 4,89

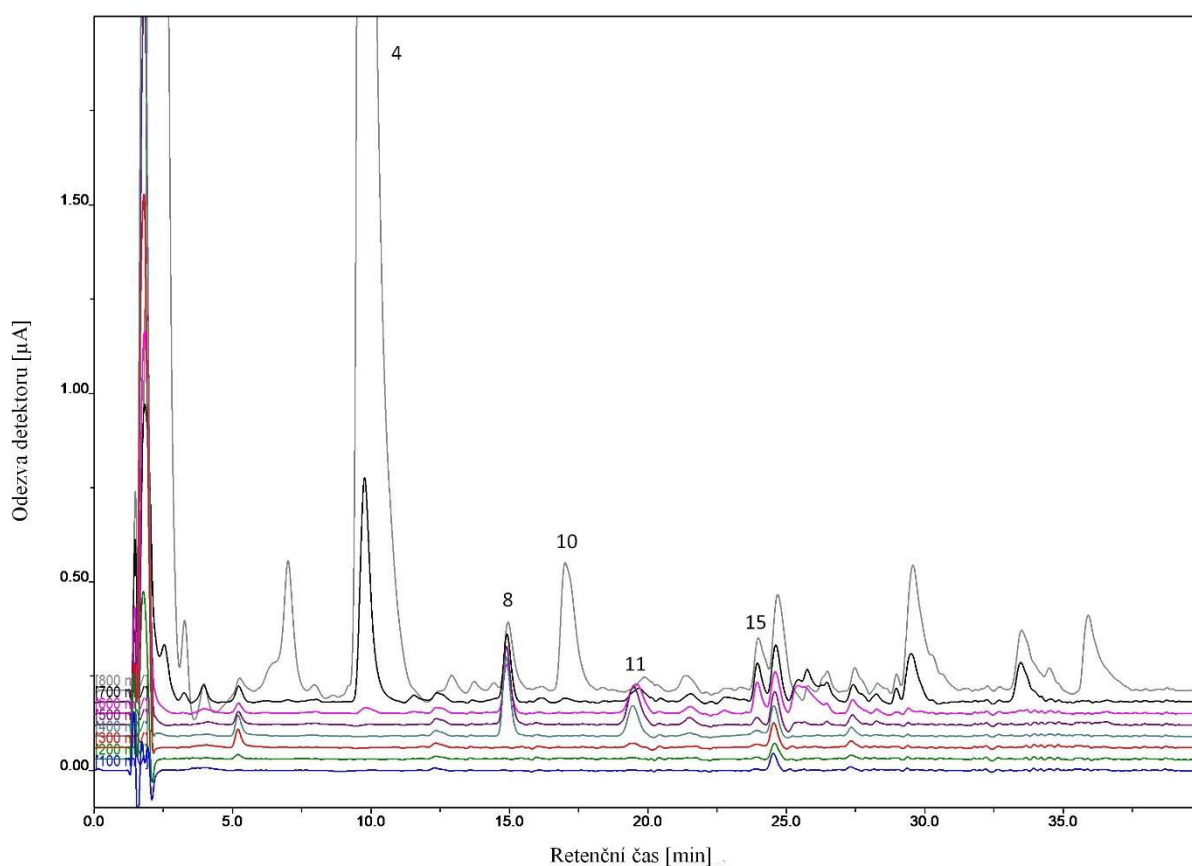
Ze stanovených koncentrací je jasně patrné, že majoritními látkami byly katechin, epikatechin a jejich deriváty. Nejvíce zastoupenou látkou byl epigallokatechin s koncentrací 584 mg/l šťávy, následovaný epigallokatechin galátem, katechinem a epikatechin galátem. Z fenolových kyselin byly ve vyšším množství obsaženy kyselina chlorogenová a kyselina ellagová.

V prostudované literatuře byl při analýzách granátového jablka jako majoritní látka stanoven punikalagin, jejíž obsah se pohybuje v koncentracích od 1,5 do 1,9 g/l. **Jianke a kol.** [18] stanovili ve vzorku granátového jablka katechin, kyseliny ellagovou, galovou, epikatechin, rutin, kyselinu chlorogenovou a kyselinu kávovou. **Gil a kol.** [19] navíc stanovili anthokyany – delfinidin a cyanidin 3-glukosidy.

V porovnání s literaturou se nepodařilo stanovit kyselinu kávovou a rutin. Přírodní barviva – anthokyany také nebyla stanovována. V této práci nebyl stanoven ani punikalagin, ale punikalaginy jsou rozpustné ve vodě a hydrolyzují na nižší fenolové sloučeniny, jako je kyselina ellagová. Kyselina ellagová byla stanovena ve vzorku v koncentraci 93,4 mg/l. Je důležité si také uvědomit, že obsah polyfenolů v granátovém jablku je ovlivněn jak kultivarem, tak klimatickými podmínkami, a proto se obsah polyfenolových látek mezi vzorky může lišit.

3.1.5. Polyfenolové látky v česneku

Čerstvý česnek byl oloupan a nastrouhán. Nejprve bylo nutné optimalizovat velikost navážky a množství rozpouštědla pro extrakci. Protože česnek obsahoval nižší množství polyfenolů než skořice, bylo nutné zvýšit navážku. Pro extrakci polyfenolů z čerstvého česneku byl navážen 1 g vzorku, který byl extrahován do 20 ml rozpouštědla (voda, 50% methanol, methanol) v ultrazvukové lázni 15 minut. Do každého rozpouštědla byly připraveny dva extrakty. Získané extrakty byly přefiltrovány a analyzovány pomocí HPLC-CoulArray. Každý extrakt byl analyzován dvakrát. Ukázkový chromatogram analýzy extraktu čerstvého česneku v 50% methanolu je uveden na obrázku 19.



Obrázek 19: Analýza čerstvého česneku v 50% methanolu

Podmínky analýzy: kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min: 0 % MF B; 20 min: 13 %, 30 min: 40 %, 35 min: 70 %, 40 min: 70 %, dávkovaný objem: 20 µl, detekce: 100-800 mV.

Legenda: 4. kyselina vanilová, 8. kyselina kávová, 10. vanilin, 11. epikatechin, 15. kyselina sinapová

Na ukázkovém chromatogramu lze vidět, že ve vzorku česneku je dominantní látkou kyselina vanilová. Dále byly stanoveny kyselina kávová, vanilin, epikatechin a kyselina sinapová. Vzorek česneku obsahoval několikanásobně méně polyfenolových látek než například vzorek

skořice či granátového jablka. Polyfenolové látky byly zastoupeny v menším množství i koncentracích. Vypočítané koncentrace polyfenolových látek ve vzorku česneku jsou uvedeny v tabulce 14. Směrodatné odchylky byly vypočítány ze čtyř měření.

Tabulka 14: Obsah polyfenolových látek ve vzorku čerstvého česneku

Stanovovaná látka	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] vodný extrakt	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] extrakt v 50% MeOH	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] methanolový extrakt
Kyselina vanilová	758,86 \pm 24,21	951,81 \pm 150,59	240,82 \pm 54,61
Kyselina kávová	16,52 \pm 0,72	23,75 \pm 0,88	< LOQ
Vanilin	69,65 \pm 6,94	106,18 \pm 11,57	x
Epikatechin	4,98 \pm 2,02	4,02 \pm 0,53	x
Kyselina sinapová	< LOQ	42,24 \pm 0,95	x

Majoritní polyfenolovou látkou byla kyselina vanilová o koncentraci 0,95 mg/g, následovaná vanilinem, kyselinou kávovou a kyselinou sinapovou. V malém množství byl ve vzorku stanoven i epikatechin.

Protože v čerstvém česneku nebylo obsaženo mnoho polyfenolových látek, byl pro porovnání analyzován i česnek sušený. Extrakty byly připraveny stejným způsobem jako extrakty čerstvého česneku, byl použit i stejný poměr navážky a rozpouštědla. V tabulce 15 jsou uvedeny koncentrace stanovených polyfenolových látek ve všech extraktech sušeného česneku spolu s odchylkami ze čtyř analýz.

Tabulka 15: Obsah polyfenolových látek ve vzorku sušeného česneku

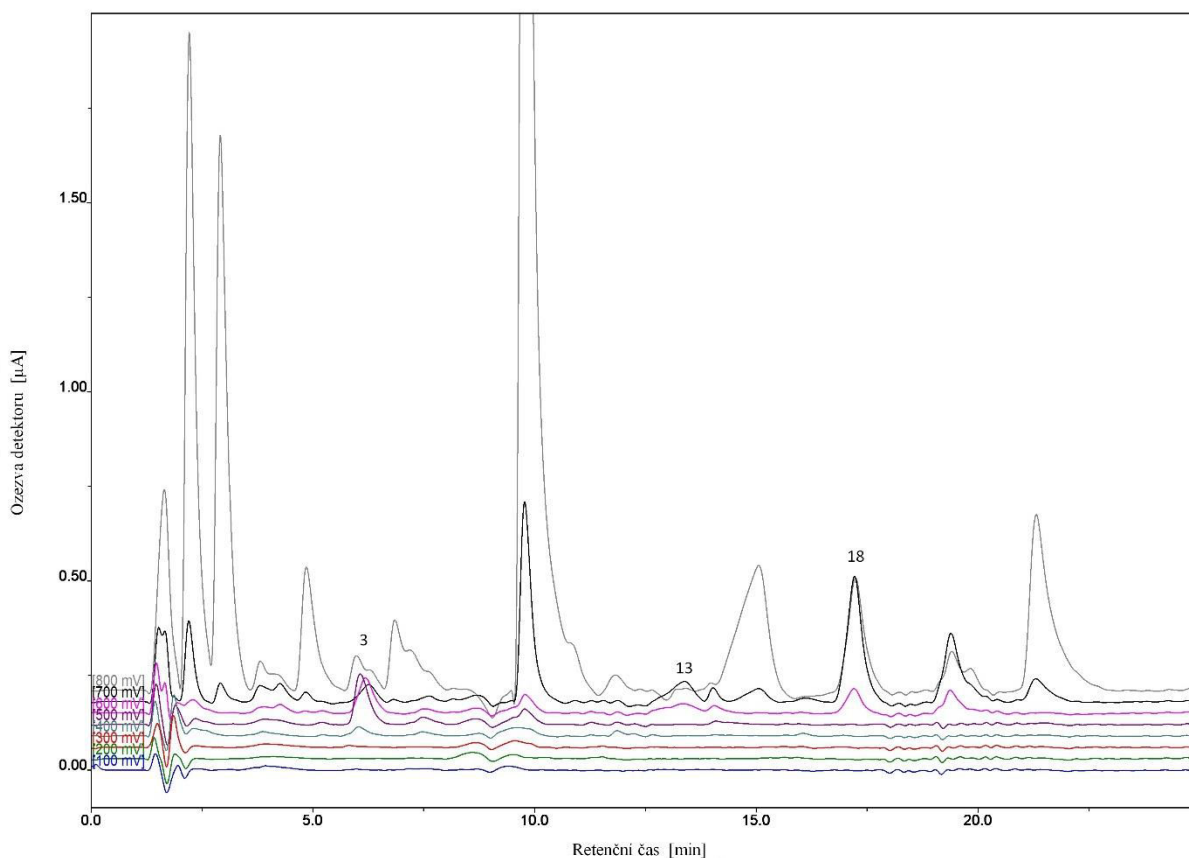
Stanovovaná látka	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] vodný extrakt	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] extrakt v 50% MeOH	Obsah látky [$\mu\text{g/g}$] methanolový extrakt
Kyselina vanilová	505,29 \pm 5,09	381,28 \pm 38,14	26,95 \pm 8,48
Kyselina kávová	73,26 \pm 0,16	70,57 \pm 4,41	17,49 \pm 1,70
Kyselina syringová	113,82 \pm 10,62	50,61 \pm 2,83	x
Kyselina sinapová	31,85 \pm 4,79	33 \pm 4,48	x
Epikatechin galát	118,35 \pm 26,52	9,66 \pm 1,23	x

Z polyfenolových látek se v sušeném česneku vyskytovaly především fenolové kyseliny. Byla stanovena kyselina vanilová, která byla dominantní látkou stejně jako u čerstvého česneku. Koncentrace dominantní látky česneku, kyseliny vanilové, byla v porovnání s čerstvým česnekem v sušeném česneku nižší. Naopak kyselina kávová byla obsažena ve vyšší koncentraci. V sušeném česneku byla navíc stanovena i kyselina syringová a epikatechin galát. Na druhou stranu vanilin, který byl obsažen v čerstvém česneku, nebyl

v extraktech sušeného česneku stanoven stejně jako epikatechin. Rozdíly v obsahu a koncentraci polyfenolových látek ve vzorcích česneku mohou být způsobeny rozdílnou odrůdou česneku, ale i faktem, že čerstvý česnek obsahuje větší množství vody. Ukázkový chromatogram analýzy sušeného česneku je uveden v příloze V. V prostudovaných publikacích [28,30,33] je uváděno, že mezi polyfenolové látky v česneku patří především fenolové kyseliny – kyselina protokatechuová, *p*-hydroxybenzoová, vanilová, kávová, *p*-kumarová, ferulová, a sinapová. Podobných výsledků bylo dosaženo i v této diplomové práci. Ve vzorcích česneku byly stanoveny především fenolové kyseliny – vanilová, kávová, sinapová, syringová.

3.1.6. Polyfenolové látky v konopném semínku

Extrakty konopného semínka byly připraveny stejným způsobem jako extrakty česneku, ale navážka byla dvojnásobná (tedy 2 g). Získané extrakty byly analyzovány pomocí HPLC-CoulArray. Ukázkový chromatogram vodného extraktu je uveden na obrázku 20.



Obrázek 20: Analýza vodného extraktu konopného semínka

Podmínky analýzy: kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min: 0 % MF B; 5 min: 5 %, 10 min: 15 %, 20 min: 70 %, 25 min: 70, dávkovaný objem: 20 µl, detekce: 100-800 mV.

