

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Separace polyfenolů v octech kapalinovou chromatografií
s využitím gradientové eluce

Bc. Barbora Čápová

Diplomová práce

2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Barbora Čápková
Osobní číslo:	C19474
Studijní program:	N2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor:	Hodnocení a analýza potravin
Téma práce:	Separace polyfenolů v octech kapalinovou chromatografií s využitím gradientové eluce
Zadávací katedra:	Katedra analytické chemie

Zásady pro vypracování

1. Zpracujte rešerši prací zabývajících se analýzou octů a to zejména s ohledem na obsah polyfenolických antioxidantů, stručně uveďte rozdělení octů do jednotlivých skupin, výrobu octů a jejich chemické složení. V teoretické části práce popište principy kapalinové chromatografie včetně běžně používaných fázových systémů pro analýzy polárních látek (systém s obrácenými fázemi, chromatografie hydrofilních interakcí). Uveďte přehled prací zabývajících se analýzami polyfenolických antioxidantů v octech.
2. Experimentálně ověřte vlivy vybraných stacionárních fází a složení mobilní fáze při separaci polyfenolických látek v gradientové eluci. Optimalizujte podmínky analýzy s cílem dosáhnout co nejlepšího dělení vybraných směsí.
3. Získaná experimentální data kriticky zhodnoťte a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **5. února 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Diplomovou práci s názvem *Separace polyfenolů v octech kapalinovou chromatografií s využitím gradientové eluce* jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019. Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Barbora Čápková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Petru Česlovi, Ph.D. za cenné rady, odborné připomínky a jeho vstřícný přístup při vedení této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu během studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce se zabývá octy, jejich popisem a chemickým složením. Zaměřuje se na polyfenolické složení octů, jejich antioxidační aktivitu a na změny v průběhu technologického procesu. V závěru rešeršní části je popsána separace polyfenolů v octech pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Experimentální část práce je věnována analýze polyfenolických antioxidantů v octech pomocí kapalinové chromatografie s využitím gradientové eluce. Následně pomocí nejlepších nalezených podmínek byly kvantifikovány tři fenolické kyseliny ve vzorku rýžového, jablečného a balzamického octa.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ocet, chemické složení, obsah polyfenolických látek, antioxidační vlastnosti, kapalinová chromatografie, reverzní fáze, UV/VIS detekce, DAD detekce

TITLE

Separation of polyphenolic compounds in vinegars using liquid chromatography with gradient elution

ANNOTATION

This thesis deals with vinegars, their description and chemical composition. It focuses on the polyphenolic composition of vinegars, their antioxidant activity and changes during the technological process. In the conclusion of the research part, the separation of polyphenols in vinegars by high-performance liquid chromatography is described. The experimental part of the work is devoted to the analysis of polyphenolic antioxidants in vinegars by liquid chromatography using gradient elution. Subsequently, three phenolic acids in rice, apple and balsamic vinegar samples were quantified using the best conditions found.

KEYWORDS

Vinegar, chemical composition, content of polyphenolic compounds, antioxidant properties, liquid chromatography, reverse phase, UV/VIS detection, DAD detection

OBSAH

ÚVOD	13
1 OCTY.....	14
1.1 Legislativa a trh.....	14
1.2 Technologické zpracování octů	17
1.3 Chemické složení octů.....	19
1.3.1 Aminokyseliny.....	19
1.3.2 Organické kyseliny.....	19
1.3.3 Sacharidy	20
1.3.4 Melanoidiny.....	20
1.3.5 Vitaminy a minerály.....	20
1.3.6 Polyfenolické látky.....	21
1.4 Změny polyfenolického složení	24
1.4.1 Vliv hlavní suroviny na složení polyfenolických látek.....	24
1.4.2 Vliv technologického zpracování na složení polyfenolických látek.....	26
1.4.3 Vliv skladování octa na složení polyfenolických látek.....	28
1.5 Antioxidační vlastnosti octů	29
2 ANALÝZA POLYFENOLICKÝCH LÁTEK V OCTECH.....	31
2.1 Úprava vzorku před analýzou	31
2.1.1 Extrakce kapalina-kapalina.....	31
2.1.2 Extrakce pevnou fází.....	31
2.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	33
2.3 Fázové systémy kapalinové chromatografie.....	35
2.3.1 Separace na reverzní fázi.....	35
2.3.2 Separace hydrofilně-interakční	35
2.4 Detekce ve vysokoučinné kapalinové chromatografii	37