Legenda: 3. kyselina protokatechuová, 13. kyselina ferulová, 18. kvercetin

Dvojnásobná navážka byla volena z důvodu nízkého obsahu polyfenolových látek ve vzorku a tedy za účelem získání koncentrovanějšího extraktu. Do každého rozpouštědla byly připraveny dva extrakty a každý extrakt byl opět analyzován dvakrát. V konopném semínku se podařilo stanovit kyselinu protokatechuovou, ferulovou a kvercetin. Koncentrace látek v jednotlivých extraktech jsou uvedeny v tabulce 16 (Směrodatné odchylky byly vypočítány ze čtyř měření.). Nejvyšší pík na chromatogramu se nepodařilo určit, ale jedná se pravděpodobně o tetrahydrocannabinol (THC). Tetrahydrocannabinol obsahuje ve své struktuře čtyři hydroxylové skupiny, proto lze předpokládat, že bude elektrochemicky aktivní a při elektrochemické detekci bude poskytovat dobrou odezvu. Navíc na základě prostudované literatury je obsah THC několikanásobně vyšší než koncentrace obsažených polyfenolů, což odpovídá poměru píků na získaném chromatogramu [44].

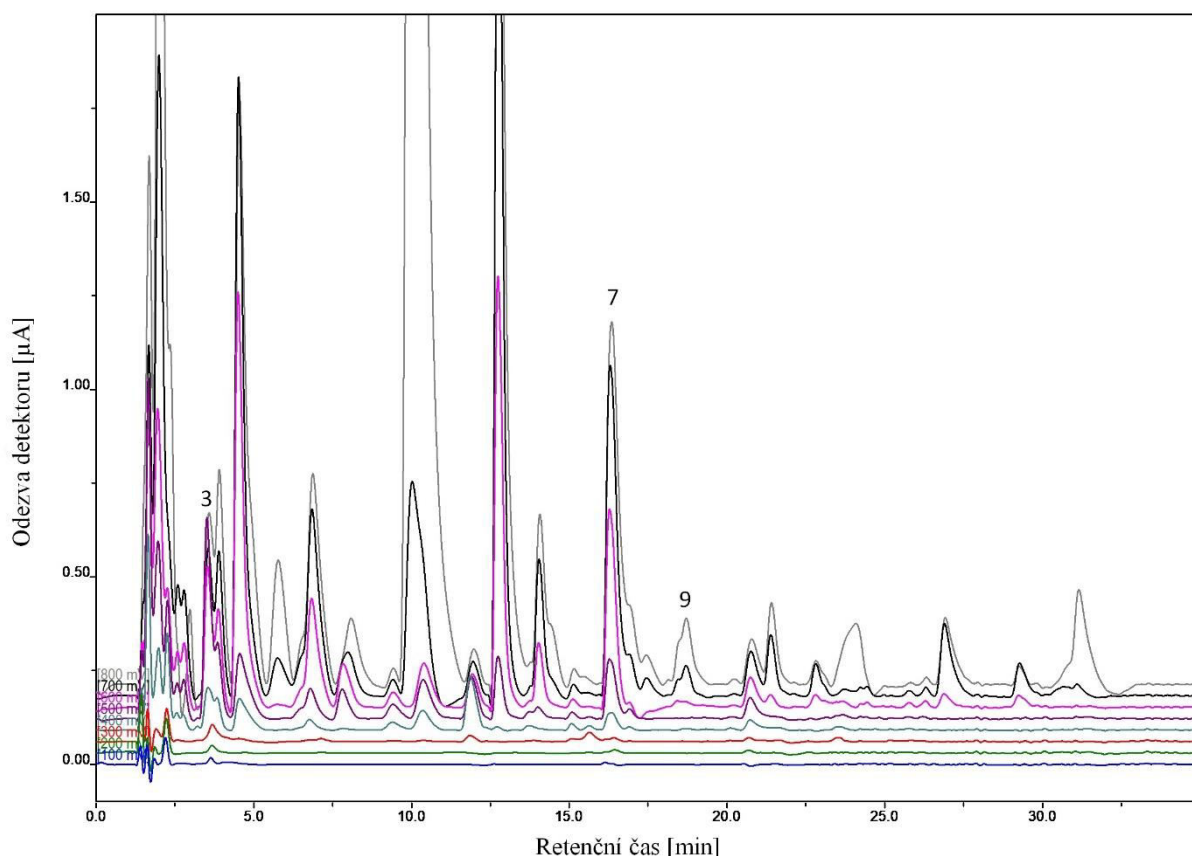
Tabulka 16: Obsah polyfenolových látek ve vzorku konopného semínka

Stanovovaná látka	Obsah látky [µg/g] vodný extrakt	Obsah látky [µg/g] extrakt v 50% MeOH	Obsah látky [µg/g] methanolový extrakt
Kyselina protokatechuová	4,95 ± 0,52	4,76 ± 1,17	1,86 ± 0,11
Kyselina ferulová	2,31 ± 0,11	1,48 ± 0,06	x
Kvercetin	3,61 ± 0,59	6,15 ± 1,48	31,47 ± 0,76

V konopném semínku byl v nejvyšší koncentraci stanoven kvercetin v methanolovém extraktu: 31,5 µg/g V literatuře [99] byly v konopném semínku stanoveny hlavně fenolové kyseliny - kyselina *p*-hydroxybenzoová, vanilová, *p*-kumarová, ferulová a kyselina sinapová. V této diplomové práci se podařilo také stanovit fenolové kyseliny – kyselinu protokatechuovou a kyselinu ferulovou.

3.1.7. Polyfenolové látky v červené řepě

Vzorek červené řepy byl nejprve extrahován pomocí extrakce v ultrazvuku, ale poté byla vyzkoušena analýza šťávy získané z řepy. Při analýze šťávy bylo detekováno více látek, a proto byla analýza šťávy zvolena jako lepší než analýza extraktů. Čerstvá řepa byla nejprve omyta, oloupána a poté odšťavena v odšťavňovači. Získaná šťáva byla přefiltrována přes skládaný a stříkačkový filtr. Takto připravená šťáva byla naředěna a analyzována pomocí HPLC-CoulArray. Ukázkový chromatogram je uveden na obrázku 21.



Obrázek 21: Analýza vzorku šťávy z čerstvé řepy (5x naředěná)

Podmínky analýzy: kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min: 0 % MF B; 5 min: 0 %, 20 min: 15 %, 30 min: 70 %, 35 min: 70 %, dávkovaný objem: 20 µl, detekce: 100-800 mV.

Legenda: 3. kyselina protokatechuová, 7. kyselina chlorogenová, 9. kyselina syringová

Ve šťávě z čerstvé řepy bylo obsaženo vyšší množství polyfenolových látek, a proto musela být čerstvá šťáva před analýzou pětkrát naředěna. Ve šťávě byla stanovena kyselina protokatechuová, kyselina chlorogenová a kyselina syringová. Koncentrace látek jsou uvedeny v tabulce 17 (odchyly vypočteny ze tří analýz). Protože se další píky nepodařilo identifikovat, byla šťáva analyzována navíc ještě pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Na základě absorpčních spekter dominantních píků s absorpčními maximy kolem 450-550 nm a na základě prostudované literatury lze předpokládat, že majoritní píky představují látky ze skupiny přírodních barviv – betalainů.

Tabulka 17: Obsah polyfenolových látek ve vzorku šťávy z čerstvé řepy (5x naředěná)

Stanovovaná látka	Obsah látky [mg/l]
Kyselina protokatechuová	10,54 ± 2,23
Kyselina chlorogenová	75,83 ± 8,69
Kyselina syringová	13,14 ± 0,05

V nejvyšší koncentraci se podařilo ve šťávě z čerstvé řepy stanovit kyselinu chlorogenovou (76 mg/l).

Pro porovnání byla analyzována i šťáva připravená odšťavením nakládané řepy. Ukázkový chromatogram analýzy naředěné šťávy z nakládané řepy pomocí HPLC-CoulArray je uveden v příloze VI. V nakládané řepě se podařilo stanovit stejné polyfenolové látky jako v čerstvé řepě. Navíc byla stanovena kyselina galová v koncentraci 57,7 mg/l. Koncentrace dalších látek jsou uvedeny v tabulce 18.

Tabulka 18: Obsah polyfenolových látek ve vzorku šťávy z konz. řepy (5x naředěná)

Stanovovaná látka	Obsah látky [mg/l]
Kyselina galová	57,65 ± 2,29
Kyselina protokatechuová	86,76 ± 1,36
Kyselina chlorogenová	60,35 ± 0,47
Kyselina syringová	10,02 ± 0,97

V porovnání se šťávou z čerstvé řepy, byla ve šťávě z nakládané řepy stanovena kyselina protokatechuová v osmkrát vyšší koncentraci. Koncentrace kyseliny chlorogenové a syringové se mezi oběma analyzovanými šťávami z řepy lišily jen minimálně.

V literatuře [51,54] jsou jako polyfenolové látky obsažené v červené řepě uváděny kyselina galová (10,8-30,4 mg/l), kyselina syringová (0,895-3,54 mg/l), kyselina kávová (3,03-10,3 mg/l) a kyselina ferulová (0,246-1,24 mg/l). Dále byla v řepě stanovena i kyselina vanilová, *p*-hydroxybenzoová nebo kyselina protokatechuová. Stejně jako v literatuře, i v této diplomové práci byly v červené řepě stanoveny hlavně fenolové kyseliny, nikoliv katechiny nebo flavonoidy. Rozdíl koncentrací některých látek ve šťávě z čerstvé a nakládané řepy a mezi prostudovanými publikacemi, může být způsoben jak kultivarem, tak klimatickými podmínkami.

Většinu z polyfenolových látek v červené řepě tvoří přírodní pigmenty – betalainy. Koncentrace celkového obsahu betalainů v červené řepě je uváděna od 0,8 do 1,68 g/l. Betalainy se dělí na červená barviva betacyanidiny a žlutá barviva betaxanthiny. Z betacyanidinů jsou v červené řepě nejčastěji stanovovány betanin a isobetanin. Podle některých publikací představuje betanin 75-90 % z barviv obsažených v červené řepě. Z betaxanthinů jsou nejčastěji obsaženy vulgaxanthin I a vulgaxanthin II [50-51,53,101].

3.2. Celkový obsah polyfenolových látek ve vzorcích

Analyzované superpotraviny byly mezi sebou porovnávány i z hlediska celkového obsahu polyfenolů. Při stanovení se vycházelo z postupu uvedeného v kapitole 2.4.3. Nejprve byla připravena kalibrační řada roztoků ze zásobního roztoku kyseliny galové v ethanolu ($c = 500 \mu\text{g/ml}$). Kalibrační řada byla připravena v rozsahu od 5 do 200 $\mu\text{g/ml}$, byla tvořena celkem 8 roztoky. Řada kalibračních roztoků byla namíchána ve třech sériích. Naměřené hodnoty absorpce jednotlivých kalibračních roztoků a kalibrační graf jsou k nahlédnutí v příloze VII. Po proměření kalibrační řady byly analyzovány jednotlivé vzorky, které byly podle potřeby naředěny tak, aby byly v rozsahu kalibrační řady. Každý extrakt byl proměřen dvakrát. Výsledné koncentrace celkových polyfenolů ve vzorcích superpotravín jsou uvedeny v tabulkách 19 a 20.

Tabulka 19: Celkový obsah polyfenolů ve vzorcích superpotravín

Vzorek	c [mg GAE/g] vodný extrakt	c [mg GAE/g] extrakt v 50% MeOH	c [mg GAE/g] methanolový extrakt
Skořice mletá (ultrazvuk)	40,55 ± 2,79	73,11 ± 0,44	75,91 ± 1,00
Skořice mletá (Soxhlet)	35,11 ± 0,39	63,93 ± 2,57	61,32 ± 0,67
Skořice celá (ultrazvuk)	0,41 ± 0,05	1,43 ± 0,12	0,21 ± 0,08
Skořice celá (Soxhlet)	1,42 ± 0,17	4,19 ± 0,02	0,63 ± 0,03
Česnek čerstvý	0,39 ± 0,02	0,51 ± 0,01	0,14 ± 0,09
Česnek sušený	1,52 ± 0,06	1,01 ± 0,02	0,09 ± 0,002
Konopné semínko	1,10 ± 0,29	0,26 ± 0,004	0,40 ± 0,06

Tabulka 20: Celkový obsah polyfenolů ve šťávách ze superpotravín

Vzorek	c [mg GAE/ml]
Granátové jablko	1,33 ± 0,004
Červená řepa čerstvá - šťáva	0,51 ± 0,06
Červená řepa nakládaná - šťáva	0,57 ± 0,08

Výsledky stanovení jsou uvedeny v mg GAE/g, či v mg GAE/ml. Zkratka GAE znamená ekvivalent kyseliny galové (z anglického Gallic Acid Equivalent; GAE). Množství polyfenolových látek v mleté skořici mnohonásobně převyšovalo obsah polyfenolových látek v ostatních vzorcích. Nejvíce polyfenolů, téměř 76 mg GAE/g vzorku, bylo stanoveno v methanolovém extraktu mleté skořice. Naopak nejméně polyfenolových látek bylo stanoveno v čerstvém česneku (0,5 mg GAE/g vzorku) a v čerstvé červené řepě (0,5 mg GAE/ml šťávy).

Z rozdílů celkového obsahu polyfenolů v celé a mleté skořici je patrné, že při extrakci látek z celé skořice došlo k vyextrahování pouze části z celkových obsažených polyfenolů. Důvodem menšího výtěžku extrakce celé skořice je pravděpodobně vliv povrchu vzorku, tedy to, že celá skořice byla extrahována vcelku a nebyla před analýzou namleta. Při porovnávání účinnosti metod extrakcí u mleté skořice bylo zjištěno, že při extrakci pomocí ultrazvuku byly stanoveny vyšší koncentrace celkových polyfenolů. V literatuře je uváděno množství celkových polyfenolů ve skořici od 63,4 do 120 mg GAE/g, což odpovídá hodnotám stanoveným i v této diplomové práci.

Hodnoty celkových polyfenolů v dalších vzorcích superpotravin jsou také v literatuře uváděny [20,46,5399,], pro granátové jablko v rozmezí od 0,14 do 10,1 mg GAE/ml, pro červenou řepu 0,473-1,45 mg GAE/ml a hodnota celkových polyfenolů v konopném semínku je uváděna kolem 0,44 mg GAE/g. Tyto hodnoty jsou víceméně podobné hodnotám stanoveným v této práci. Celkové množství polyfenolů v konopném semínku bylo v této práci stanoveno vyšší než v publikacích. Jedním z důvodů vyšší antioxidační aktivity konopného semínka mohl být i ten, že se jednalo o bioprodukt.

Celkový obsah polyfenolů v česneku je uváděn od 0,05 do 0,98 mg GAE/g. Podobné hodnoty byly získány i v této práci. Byl zaznamenán také patrný rozdíl mezi obsahem polyfenolů v čerstvém a v sušeném česneku. V sušeném česneku bylo stanoveno více polyfenolů. Důvodem je vyšší obsah vody v čerstvém česneku [30].

3.3. Stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla stanovena pomocí metody DPPH a ABTS. Pro obě metody byla ke kalibraci využita látka Trolox. Ze zásobního roztoku látky Trolox v ethanolu o koncentraci 250 µg/ml byla připravena řada kalibračních roztoků. Pro metodu DPPH byla připravena kalibrační řada v rozmezí od 5 do 40 µg/ml. Kalibrační řadu tvořilo celkem osm roztoků. Pro metodu ABTS byla připravena kalibrační řada v rozmezí od 25 do 150 µg/ml. Kalibrační řada byla tvořena šesti roztoky. U obou metod byla kalibrační řada připravena vždy ve třech sériích. Tabulky s hodnotami absorbancí a kalibrační grafy pro metodu DPPH a ABTS jsou uvedeny v přílohách VIII a IX. Po proměření kalibrační řady byly analyzovány vzorky. Vzorky byly podle potřeby naředěny, tak aby inhibice odpovídala rozsahu kalibrační řady. Každý extrakt byl měřen dvakrát. Výsledky stanovení antioxidační aktivity jsou uvedeny v hodnotách TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) Výsledky stanovení

antioxidační aktivity ve vzorcích superpotravin metodou DPPH jsou uvedeny v tabulkách 21 a 22.

- DPPH

Tabulka 21: Antioxidační aktivita vzorků superpotravin stanovená metodou DPPH

Vzorek	TEAC [mg/g] vodný extrakt	TEAC [mg/g] extrakt v 50% MeOH	TEAC [mg/g] methanolový extrakt
Skořice mletá (ultrazvuk)	108,99 ± 2,13	188,77 ± 5,20	211,05 ± 7,38
Skořice mletá (Soxhlet)	91,87 ± 0,87	165,07 ± 0,98	190,48 ± 2,14
Skořice celá (ultrazvuk)	0,09 ± 0,01	0,65 ± 0,04	0,24 ± 0,01
Skořice celá (Soxhlet)	0,71 ± 0,04	8,97 ± 0,34	1,87 ± 0,07
Česnek čerstvý	0,15 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Česnek sušený	0,53 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,14 ± 0,01
Konopné semínko	0,02 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,22 ± 0,01

Tabulka 22: Antioxidační aktivita šťáv ze superpotravin stanovená metodou DPPH

Vzorek	TEAC [mg/ml]
Granátové jablko	2,60 ± 0,01
Červená řepa čerstvá - šťáva	0,77 ± 0,01
Červená řepa nakládaná - šťáva	0,79 ± 0,00

Metodou DPPH byla stanovena nejvyšší antioxidační aktivita (211 mg TEAC/g) v methanolovém extraktu mleté skořice. Naopak nejnižší hodnoty TEAC byly stanoveny u čerstvého česneku (0,19 mg TEAC/g) a konopného semínka (0,198 mg TEAC/g), což jsou hodnoty dokonce až 2000x nižší než nejvyšší stanovená hodnota antioxidační aktivity u mleté skořice. Rozdíly mezi vzorky při stanovení celkového množství polyfenolů byly mezi skořicí a ostatními vzorky také veliké, ale poměrově byly asi pouze 100x vyšší než nejmenší stanovené hodnoty celkových polyfenolů ve vzorcích. Z toho vyplývá, že skořice obsahuje velké množství polyfenolových látek s vysokou antioxidační aktivitou.

Pro zajímavost byla antioxidační aktivita ve vzorcích stanovována také metodou ABTS. Hodnoty antioxidační aktivity vzorků superpotravin stanovené metodou ABTS jsou uvedeny v tabulkách 23 a 24.

- ABTS

Tabulka 23: Antioxidační aktivita vzorků superpotravin stanovená metodou ABTS

Vzorek	c [mg TEAC/g] vodný extrakt	c [mg TEAC/g] extrakt v 50% MeOH	c [mg TEAC/g] methanolový extrakt
Skořice mletá ultrazvuk	120,50 ± 15,42	216,47 ± 18,40	232,75 ± 21,39
Skořice mletá soxhlet	101,39 ± 2,18	186,38 ± 4,63	210,49 ± 4,69
Skořice celá ultrazvuk	0,02 ± 0,01	1,55 ± 0,01	0,15 ± 0,14
Skořice celá soxhlet	1,76 ± 0,41	14,43 ± 0,19	4,76 ± 0,02
Česnek čerstvý	1,25 ± 0,02	1,73 ± 0,07	0,83 ± 0,01
Česnek sušený	2,62 ± 0,09	2,60 ± 0,11	0,65 ± 0,14
Konopné semínko	0,81 ± 0,35	1,03 ± 0,05	0,28 ± 0,11

Tabulka 24: Antioxidační aktivita šťáv ze superpotravin stanovená metodou ABTS

Vzorek	mg TEAC/ml
Granátové jablko	7,71 ± 0,27
Červená řepa čerstvá - šťáva	1,97 ± 0,00
Červená řepa nakládaná - šťáva	1,55 ± 0,07

Metodou ABTS byly stanoveny celkově vyšší hodnoty antioxidační aktivity než metodou DPPH, ale poměrově byly stanoveny podobné hodnoty oběma metodami. Nejvyšší antioxidační aktivita byla naměřena i v tomto případě v methanolovém extraktu mleté skořice (233 mg/g). Nejnižší antioxidační aktivitu měl vzorek konopného semínka (1,03 mg/g) a čerstvý česnek (1,73 mg/g).

Výsledky antioxidační aktivity stanovené metodami DPPH a ABTS, byly poměrově podobné i jako v případě stanovení celkového obsahu polyfenolových látek, čímž se potvrdila hypotéza, že obsah polyfenolových látek a antioxidační aktivita spolu úzce souvisí. Z výsledků lze vidět i patrný rozdíl v antioxidační aktivitě mezi mletou a celou skořicí. Antioxidační aktivita celé skořice dosahuje pouze malého zlomku antioxidační aktivity stanovené pro mletou skořici. Stejných poměrů výsledků bylo dosaženo i při stanovení celkových polyfenolů. Antioxidační aktivita čerstvé a nakládané řepy se lišila jen minimálně a opět tyto výsledky korelují s výsledky stanovení celkových polyfenolů, kdy byly stanovené hodnoty v obou analyzovaných šťávách červené řepy velmi podobné. Z výsledků je jasné, že s vyšším množstvím polyfenolů obsažených ve vzorku se zvyšuje i antioxidační aktivita.

4. ZÁVĚR

Tato diplomová práce je zaměřena na analýzu polyfenolových látek ve vybraných superpotravinách pomocí kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí. Ze vzorků superpotravin byla k analýze vybrána skořice, granátové jablko, česnek, konopné semínko a červená řepa. Kromě identifikace a stanovení polyfenolů ve vzorcích bylo stanovováno i celkové množství polyfenolových látek ve vzorcích metodou podle Folin-Ciocalteua a antioxidační aktivita metodami DPPH a ABTS.

Při analýze mleté skořice byla pro zjištění více informací o vzorku použita také kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí DAD, která umožnila stanovení polyfenolových látek, které nejsou elektroaktivní. Nejvyšší množství celkových polyfenolů bylo zjištěno v mleté skořici. Dominantní polyfenolovou látkou v mleté skořici byl cinnamaldehyd, následovaný epigallokatechin galátem, katechinem a kumarinem. Mletá skořice měla i nejvyšší antioxidační aktivitu ze všech vzorků. V granátovém jablku se vyskytovaly hlavně katechiny a epikatechiny: epigallokatechin, epigallokatechin galát, katechin a epikatechin galát. V čerstvém i sušeném česneku byla dominantní polyfenolovou látkou kyselina vanilová. V konopném semínku byl dominantní látkou pravděpodobně tetrahydrocannabinol. V konopném semínku se podařilo stanovit kyselinu protokatechuovou, ferulovou nebo kvercetin. V červené řepě se povedlo stanovit například kyselinu chlorogenovou. Většinu polyfenolových látek v červené řepě představují pravděpodobně betalaniny. Nejmenší množství celkových polyfenolů bylo stanoveno v čerstvém česneku a v červené řepě. Stejně tak byla v těchto vzorcích stanovena i nejnižší antioxidační aktivita. Nízká antioxidační aktivita byla stanovena i v konopném semínku, u kterého byly hodnoty antioxidační aktivity v porovnání s mletou skořicí dokonce cca tisíckrát nižší.

V současné době se zdravý životní styl a zájem o stravu dostává do popředí zájmu a spousta lidí se snaží najít nějakou zázračnou superpotravinu, která by jim zajistila věčné zdraví, krásu nebo mládí, jak občas některé články objevující se v dnešní době na internetu slibují. Po nastudování uvedené problematiky lze konstatovat, že žádná zázračná superpotravin neexistuje. V každé z potravin je obsaženo rozdílné složení polyfenolových látek. Samozřejmě obsah i dalších výživově důležitých látek a jejich účinky jsou také různé. Stále ale platí, že superpotraviny jsou výbornými antioxidanty, jsou zdraví prospěšné. Pro správnou výživu člověka je důležitá hlavně pestrost a vyváženost stravy. Zařazení superpotravin do jídelníčku může být určitě přínosem pro zdraví.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) WOLFE, David. *Superfoods: The Food and Medicine of the Future*. North Atlantic Books, 2010.
- (2) *10 Superfoods That Will Boost Your Energy* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://www.ecowatch.com/10-superfoods-that-will-boost-your-energy-1882045696.html>
- (3) The Healthiest Foods on the Planet. REINHARD, T. *Superfoods*. NY: Firefly Books, 2010
- (4) *Different Types Of Cinnamon And Health Benefits* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://gethealthylivebetter.com/healthy-living/different-types-of-cinnamon-and-health-benefits/>
- (5) *New Study – Cinnamon Reverses, Halts Progression of Parkinson's Disease in Mice* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://nutritionreview.org/2014/07/new-study-cinnamon-reverses-halts-progression-of-perkinson-disease-in-mice/>
- (6) *Cinnamon and diabetes: Effect on blood sugar and overall health* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/317207.php>
- (7) LI, Y., D. KONG a H. WU. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. *Industrial Crops and Products*. 2013, (41), 269– 278.
- (8) SINGH, G., S. MAURYA, M. P. DELAMPASONA a C. A. N. CATALAN. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*. 2007, (45), 1650–1661.
- (9) SHAN, B., Z. C. YIZHONG, M. SUN a H. CORKE. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, (53), 7749-7759.
- (10) AVULA, B., T. J. SMILLIEA, Y. WANGA, J. ZWEIGENBAUMB a I. A. KHAN. Authentication of true cinnamon (*Cinnamomum verum*) utilising direct analysis in real time (DART)-QToF-MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2015, 1 (32), 1-8.
- (11) DING, Yan, En Qi WUA, Chun LIANG, et al. Discrimination of cinnamon bark and cinnamon twig samples sourced from various countries using HPLC-based fingerprint analysis. *Food Chemistry*. 2011, (127), 755–760.

- (12) *9 Health Benefits of Pomegranate, Super fruits* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://www.thehealthbenefitsof.com/9-health-benefits-of-pomegranate-super-fruits/>
- (13) *Pomergranate Juice that Include its Nutrition and Healthy Benefits* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <http://votemyrecipes.com/by-drinks/pomegranate-juice-that-include-its-nutrition-and-healthy-benefits/>
- (14) *5 Serious Side Effects Of Pomegranates* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <http://www.stylecraze.com/articles/serious-side-effects-of-pomegranate/#gref>
- (15) MUSTAFA, Ç., H. YASAR a D. GÖKHAN. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*. 2009, (112), 721-726.
- (16) BOROCHOV-NEORI, H., S. JUDEINSTEIN, E. TRIPLER, M. HARARI, A. GREENBERG, I. SHOMER a D. HOLLAND. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009, (22), 189–195.
- (17) AL-ZOREKY, N.S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*. Saudi Arabia: King Faisal University, 2009, (134), 244–248.
- (18) JIANKE, L., H. XIAOYE, L. MENG Ying, Z. WEI, L. LIU a K. XIANGHONG. Chemical fingerprint and quantitative analysis for quality control of polyphenols extracted from pomegranate peel by HPLC. *Food Chemistry*. 2015, (176), 7-11.
- (19) GIL, M. I., F. A. TOMÁS-BARBERÁN, B. HESS-PIERCE, D. HOLCROFT a A. A. KADER. Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, (48), 4581-4589.
- (20) TEZCAN, F., M. GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, T. DIKEN, B. ÖZÇELİK a F. B. ERİM. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry*. 2009, (115), 873–877.
- (21) *Supercharge the Healing Power of Garlic* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://www.ecowatch.com/supercharge-the-healing-power-of-garlic-1935827407.html>

- (22) *The Suprising Health Benefits of Garlic!* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <http://drtaylorwallace.com/garlic/>
- (23) *Why Is Eating Garlic on an Empty Stomach Good?* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://steptohealth.com/eating-garlic-empty-stomach-good/>
- (24) CALVO-GÓMEZ, O., J. MORALES-LÓPEZ a M. G. LÓPEZ. Solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*. 2004, (1036), 91-93.
- (25) LANZOTTI, V.. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*. 2006, (1112), 3–22.
- (26) TAMAKI, K., S. SONOKI, T. TAMAKI a K. EHARA. Measurement of odour after in vitro or in vivo ingestion of raw or heated garlic, using electronic nose, gas chromatography and sensory analysis. *International Journal of Food Science and Technology*. 2008, (43), 130–139.
- (27) BANERJEE, S. K., Pulok K. MUKHERJEE a S. K. MAULIK. Garlic as an Antioxidant: The Good, The Bad and The Ugly. *Phytotherapy research*. 2003, (17), 97–106.
- (28) SULTANA, B. a F. ANWAR. Flavonols (kaempeferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry*. 2008, (108), 879–884.
- (29) XIONGA, X.J., P.Q. WANG, S.J. LI, X.K. LI, Y.Q. ZHANG a J. WANG. Garlic for hypertension: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytomedicine*. 2015, (22), 352–361.
- (30) BOZIN, B., N. MIMICA-DUKIC, I. SAMOJLIK, A. GORAN a R. IGIC. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*. 2008, (111), 925–929.
- (31) CORZO-MARTINÉZ, M., N. CORZO a M. VILLAMIEL. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*. 2007, (18), 609-625.
- (32) NUUTILA, A. M., R. PUUPPONEN-PIMIA, M. AARNI a K.-M. OKSMAN-CALDENTEY. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 2003, (81), 485-493.
- (33) GORINSTEIN, S., H. LEONTOWICZ, Maria LEONTOWICZ, et al. Comparison of the Main Bioactive Compounds and Antioxidant Activities in Garlic and White and Red Onions

after Treatment Protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, (56), 4418–4426.