2.4.1	Spektrofotometrická detekce v ultrafialové a viditelné oblasti	37
2.4.2	Hmotnostně spektrometrická detekce	38
2.5	Stanovení polyfenolických látek ve vzorcích octů	39
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	43
3.1	Použité přístroje a zařízení.....	43
3.2	Použité vzorky a chemikálie	44
3.2.1	Chemikálie	44
3.2.2	Standardy	44
3.2.3	Vzorky octů	45
3.3	Pracovní postup.....	45
3.3.1	Příprava roztoků standardů	45
3.3.2	Příprava vzorků octů	46
3.3.3	Pracovní podmínky HPLC analýzy.....	46
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	47
4.1	Určení vhodné vlnové délky pro detekci analytů.....	47
4.2	Chromatografická separace	47
4.3	Zpoždění gradientu.....	49
4.4	Porovnání retenčního chování polyfenolických látek	50
4.5	Chromatografická separace podle zvoleného profilu gradientu a kolony	52
4.5.1	Vliv nastavení profilu gradientu a kolony na separaci analytů.....	52
4.5.2	Vliv nastavení vlnové délky na detekci analytů	52
4.6	Stanovení polyfenolů ve vzorcích octů	53
5	ZÁVĚR.....	59
6	LITERATURA	60
7	PŘÍLOHY	69

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Zjednodušený biochemický proces výroby octa [4]	17
Obrázek 2: Stárnutí balzamických octů (A), stárnutí sherry octů [4]	18
Obrázek 3: Chemická struktura benzoových kyselin (A), skořicových kyselin (B).....	23
Obrázek 4: Chemická struktura flavanu	23
Obrázek 5: Porovnání celkového obsahu polyfenolů v octech z dřínů obecného [40]	27
Obrázek 6: Nárůst polyfenolického obsahu během stárnutí octů v sudech [46].....	28
Obrázek 7: Schéma kapalinového chromatografu	33
Obrázek 8: Princip HILIC separace [64].....	36
Obrázek 9: Schéma detektoru s diodovým polem.....	38
Obrázek 10: Chemické struktury fenolických kyselin	70
Obrázek 11: Chemické struktury dalších analyzovaných látek	71

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdíl polyfenolického složení vinných odrůd Jerez a Huelva [38].....	24
Tabulka 2: Porovnání celkového obsahu fenolických látek v různých typech octů [39].....	25
Tabulka 3: Pokles celkového obsahu fenolických látek po acetifikaci [42].....	26
Tabulka 4: Změny obsahu vybraných polyfenolů během zpracování octů [43].....	27
Tabulka 5: Různé principy extrakcí s vhodnými sorbenty a elučními rozpouštědly [57].....	32
Tabulka 6: Zkoušené profily gradientů u příslušných kolon.....	47
Tabulka 7: Vypočtené hodnoty strmosti gradientů u příslušných kolon.....	48
Tabulka 8: Retenční časy a m/z nalezené v hmotnostních spektrech jednotlivých standardů .	54
Tabulka 9: Přehled polyfenolických látek nalezených ve vzorcích octů	55
Tabulka 10: Kalibrační parametry fenolických kyselin	56
Tabulka 11: Koncentrace polyfenolických kyselin ve vzorcích octů	57
Tabulka 12: Retenční data standardů měřených na koloně Infinity Poroshell	77
Tabulka 13: Retenční data standardů měřených na koloně Kinetex C18.....	78
Tabulka 14: Retenční data standardů měřených na koloně Kinetex Polar C18.....	79
Tabulka 15: Plochy píků kalibrační řady roztoků fenolických kyselin.....	84
Tabulka 16: Plochy píků fenolických kyselin ve vzorcích octů	85