(34) TEPE, B., M. SOKMEN, H. A. AKPULAT a A. SOKMEN. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey. *Food Chemistry*. 2005, (92), 89-92.

(35) GORINSTEIN, S., Z. JASTRZEBSKI, J. NAMIESNIK, H. LEONTOWICZ, M. LEONTOWICZ a S. TRAKHTENBERG. The atherosclerotic heart disease and protecting properties of garlic: contemporary data. *Molecular Nutrition & Food Research* 2007, (51), 1365 – 1381.

(36) ARNAULT, I., J.P. CHRISTIDÉS, N. MANDON, T. HAFFNER, R. KAHANE a J. AUGER. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *Journal of Chromatography A*. 2003, (991), 69–75.

(37) *Do Hemp Seeds Contain Healthy Omega-3 Fatty Acids?* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://www.livestrong.com/article/478632-do-hemp-seeds-contain-healthy-omega-3-fatty-acids/>

(38) *6 Reasons Why You Should Eat Hemp Seeds* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://www.ecowatch.com/6-reasons-why-you-should-eat-hemp-seeds-1882096389.html>

(39) *The Amazing Benefits of Hemp Seeds* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://terawarner.com/blog/2010/02/the-amazing-benefits-of-hemp-seeds/>

(40) OOMAH, B. D., M. BUSSONB, D. V. GODFREYA a J. C. G. DROVER. Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*. 2002, (76), 33-43.

(41) PORTO, C. Da, D. DECORTI a F. TUBARO. Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*. 2012, (36), 401-404.

(42) VONAPARTIS, E., M. - P. AUBIN, P. SEGUIN, A. F. MUSTAFA a J. –B. CHARRON. Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015, (39), 8-12.

- (43) MIHOC, M., G. POP, E. ALEXA a I. RADULOV. Nutritive quality of romanian hemp varieties (*Cannabis sativa* L.) with special focus on oil and metal contents of seeds. *Chemistry Central Journal*. 2012, 6 (122), 1-12.
- (44) ESCRIVÁ, Ú., M. JESÚS ANDRÉS-COSTA, V. ANDREU a Y. PICÓ. Analysis of cannabinoids by liquid chromatography–mass spectrometry in milk, liver and hemp seed to ensure food safety. *Food Chemistry*. 2017, (228), 177–185.
- (45) SACILIK, K., R. ÖZTÜRK a R. KESKIN. Some Physical Properties of Hemp Seed. *Biosystems Engineering*. 2003, 86 (2), 191–198.
- (46) YU, L. L., K. K. ZHOU a J. PARRY. Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. *Food Chemistry*. 2005, (91), 723–729.
- (47) *12 Surprising Health Benefits of Beets (You Didn't Know!)* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <http://thenaturalpenguin.com/12-surprising-benefits-of-beet-juice-you-didnt-know/>
- (48) *9 Impressive Health Benefits of Beets* [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/nutrition/benefits-of-beets>
- (49) [online]. [cit. 2018-02-23]. Dostupné z: <https://www.jesmondfruitbarn.com.au/product/beetroot/>
- (50) MARSZAŁEK, K., J. KRZYŻANOWSKA, Ł. WOŹNIAK a S. SKAŁPSKA. Kinetic modelling of polyphenol oxidase, peroxidase, pectin esterase, polygalacturonase, degradation of the main pigments and polyphenols in beetroot juice during high pressure carbon dioxide treatment. *Food Science and Technology*. 2017, (85), 412-417.
- (51) WRUSS, J., G. WALDENBERGER, S. HUEMER, P. UYGUN, P. LANZERSTORFER, U. MÜLLER, O. HÖGLINGER a J. WEGHUBER. Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015, (42), 46-55.
- (52) RAVICHANDRAN, K., A. R. AHMED, D. KNORR a I. SMETANSKA. The effect of different processing methods on phenolic acid content and antioxidant activity of red beet. *Food Research International*. 2012, (48), 16-20.

- (53) WOOTTON-BEARD, P. C. a L. RYAN. A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. *Journal of functional foods*. 2011, (3), 329-334.
- (54) VULIĆ, J., J. ČANADANOVIĆ-BRUNET, G. ČETKOVIĆ, V. TUMBASA, S. DJILASA, D. ČETOJEVIĆ-SIMIN a V. ČANADANOVIĆ. Antioxidant and cell growth activities of beet root pomace extracts. *Journal of functional foods*. 2012, (4), 670-678.
- (55) PAULOVÁ, H., H. BOCHOŘÁKOVÁ a E. TÁBORSKÁ. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*. 2004, (98), 174 – 179.
- (56) SHAHIDI, F. a Y. ZHONG. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*. 2015, (18), 757–781.
- (57) *Phenolic Compounds*. Dostupné z: <http://chemistry.tutorvista.com/organic-chemistry/phenolic-compounds.html> (29. 10. 2017)
- (58) BALASUNDRAM, N., K. SUNDRAM a S. SAMMAN. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006, 1 (99), 191-203.
- (59) NOREEN, H., N. SEMMAR, M.FARMAN aj. S.O. MCCULLAGH. Measurement of total phenolic content and antioxidant activity of aerial parts of medicinal plant *Coronopus didymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017, 10 (8), 792-801.
- (60) ELMASTAS, M., A. DEMIR, N. GENÇ, Ü. DÖLEK a M. GÜNES. Changes in flavonoid and phenolic acid contents in some *Rosa* species during ripening. *Food Chemistry*. 2017, (235), 154-159.
- (61) TELLES, A. C., L. KUPSKI a E. B. FURLONG. Phenolic compound in beans as protection against mycotoxins. *Food Chemistry*. 2017, (214), 239-299.
- (62) GONG, E. S., S. LUO, T. LI, Ch. LIU, G. ZHANG, J. CHEN, Z. ZENG a R. H. LIU. Phytochemical profiles and antioxidant activity of processed brown rice products. *Food Chemistry*. 2017, (232), 67-78.
- (63) CARTEA, M. E et al.: Phenolic Compounds in Brassica Vegetables, *Molecules*, 2011, (16), 251.

- (64) TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2010, 2 (12), 1231-1246.
- (65) CURIN, Y, ANDRIANTSITOHAINA, R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascul diseases. *Pharmacological Reports*, 2005, (57), 97-107
- (66) WALTERS, M., A. P. L. RIBEIRO, F. HOSSEINIAN a A. TSOPMO. Phenolic acids, avenanthramides, and antioxidant activity of oats defatted with hexane or supercritical fluid. *Journal of Cereal Science*. 2017, 79 (2018), 21-26.
- (67) SLANINA, J. a E. TÁBORSKÁ. Příjem, biologická dostupnost a metaolismus rostlinných polyfenolů u člověka. *Chemické Listy*. 2004, (98), 239 – 245.
- (68) PASCUAL-TERESA, S., C. SANTOS-BUELGA aj. C. RIVAS-GONZALO. Quantitative Analysis of Flavan-3-ols in Spanish Foodstuffs and Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, (48), 5331-5337.
- (69) TEHRANIFARA, A., M. ZAREIA, Z. NEMATIA, B. ESFANDIYARIA a M. R. VAZIFESHENAS. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*. 2010, (126), 180-185.
- (70) DANTULURI, M., G. T. GUNNARSSONA, M. RIAZA, H. NGUYENA a U. R. DESAI. Capillary electrophoresis of highly sulfated flavanoids and flavonoids. *Analytical Biochemistry*. 2005, (336), 316-322.
- (71) *Sigma Aldrich* [online]. [cit. 2017-12-06].
- (72) PAULA, R. D., I. RABALSKIB, M. C. MESSIAA, E. M. ABDEL-AALB a E. MARCONI. Effect of processing on phenolic acids composition and radical scavenging capacity of barley pasta. *Food Research International*. 2017, (102), 136-143.
- (73) ROBBINS, R. J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51 (10), 2866-2887
- (74) *Lignany – jejich zdroje a účinky – na co jsou dobré?* Dostupné z: <http://www.rehabilitace.info/zajimavosti/lignany-jejich-zdroje-a-ucinky-na-co-jsou-dobre/> (29. 10.2017)

- (75) *Lignany v potravinách a ve výživě*. Dostupné z: <https://www.celostnimediceina.cz/lignany-v-potravinach-a-ve-vyzive.htm> (29. 10.2017)
- (76) PALDRYCHOVÁ, M. Stilbeny - fytoalexiny se širokým potenciálem. Praha: *Bioprospect*, 2015, 25 (4), 85-89.
- (77) CHURÁČEK, J., Analytická separace látek, Praha: *Státní nakladatelství technické literatury*, 1990, 384.
- (78) SPORRING, S., S.BOWADT, B. SVENSMARK a E. BJÖRKLUND. Comprehensive comp. of classic Soxhlet ext. with Soxtec ext., ultrasonication ext., supercritical fluid ext., microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1-2 (1090), 1-9.
- (79) KRAHN, M. M., G. M. YLITALO, J. JOSS a S. CHAN. Rapid, semi-quantitative screening of sediments for aromatic compounds using sonic extraction and HPLC/fluorescence analysis. *Marine Environmental Research*. 1991, 3 (31), 175-196.
- (80) CHAMBERS, L. A. a E. W. FLOSDORF. Sonic Extraction of Labile Bacterial Constituents. *Johnson Foundation for Medical Physics and the Departments of Bacteriology and Pediatrics*, University of Pennsylvania 1936, 5 (34), 631.
- (81) LUQUE DE CASTRO, M. D. a L. E. GARCÍA-AYUSO. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*. 1998, (1-2), 369
- (82) HAWTHORNE, S. B., C. B. GRABANSKI, E. MARTIN a D. J. MILLER. Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A*. 2000, 1-2 (892), 421-433.
- (83) – PŘICHYSTAL, J. Analýza markerů pro charakterizaci levandule a levandulového oleje. Bakalářská práce: *Univerzita Palackého v Olomouci*. 2012, 58-61.
- (84) LINDSAY, S.. Analytical Chemistry by Open Learning: High Performance Liquid Chromatography. 2. London: *John Wiley*, 1992, 15-16
- (85) ENGELHARDT, H.. High Performance Liquid Chromatography. New York: *Springer-Verlag Berlin-Heidelberg*, 1979.