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Zpoždění gradientu na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series	49
Graf 2: Chromatogram směsného standardu	52
Graf 3: Chromatografická separace směsného standardu při 254 a 280 nm	53
Graf 4: Chromatografická separace směsného standardu při 340 nm.....	53
Graf 5: UV-VIS spektrum kyseliny kávové	72
Graf 6: UV-VIS spektrum kyseliny ferulové.....	72
Graf 7: UV-VIS spektrum kyseliny protokatechuové.....	72
Graf 8: UV-VIS spektrum kyseliny kumarové.....	73
Graf 9: UV-VIS spektrum kyseliny chlorogenové.....	73
Graf 10: UV-VIS spektrum kyseliny gallové	73
Graf 11: UV-VIS spektrum kyseliny syringové	74
Graf 12: UV-VIS spektrum kyseliny vanilové	74
Graf 13: UV-VIS spektrum katechinu.....	74
Graf 14: UV-VIS spektrum epikatechinu.....	75
Graf 15: UV-VIS spektrum vanilinu.....	75
Graf 16: UV-VIS spektrum furfuralu.....	75
Graf 17: UV-VIS spektrum protokatechuového aldehydu	76
Graf 18: UV-VIS spektrum syringolu.....	76
Graf 19: UV-VIS spektrum konyferylalkoholu	76
Graf 20: Separace polyfenolů na koloně Kinetex C18 při profilu gradientu 1.....	80
Graf 21: Separace polyfenolů na koloně Kinetex C18 při profilu gradientu 2.....	80
Graf 22: Separace polyfenolů na koloně Kinetex C18 při profilu gradientu 3.....	81
Graf 23: Separace polyfenolů na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu 1.....	82
Graf 24: Separace polyfenolů na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu 2.....	82
Graf 25: Separace polyfenolů na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu 3.....	83
Graf 26: Chromatogram rýžového octa.....	86
Graf 27: Přiblížený chromatogram rýžového octa	86
Graf 28: Chromatogram jablečného octa.....	87
Graf 29: Přiblížený chromatogram jablečného octa.....	87
Graf 30: Chromatogram balzamikového octa.....	88
Graf 31: Přiblížený chromatogram balzamikového octa.....	88

SEZNAM ZKRATEK

AOA	Antioxidační aktivita
C8	Oktyl
C18	Oktadecyl
DAD	Detektor diodového pole
ESI	Ionizace elektrosprejem
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GC	Plynová chromatografie
HILIC	Hydrofilní-interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-OES	Emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
MS	Hmotnostní spektrometr
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RNS	Reaktivní formy dusíku
RP	Reverzní fáze
SPE	Extrakce tuhou fází
TPC	Celkový obsah polyfenolických látek
UHPLC	Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná oblast záření/detekce
WHO	Světová zdravotnická organizace

ÚVOD

Kromě nejlevnějšího lihového kvasného octa existují i další druhy octů jako například balzamikový, sherry a další, které slouží spíše k dochucení pokrmů, jelikož jsou mnohem prestižnějšími a dražšími octy. Octy jsou používány nejenom na dochucení pokrmů a konzervaci potravin, ale jsou stále více konzumovány i pro své antioxidační účinky. Mezi hlavní látky v octech, které mají antioxidační charakter patří látky polyfenolické, vznikající jako sekundární metabolity rostlin. Tyto rostlinné polyfenolické metabolity jsou různorodou skupinou látek. V octech jsou nejvíce zastoupeny hydroxyskořicové kyseliny, hydroxybenzoové kyseliny a flavonoidy. Do octů se dostávají díky hlavní cukerné surovině, čímž může být vinná réva, jablka, rýže a další široká paleta substrátů. V průběhu technologického procesu dochází ke změnám polyfenolického složení. Tyto změny závisí na předúpravě cukerné suroviny, na způsobu výroby a podmínkách skladování.