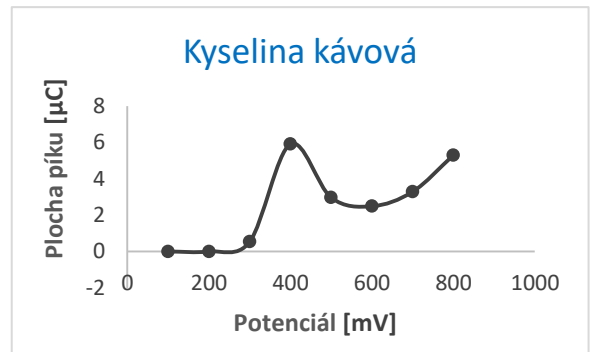
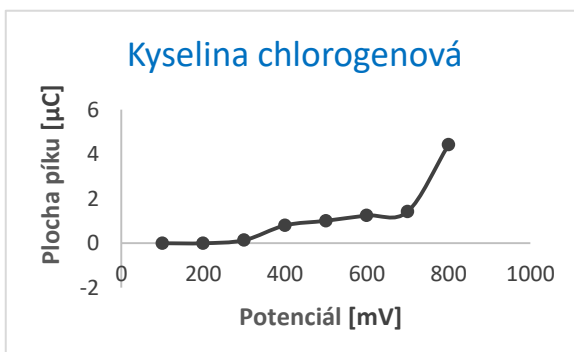
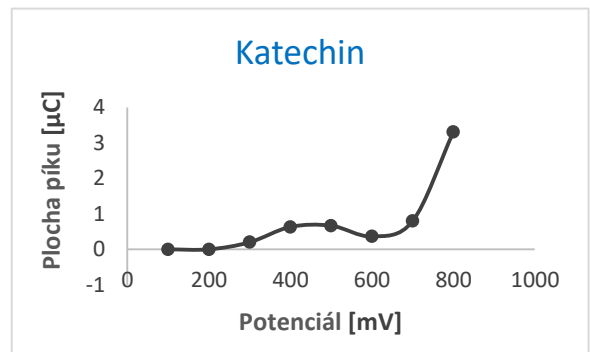
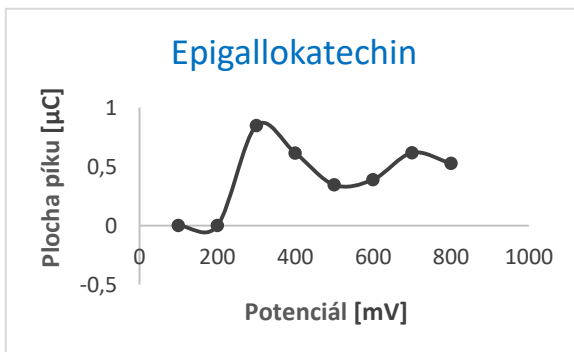
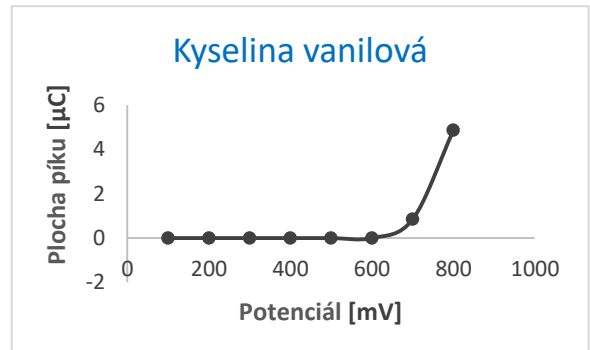
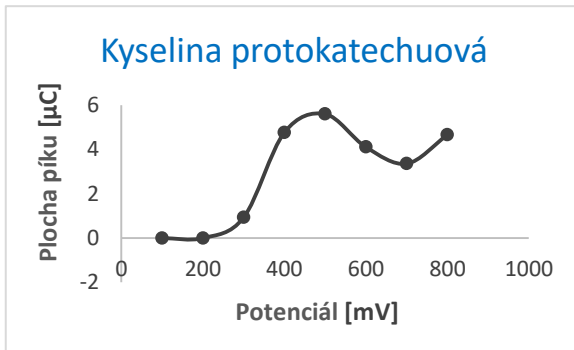
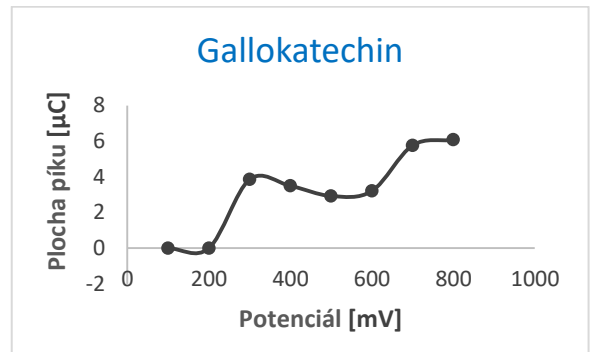
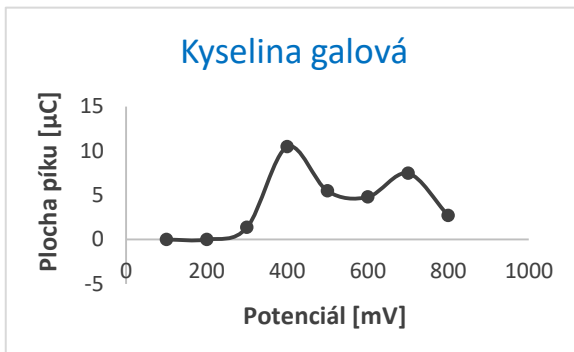
- (86) – YEUNG, E. S. a R. E. SYNOVEC. Detectors for liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 1986, , 1237A–1256A.
- (87) MEYER, V. R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. Chichester: *John Wiley & Sons*, 2004.
- (88) HARRIS, D. C. Exploring chemical analysis. New York: *W. H. Freeman*, 2009.
- (89) KENKEL, J. Analytical chemistry for technicians. Boca Raton: *Lewis Publishers*, 2003.
- (90) *Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of MycobacteriumSpecies* [online]. [cit. 2017-12-28]. Dostupné z: <http://cmr.asm.org/content/14/4/704/F1.expansion.html>
- (91) *Elektrochemické HPLC detektory* [online]. [cit. 2017-12-31]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/Teorie/EC_detector.html
- (92) KISSINGER, P. T. Amperometric and coulometric detectors for high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry* 1977, 49 (4), 447A–456A.
- (93) KISSINGER, P. T., C. REFSHAUGE, R. DREILING a R. N. ADAMS. An Electrochemical Detector for Liquid Chromatography with Picogram Sensitivity. *Analytical Letters*. 1973, 5 (6), 465-467.
- (94) BEŇOVÁ, B. Studium možností detekce vybraných biologicky aktivních látek při analýze vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Disertační práce. *Univerzita Pardubice*, 2008.
- (95) CHENG, S., J. LIU, Y. HSUI a S. CHANG. Chemical polymorphism and antifungal activity of essential oils from leaves of different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*). *Bioresource Technology*. 2006, (97), 306-312.
- (96) BAE, S. E., S. Y. CHO, Y. D. WON, S. H. LEE a H. J. PARK. A comparative study of the different analytical methods for analysis of S-allyl cysteine in black garlic by HPLC. *Food Science and Technology*. 2012, (46), 532-535.
- (97) CHANGJIANG, G., G. CAO, E. SOFIC a R. L. PRIOR. High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Coulometric Array Detection of Electroactive Components in Fruits and Vegetables: Relationship to Oxygen Radical Absorbance Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, (45), 1787-1796.

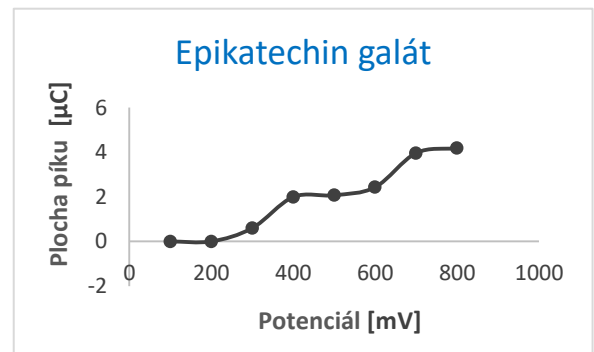
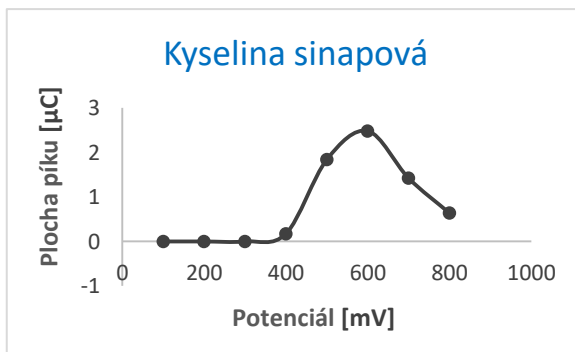
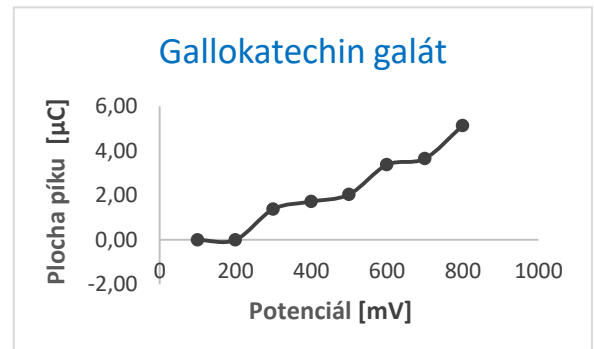
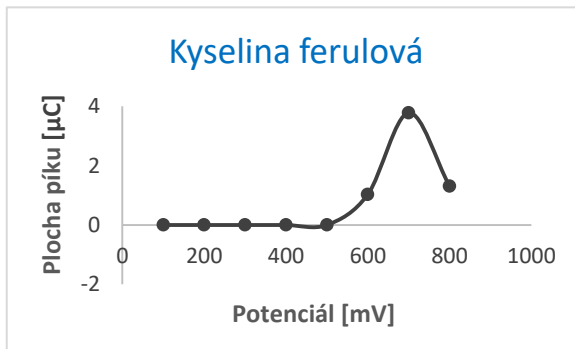
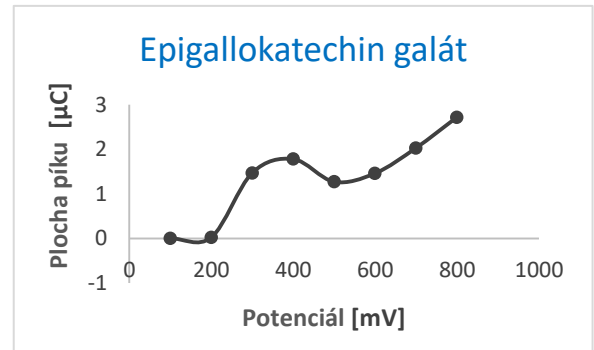
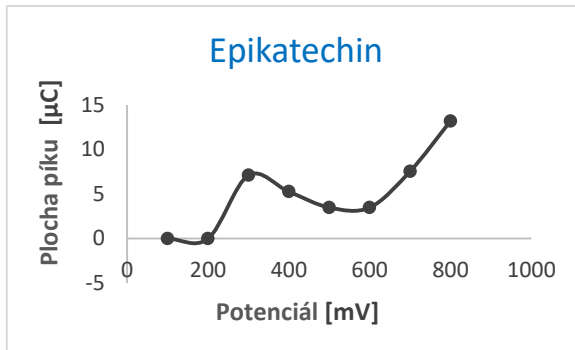
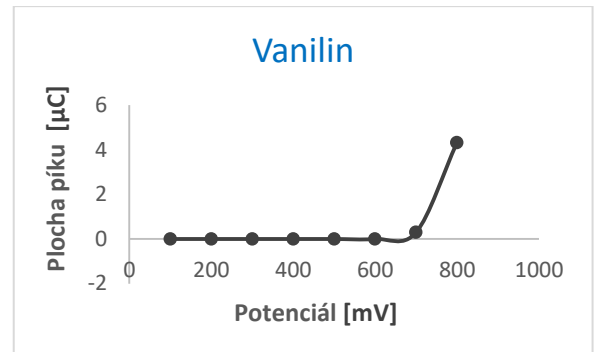
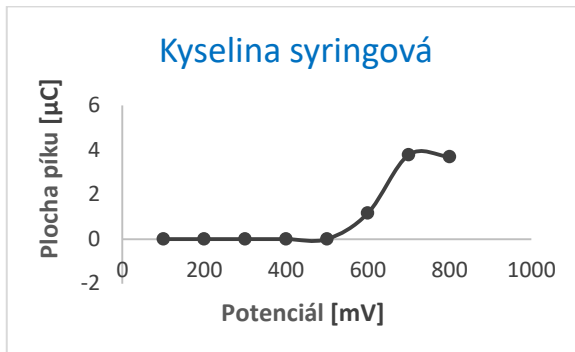
- (98) SUE-SIANG, T. a E. J. BIRCH. Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014, (21), 346–353.
- (99) SIGER, A., M. NOGALA-KALUCKA a E. LAMPART-SZCZAPA. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*. 2008, (15), 137–149.
- (100) VULIĆ, J. J., T. N. ĆEBOVIĆ, J. M. ČANADANOVIĆ-BRUNET, G. S. ĆETKOVIĆ, V. M. ČANADANOVIĆ, S. M. DJILASA a V. T. TUMBAS ŠAPONJAC. In vivo and in vitro antioxidant effects of beetroot pomace extracts. *Journal of functional foods*. 2014, (6), 168-175.
- (101) KUJALA, T. S., J. M. LOPONEN, K. D. KLIKA a K. PIHLAJA. Phenolics and Betacyanins in Red Beetroot (*Beta vulgaris*) Root: Distribution and Effect of Cold Storage on the Content of Total Phenolics and Three Individual Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, (48), 5338-5342.
- (102) FISSORE, E. N., A. M. ROJAS, L. N. GERSCHENSON a P. A. WILLIAMS. Butternut and beetroot pectins: Char. and functional prop.. *Food Hydrocolloids*. 2013, (31), 172-182.
- (103) WOOTTON-BEARD, P. C., A. MORAN a L. RYAN. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. *Food Research International*. 2011, (44), 217–224.
- (104) JAKUBCOVÁ, Lucie. *Analýza polyfenolických látek v tzv. super potravinách*. 2014. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Blanka Švecová, Ph.D.
- (105) MACHAČOVÁ, Andrea. *Analýza polyfenolických látek v super potravinách II*. 2015. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Blanka Švecová, Ph.D.
- (106) HAMERSKÁ, Radka. *Analýza polyfenolických látek v superpotravinách III*. 2016. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Blanka Švecová, Ph.D.
- (107) KREJČOVÁ, Dana. *Analýza významných bioaktivních látek ve stévii sladké*. 2012. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Blanka Beňová, Ph.D.

6. PŘÍLOHY

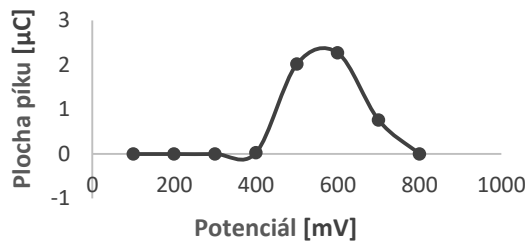
- I Hydrodynamické voltamogramy standardních látek
- II Kalibrační závislosti standardů
- III Ukázkové chromatogramy analýzy skořice pomocí HPLC-CoulArray
- IV Absorpční spektra látek stanovovaných ve skořici
- V Ukázkový chromatogram analýzy sušeného česneku pomocí HPLC-CoulArray
- VI Ukázkový chromatogram analýzy nakládané řepy pomocí HPLC-CoulArray
- VII Kalibrace stanovení celkového obsahu polyfenolů
- VIII Kalibrace stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH
- IX Kalibrace stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Příloha I: Hydrodynamické voltamogramy standardních látek