Nejčastěji se tyto analyty stanovují kapalinovou chromatografií na reverzní fázi. Jelikož se nejedná o pevné rostlinné vzorky, ale o vzorky octů, je jejich úprava před analýzou zcela minimální. Cílem diplomové práce je optimalizace podmínek separace polyfenolických antioxidantů a následné ověření vhodnosti zvolené stacionární fáze a složení mobilní fáze na separaci polyfenolů v octech. Při analýzách byla použita kapalinová chromatografie s detekcí diodového pole a detekcí hmotnostním spektrometrem.

1 OCTY

Ocet je kyselá potravina mající všestranné využití. Původ octa je spjat s výrobou vína, kdy lze předpokládat, že po neúmyslném zkvašení vína na vzduchu došlo k objevení kyselého octového roztoku [1]. Této skutečnosti si již byly vědomy starověké civilizace. Stejně tak o původu octů vypovídá latinský název „*vinum acer*“, znamenající kyselé víno [2]. V minulosti se ocet používal jako konzervant, medicína či nápoj dodávající sílu před bojem. Slavný lékař a zakladatel lékařské vědy Hippocrates (420 př. n. l.), používal ocet na čištění vředů a ran. K léčbě kašle doporučoval pradávňý lék Oxymel. Jednalo se o roztok octa s medem. Jeho používání se uchytilo, jelikož byl tento lék popsán i v britském lékopisu pocházející z roku 1898. Julius Caesar, ve svých písemnostech zmínil, že římsí vojáci si do vody přidávali ocet, jako čistící složku, která má zabránit možné zavadlosti vody na nepřátelských územích. První společností vyrábějící ocet komerčně je považována *Vinaigriers moutardiers sauciers distillateurs en eau-de-vie et esprit-de-vin buffetiers*, která byla založena roku 1394 v Orleáns ve Francii. Ocet zde byl vyráběn takzvanou pomalou orleánskou metodou, která je stále použitelná i v dnešní době [2,3].

Dnes se ocet jednoznačně používá jako ochucovadlo potravin, jako konzervant při nakládání ovoce, zeleniny a uzenin. Běžný lihový kvasný ocet je vhodným pomocníkem v domácnosti, je levnější variantou čistících prostředků. Octy mají antifungicidní a dezinfekční účinky, odstraňují vodní kámen, mastnotu a zápach. Lze je použít na octové obklady snižující horečku a otoky [3,4].

1.1 Legislativa a trh

V české legislativě je ocet zmíněn ve vyhlášce č. 248/2018 Sb., kde je ocet kvasný okyselující potravinou, která je vyrobena biologickým procesem kysání lihu obohaceného živinami za pomoci octových bakterií. Kvasný ocet se dělí na lihový, vinný a ovocný ocet kvasný. Kvasný ocet lihový je vyrobený kysáním kvasného lihu pocházejícího ze škrobnatých nebo cukerných surovin. Kvasný ocet vinný je vyroben kysáním lihu obsaženého v révovém víně, které bylo kysáno společně s ředěným kvasným lihem. Ovocný kvasný ocet se vyrábí kysáním lihu obsaženém v ovocném nebo sladovém víně, které bylo kysáno společně s ředěným kvasným lihem. Při výrobě kvasného octa vinného a kvasného octa ovocného se k zakysání používá kvasný ocet lihový, přičemž kyselina octová obsažená v hotovém výrobku může pocházet z kvasného octa lihového v podílu nejvýše 49 % [5]. Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) a Světová zdravotnická organizace (WHO) popisují ocet jako

tekutinu vhodnou ke konzumaci, která byla vyrobena výlučně ze škrobnatých/cukerných zemědělských substrátů, dvěma po sobě jdoucími procesy kvašení [6]. WHO dále zmiňuje, že ve vinných octech by neměl obsah zbytkového alkoholu přesáhnout 0,5 % obj., u ostatních octů poté 1 % obj. Obsah celkových kyselin, vyjádřeno jako kyselina octová, by nemělo být méně než 60 g/l a ne více, než vznikne pomocí biologické fermentace. Pro ostatní octy by celkový počet kyselin neměl být menší než 50 g/l [7]. Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) uvádí, že zředěná kyselina octová není octem a neměla by se přidávat do těch potravinářských výrobků, u kterých se předpokládá přidání octu (marinády a zálivky) [2].