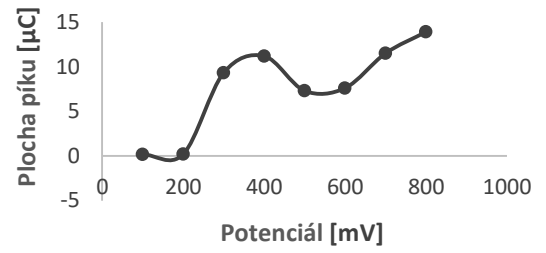




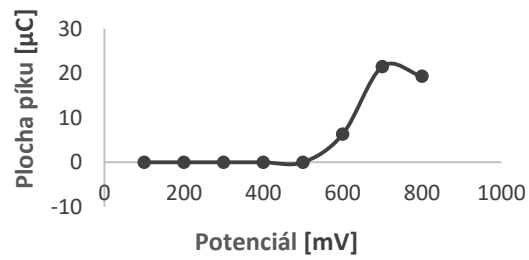
Kyselina ellagová



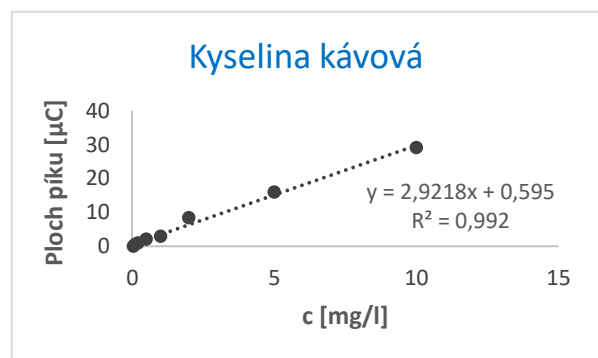
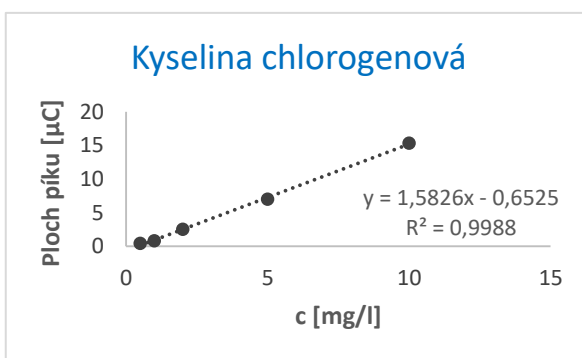
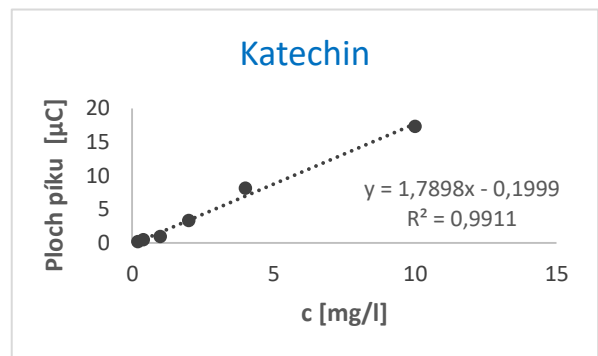
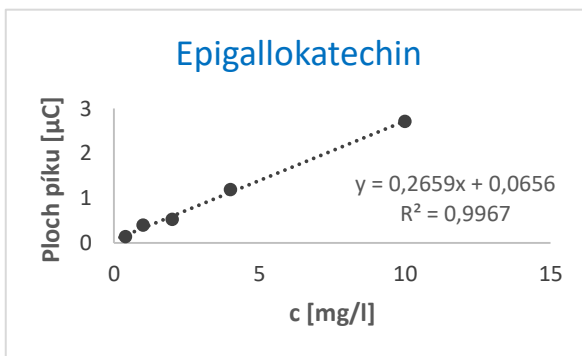
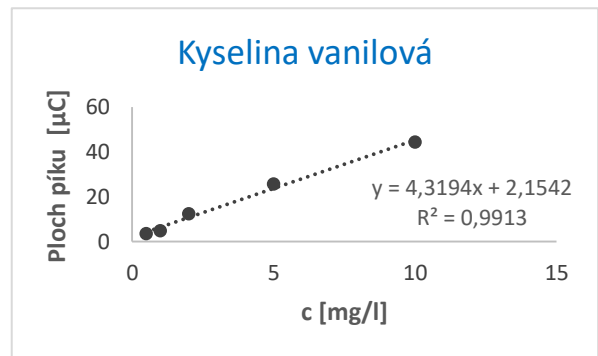
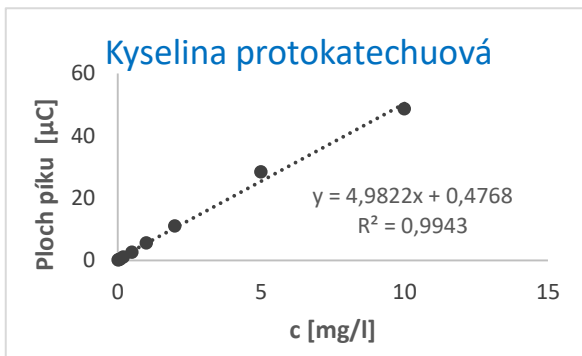
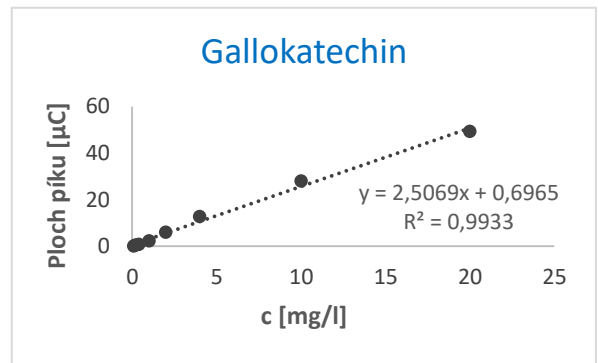
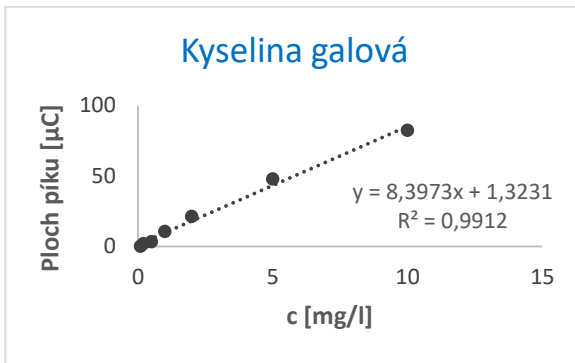
Kvercetin

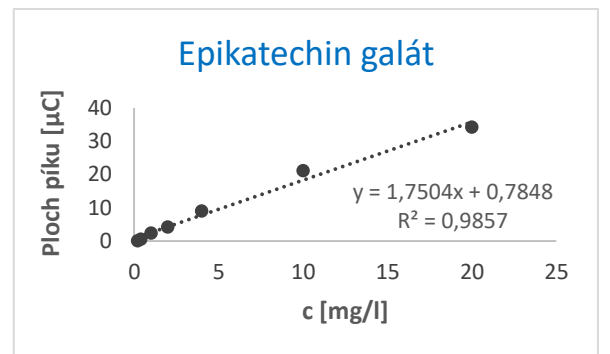
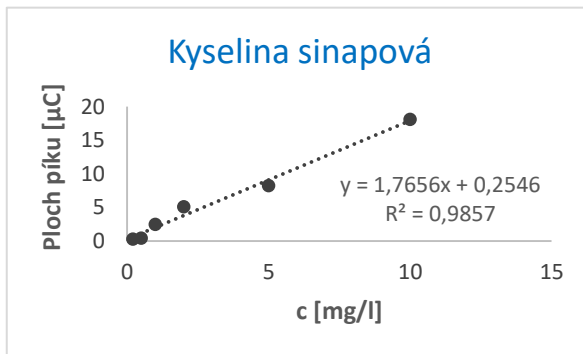
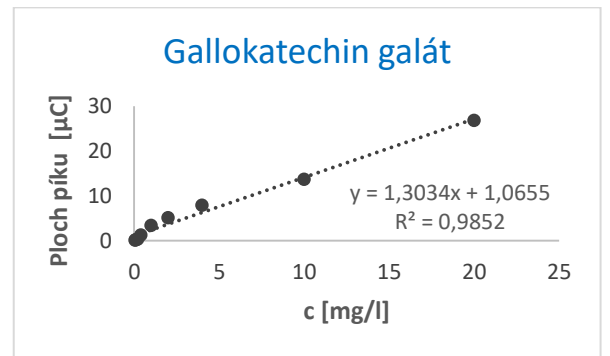
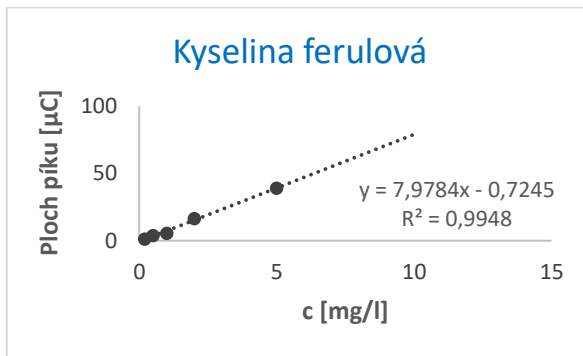
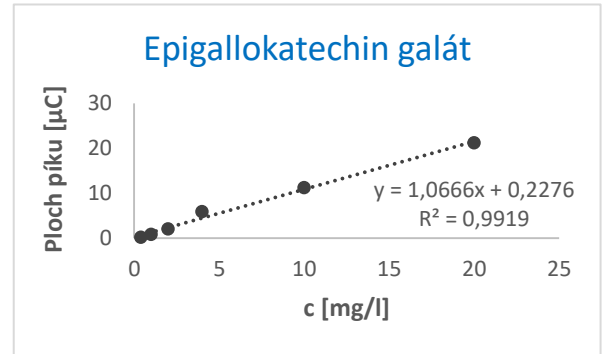
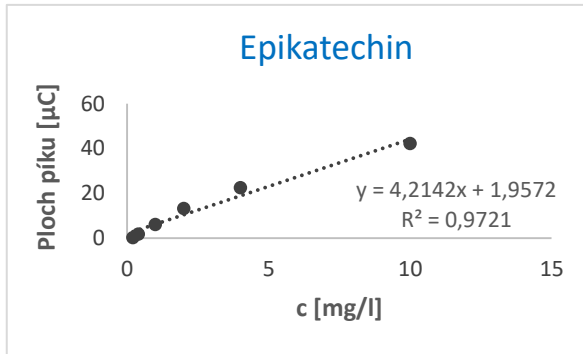
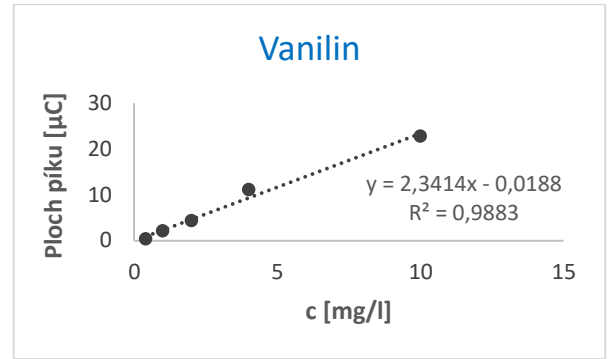
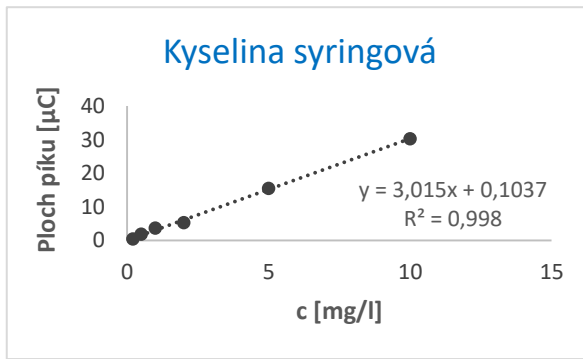