Na trhu se lze setkat s mnoha druhy octů. V různých zemích se těší oblibě jiný druh octa, který vychází z kultury dané země a konzumovaných jídel. Octy lze nejlépe klasifikovat podle použité suroviny. V českých domácnostech se nejvíce používá kvasný lihový ocet, dále jablečný ocet, vinný ocet, balzamikový ocet a ocet rýžový. Lihový kvasný ocet obsahuje 8 % obj. kyseliny octové a díky své výrazné kyselosti má všestranné použití. Vyrábí se z destilovaného lihu a nejvíce se hodí na konzervaci ostatních potravin, jelikož má čistou kyselou chuť, díky které vyniká původní chuť nakládaných potravin. Jablečný ocet se vyrábí z drcených jablek, které jsou fermentovány na jablečné víno. Tyto octy mohou být na trhu také ve formě nefiltrovaných octů. Používají se do zálivek či chutney. Vinné octy, se vyrábí buďto spontánním kvašením hroznů, nebo inokulací hroznových moštů [3]. Balzamikový ocet je také vinným octem, avšak jeho výroba je mnohem náročnější. Tento vinný ocet je výjimečný tím, že se vyrábí pouze z vinných odrůd Trebbiano pěstovaných v oblasti Modena na severu Itálie. Vznikající ocet je ponechán procesu stárnutí v dřevěných sudech, které dávají konečnému výrobku specifickou chuť a buket. Proces stárnutí by měl trvat nejméně 12 let pro tradiční balzamikové octy, balzamikové octy z Modeny však stárnou kratší dobu, od 2 měsíců do 3 let [3,4,8]. Dalším velmi ceněným vinným octem je sherry ocet pocházející ze Španělska [1]. Oba tyto octy a další spadají pod ochranné označení PDO či PGI, které je umístěné na obalu výrobku. PDO (Protected Destination of Origin), neboli chráněné označení původu, zajišťuje octy, které jsou vyráběny tradičně po celou dobu technologického zpracování na stejném místě a díky tomu mají specifické vlastnosti dané podnebím, původním technologickým „know-how“, konkrétním složením půdy a odrůdou suroviny v dané oblasti. Kdežto, PGI (Protected Geographical Indication), označuje octy, které jsou sice vyrobeny tradičními postupy, ale jsou alespoň částečně vyráběny na daném území [4].

PDO označení vlastní tyto octy:

- Aceto Balsamico Tradizionale di Modena (Tradiční balzamikový ocet z oblasti Modena, Itálie), Aceto Balsamico Tradizionale di Reggio Emilia (Tradiční balzamikový ocet z oblasti Emilia, Itálie)
- Vinagre de Jerez (Vinný ocet z oblasti Jerez, Španělsko), Vinagre del Condado de Huelva (Vinný ocet z oblasti Condado de Huelva, Španělsko), Vinagre de Montilla-Moriles (Vinný ocet z Montilla-Moriles, Španělsko)

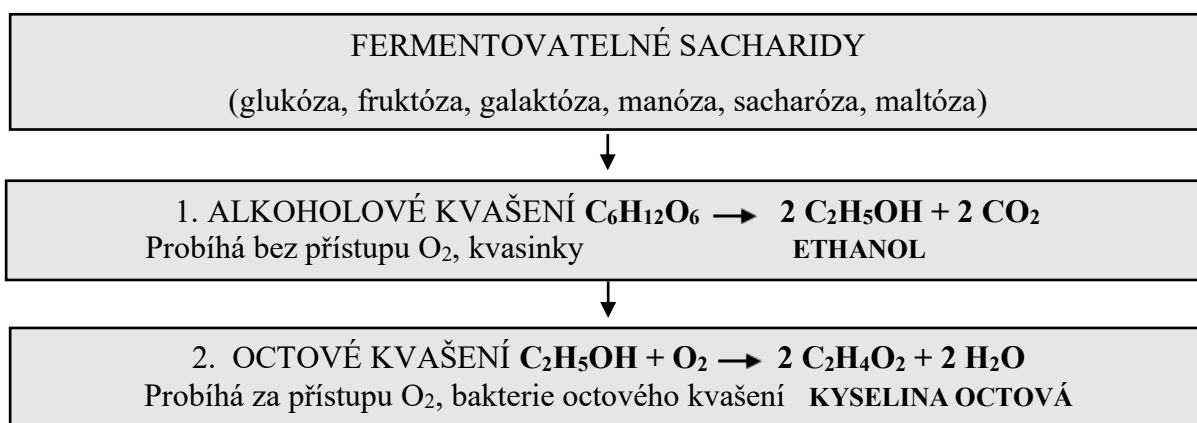
PGI označení vlastní tyto octy:

- Aceto Balsamico di Modena (Balzamikový ocet, který může být zpracován i mimo oblast Modena)
- Zhenjiang Xiang Cu (Tmavý rýžový ocet vyráběný v oblasti Čen-t'iang, Čína) [4].

Známým rýžovým octem je japonský ocet Kurosu a čínský ocet Zhenjiang [9]. Běžně se používají v asijské kuchyni, jsou spíše sladší a méně kyselé oproti ostatním octům. Mohou být vyrobeny fermentací rýže nebo z rýžového vína. Pokud se používá neloupaná rýže, získáváme tmavě zbarvený ocet se zákalem. Pro výrobu světlých octů se používá rýže loupaná. Pokud se v obchodních řetězcích setkáme se sushi octem, jedná se o již ochucený rýžový ocet, do kterého byl přidán cukr a sůl [3]. Mezi další druhy octů lze zmínit sladový ocet vyráběný z fermentovaného ječmene a obilné kaše. Tento druh octa je velmi populární ve Velké Británii, podává se k oblíbenému pokrmu Fish and Chips [3,9]. Dalším zástupcem je třtinový ocet, který je velmi oblíben na Filipínách [9]. Německo je zase největším výrobcem pivního octa. Na Středním východě se naopak hojně využívá datlový ocet [2]. Existují i octy malinové, rybízové, kokosové nebo umeo octy, vyráběné ze švestiček umeboši [10].

1.2 Technologické zpracování octů

Ocet je výsledkem dvoustupňové fermentace. Vstupní surovinou prvního stupně je jakákoli surovina obsahující cukry vhodné k fermentaci, nejčastěji ovoce a obiloviny, kdy kvasinky rodu *Saccharomyces spp.* vyrábí ATP, CO₂ a přeměňují cukry na ethanol. Tento biochemický proces probíhá za anaerobních podmínek. Vzniklý ethanol je dále v druhé fermentaci přeměněn octovými bakteriemi za aerobních podmínek na kyselinu octovou. Mezi zástupce, kteří se podílejí na octovém kvašení lze zařadit *Acetobacter (Acetobacter aceti subs. Aceti, Acetobacter subsp. orleanensis, Acetobacter rancens, Acetobacter pasteurianus), Gluconobacter, Gluconacetobacter a Komagataeibacter* [2,6,11,12]. Tento zjednodušený biochemický proces výroby octa znázorňuje obrázek 1.



Obrázek 1: Zjednodušený biochemický proces výroby octa [4]

Mezi nejznámější způsoby výroby octa patří pomalé povrchové metody, dále metody rychlého octařství a submerzní výrobní metoda. Mezi pomalé tradiční metody patří nejstarší orleánský způsob. Kvašení se provádí ve velkých dřevěných sudech o objemu kolem 200 litrů a více. Sudy jsou plněny pouze z 1/3 svého objemu a je zajištěn kontakt kapaliny s okolním vzduchem. V minulosti se nechávaly sudy otevřené, dnes jsou sudy opatřeny speciálními otvory pro cirkulaci vzduchu. Na povrchu kapaliny se tvoří shluk fermentačních mikroorganismů, kterému se říká octová matka. Za 8 až 14 měsíců se odeberou přibližně 2/3 octa a zbytek se doplní novým vínem [4,13,14].