Eugenol

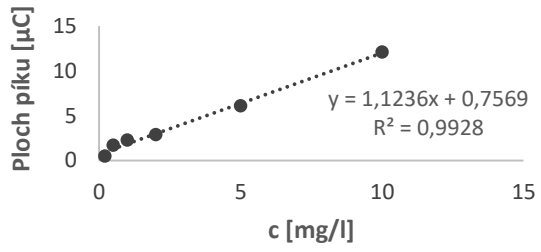


Příloha II: Kalibrační závislosti standardů

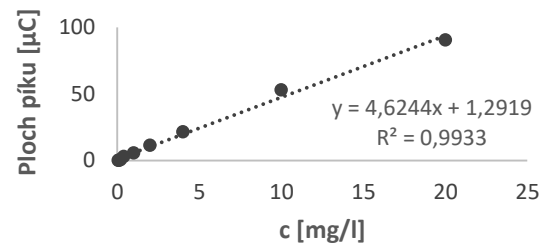




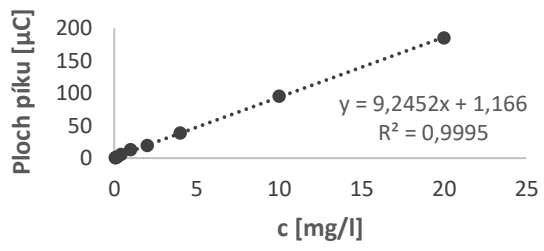
Kyselina ellagová



Kvercetin

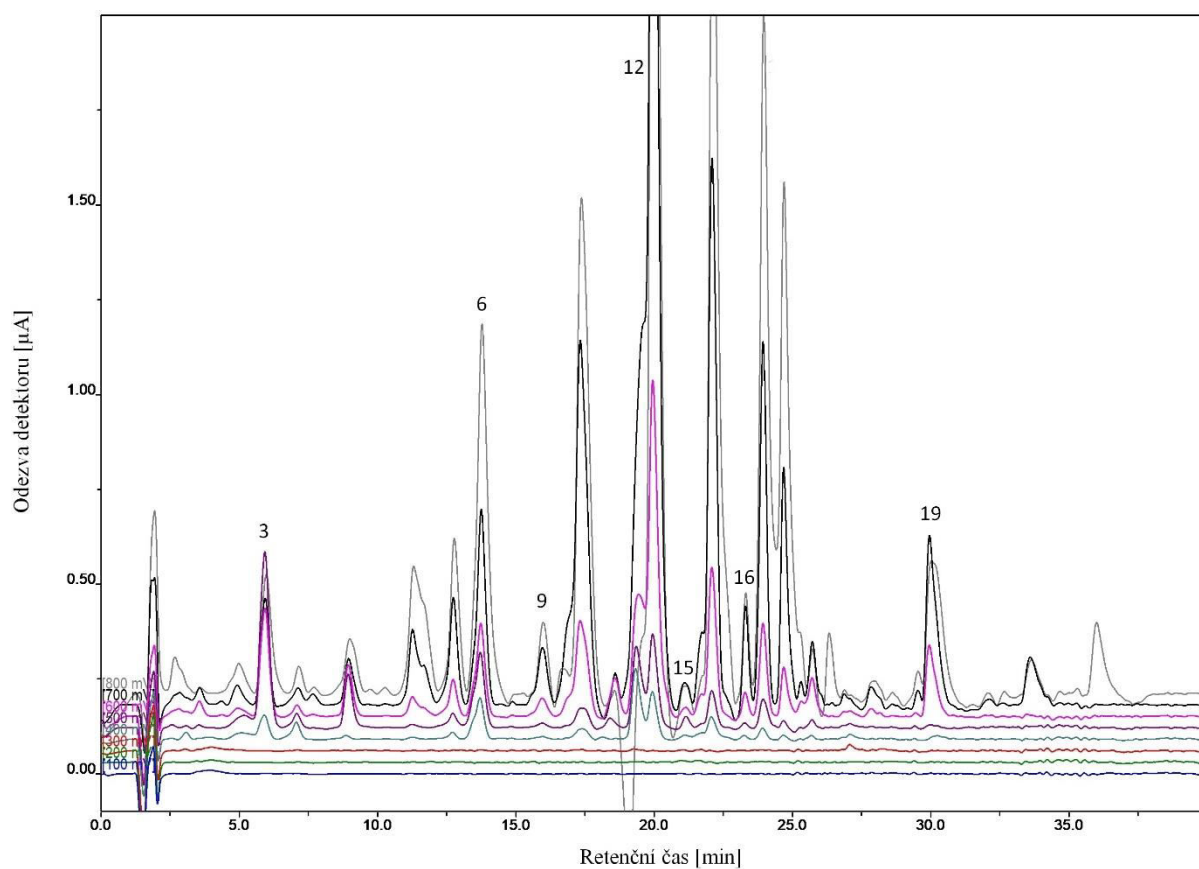


Eugenol



Příloha III: Ukázkové chromatogramy analýzy skořice pomocí HPLC-CoulArray

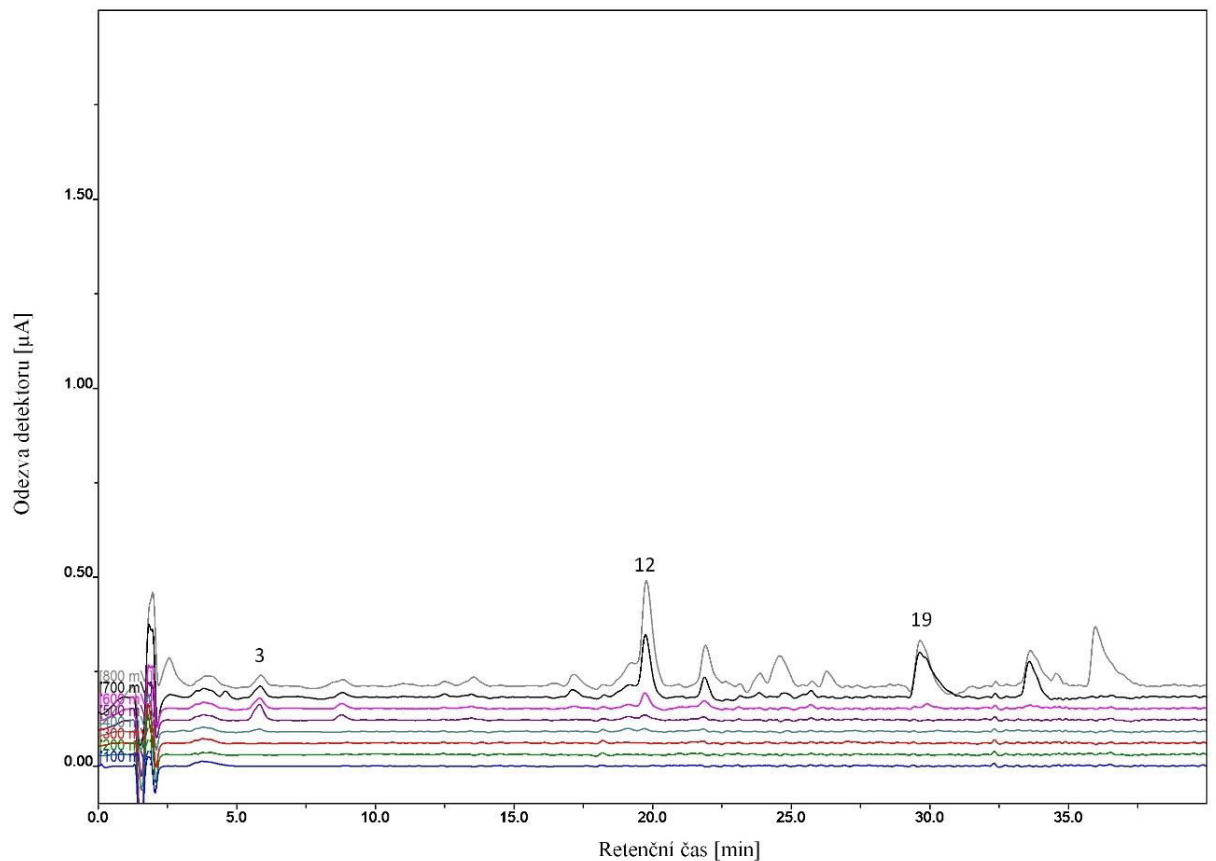
Analýza extraktu mleté skořice v 50% methanolu (Soxhletova extrakce)



Podmínky analýzy: kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min:0 % MF B; 20 min: 13 %; 30 min: 40%; 35 min: 70 %; 40 min: 70 %; detekce: 100-800 mV.

Legenda: 3. kyselina protocatechuová,, 6. katechín, 9. kyselina syringová,, 12. epigallokatechín galát, 15. kyselina sinapová, 16. epikatechín galát, 19. eugenol

Analýza extraktu celé skořice v 50% methanolu(extrakce pomocí ultrazvuku)

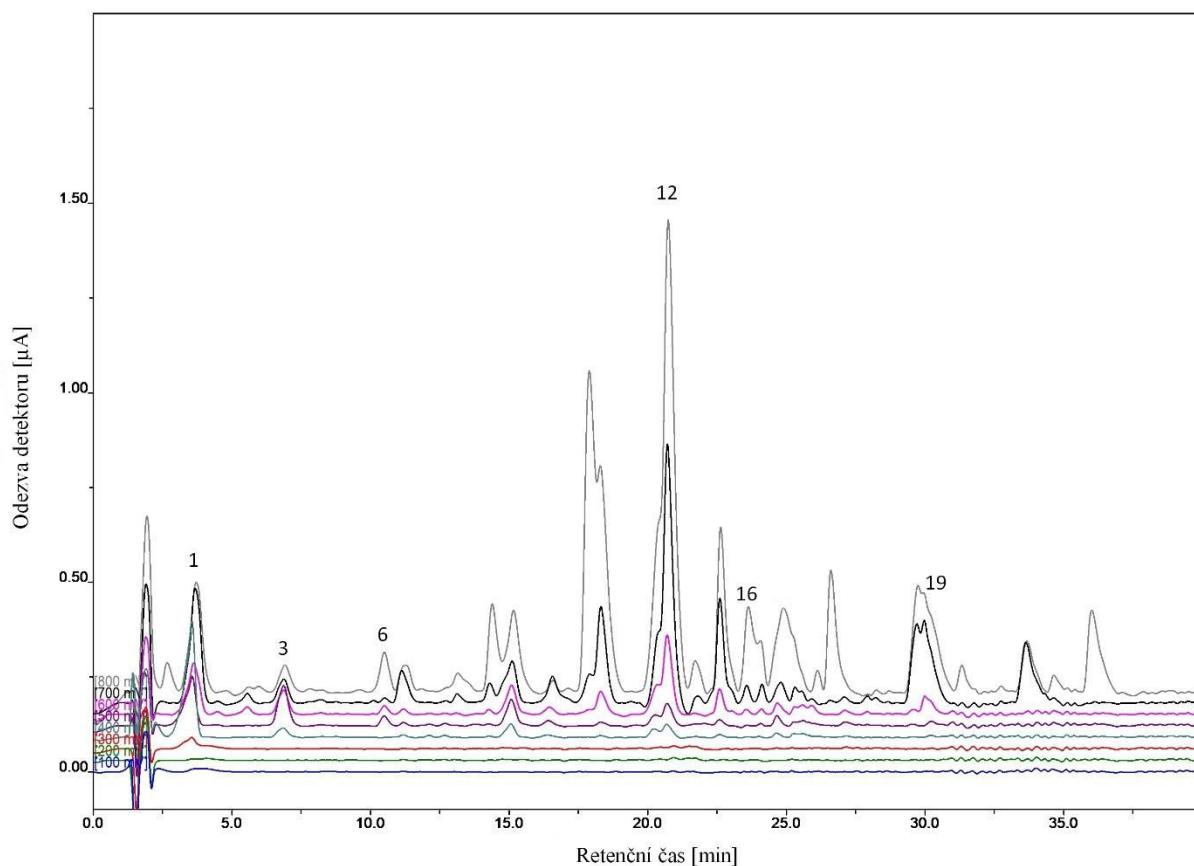


Podmínky analýzy: kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min:0 % MF B; 20 min: 13 %; 30 min: 40%; 35 min: 70 %; 40 min: 70 %; detekce: 100-800 mV.

Legenda: 3. kyselina protokatechuová, 12. epigallokatechin galát, 19. eugenol

Poznámka: Ukázkový chromatogram je uveden ve stejném měřítku jako ostatní chromatogramy, aby bylo možné vizuální porovnání stanovených koncentrací látek.

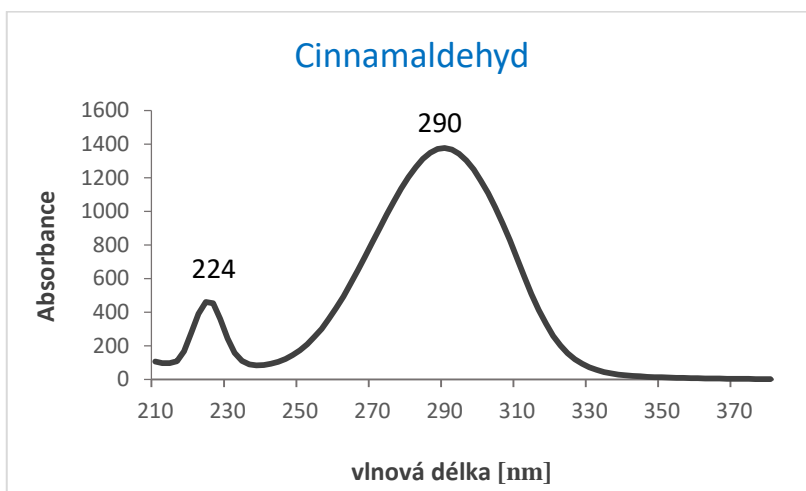
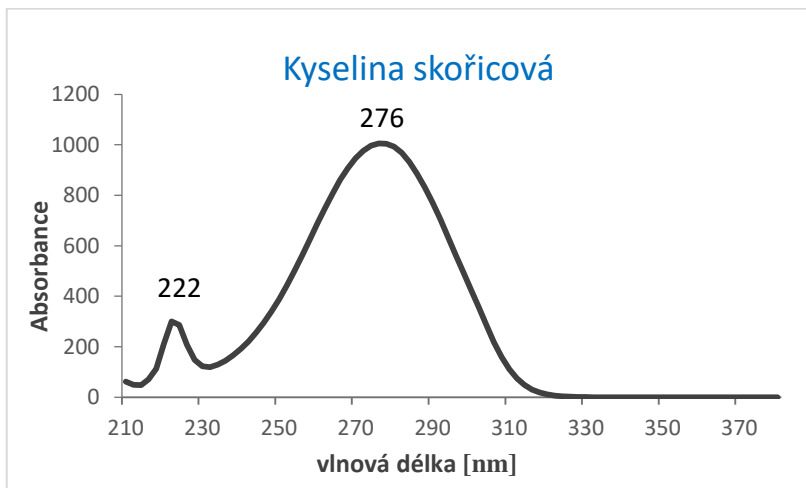
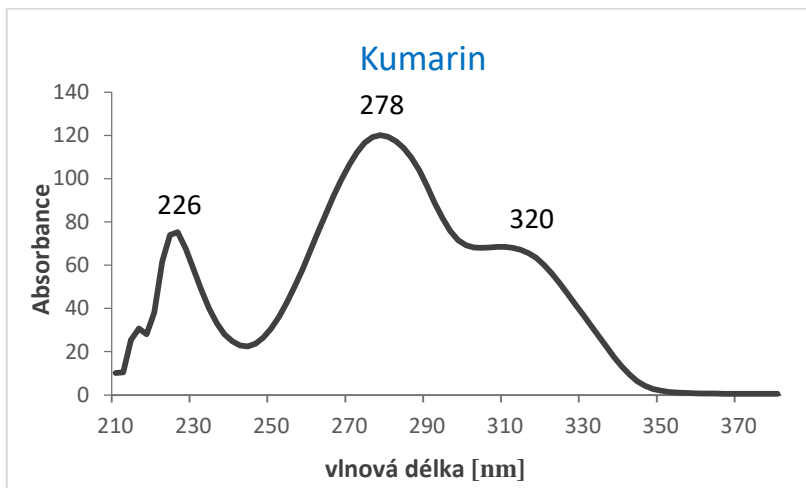
Analýza extraktu celé skořice v 50% methanolu (Soxhletova extrakce)



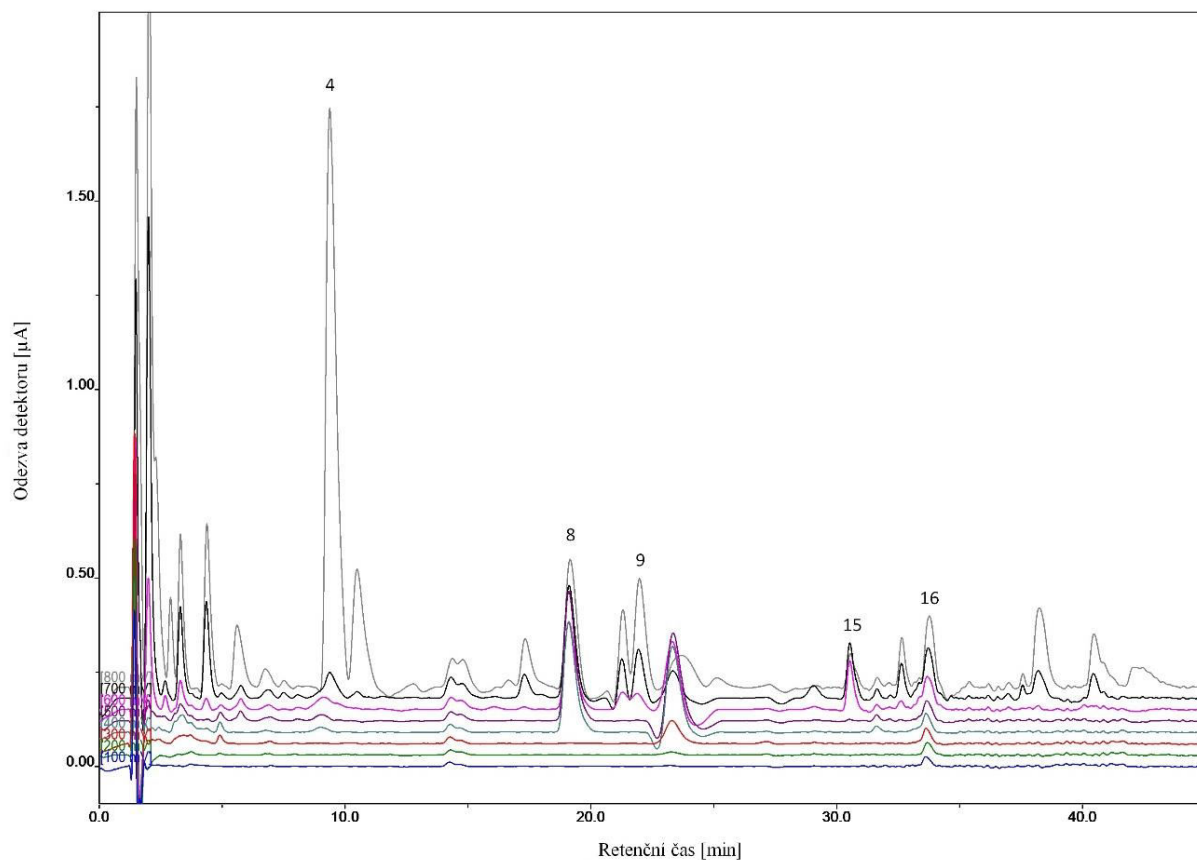
Podmínky analýzy: kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min:0 % MF B; 20 min: 13 %; 30 min: 40%; 35 min: 70 %; 40 min: 70 %; detekce: 100-800 mV.

Legenda: 1. kyselina galová, 3. kyselina protokatechuová, 6. katechin, 12. epigallokatechin galát, 15. kyselina sinapová, 16. epikatechin galát, 19. eugenol

Příloha IV: Absorpční spektra látek stanovených ve skořici



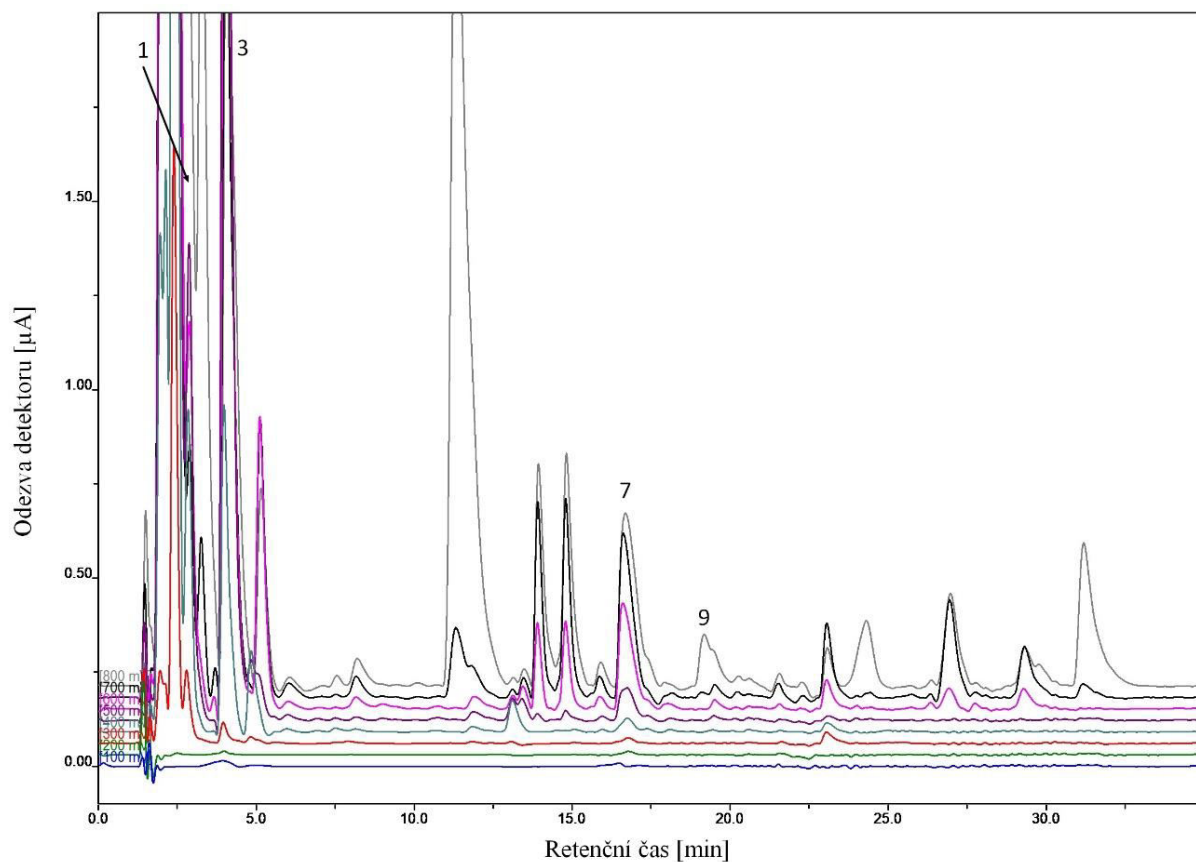
Příloha V: Ukázkový chromatogram analýzy sušeného česneku pomocí HPLC-CoulArray



Podmínky analýzy: kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min: 0 % MF B; 20 min: 13 %; 30 min: 40 %; 35 min: 70 %; 40 min: 70 %, detekce: 100-800 mV.

Legenda: 4. kyselina vanilová, 8. kyselina kávová, 9. kyselina syringová, 15. kyselina sinapová, 16. epikatechin galát

Příloha VI: Ukázkový chromatogram analýzy nakládané řepy pomocí HPLC-CoulArray



Podmínky analýzy: kolona Chromolith Performance RP-18E (100 x 4,6 mm), MF A: 10mM octan sodný okyselený kyselinou mravenčí (pH 3), MF B: 20 % MF A + 80 % acetonitrilu, průtok 1 ml/min, gradientová eluce: 0 min: 0 % MF B 5 min: 0 %; 20 min: 15 %; 30 min: 70 %; 35 min: 70%, detekce: 100-800 mV.

Legenda: 3. kyselina protocatechuová, 7. kyselina chlorogenová, 9. kyselina syringová

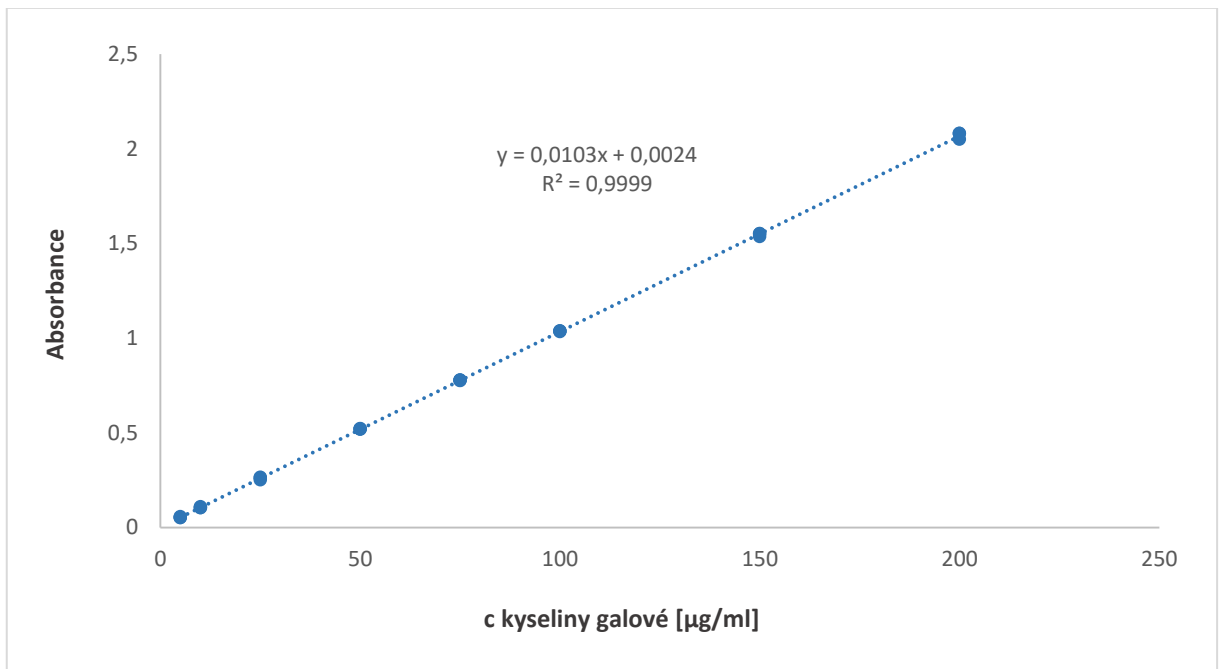
Poznámka: ředění 5x

Příloha VII: Kalibrace stanovení celkového obsahu polyfenolů

Hodnoty absorbance naměřené pro jednotlivé kalibrační roztoky

c [µg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃
5	0,052	0,052	0,057
10	0,105	0,104	0,109
25	0,262	0,265	0,252
50	0,521	0,518	0,522
75	0,777	0,775	0,778
100	1,038	1,037	1,034
150	1,551	1,552	1,536
200	2,080	2,080	2,050

Kalibrační závislost pro stanovení celkových polyfenolů

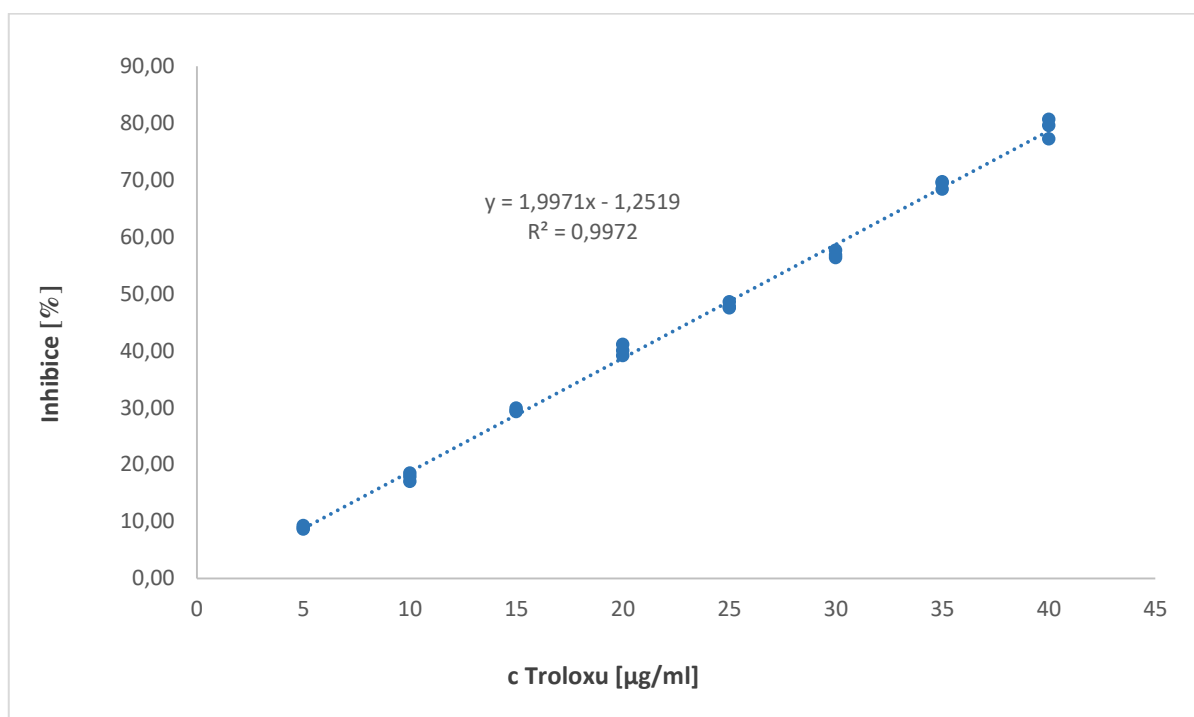


Příloha VIII: Kalibrace stanovení antioxidační aktivity metodou DPPH

Hodnoty absorbance a vypočítaná % inhibice radikálu pro jednotlivé kalibrační roztoky

c [$\mu\text{g/ml}$]	A ₁	A ₂	A ₃	I ₁ [%]	I ₂ [%]	I ₃ [%]
5	0,422	0,425	0,424	9,25	8,60	8,82
10	0,386	0,382	0,379	16,99	17,85	18,49
15	0,329	0,326	0,328	29,25	29,89	29,46
20	0,279	0,274	0,283	40,00	41,08	39,14
25	0,244	0,243	0,239	47,53	47,74	48,60
30	0,203	0,197	0,201	56,34	57,63	56,77
35	0,142	0,147	0,141	69,46	68,39	69,68
40	0,106	0,095	0,090	77,20	79,57	80,65

Kalibrační závislost koncentrace Troloxu pro stanovení AA metodou DPPH



Příloha IX: Kalibrace stanovení antioxidační aktivity metodou ABTS

Hodnoty absorbance a vypočítaná % inhibice radikálu pro jednotlivé kalibrační roztoky

c [µg/ml]	A ₁	A ₂	A ₃	I ₁ [%]	I ₂ [%]	I ₃ [%]
25	0,612	0,604	0,608	14,29	15,41	14,85
50	0,518	0,513	0,508	27,45	28,15	28,85
75	0,436	0,439	0,427	38,94	38,52	40,20
100	0,352	0,348	0,340	50,70	51,26	52,38
125	0,259	0,254	0,245	63,73	64,43	65,69
150	0,148	0,159	0,154	79,27	77,73	78,43

Kalibrační závislost koncentrace Troloxu pro stanovení AA metodou ABTS