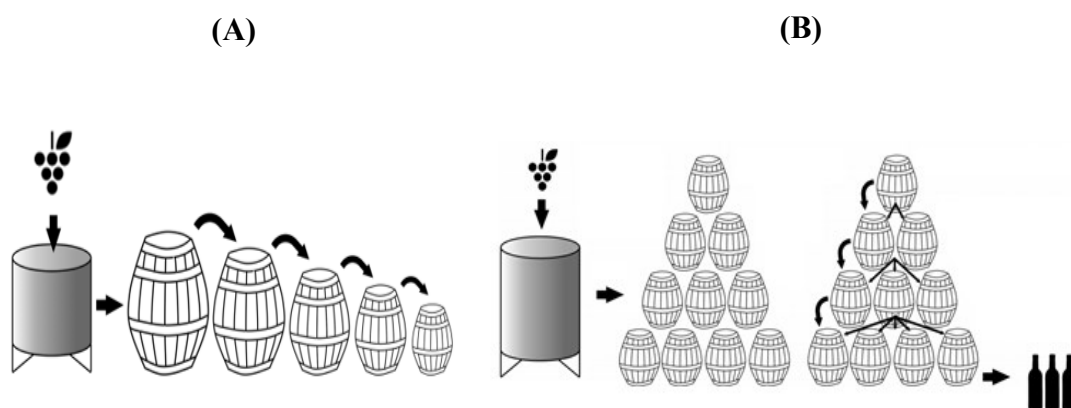
Principem rychlých octařských metod je výroba octa v acetogenerátorech neboli velkoocetnicích s imobilizovanými octovými bakteriemi uloženými na dřevěném roštu. Jako nosiče octových bakterií se nejvíce používají bukové hobliny, lze se setkat i s korkovými nosiči nebo pemzou [14].

Submerzní metoda je v současnosti nejpoužívanější průmyslovou výrobou octa. Výroba probíhá v ocelových acetátorech, vybavenými míchadly, chlazením a provzdušňovacím systémem. Bakterie jsou volně rozptýleny v celé ředině (nálevu). Výrobu lze provádět vsádkově či kontinuálně. U vsádkové metody se vychází s nálevem obsahujícím 11–12 % obj. ethanolu a živinami. Doba jednoho cyklu je přibližně 48–72 hodin, kdy dojde k poklesu ethanolu na 0,3 % obj. a zvýšení obsahu kyseliny octové na 11–12 % obj. [14].

Po výrobě octa přichází úprava octa a jeho skladování. Pro snížení obsahu látek způsobující zákal (bílkoviny, melanoidiny a pektiny) se octy čerí. Dále se ředí na požadovanou koncentraci, přibližně 8 % obj., chemicky a mikrobiologicky nezávadnou vodou. Některé druhy octů se nechávají zrát v sudech pro získání lepších organoleptických vlastností.

Balzamikový ocet je znám pro své několikaleté stárnutí v sudech. Procesu stárnutí balzamikových octů náleží název Rincalzo, znázorněný obrázkem 2, (A). Při tomto postupu dochází ke kvašení octa nejprve v největším sudu a následně se pokračuje se sudy s menším objemem. Sudy jsou vyrobeny z různých dřevin jako je kaštan, třešeň, jalovec, moruše a dub [2,8].

U španělských sherry octů se používají dvě možnosti stárnutí. První možností je statický systém, kdy ocet stárne pouze v jednom sudu. Druhou možností je Solera systém, znázorněný na obrázku 2, (B) skládající se z několika kroků, (od tří do osmi), kdy je nejvýše položený sud naplněn sherry vínem. Finální ocet je získáván z dolních sudů, které se opět naplní octy ze sudů nad nimi [4]. Jako konečné úpravy před plněním octů do lahví se provádí čiření, filtrace, v některých případech dobarvení sulfitovým karamellem a pasterace [14].



Obrázek 2: Stárnutí balzamikových octů (A), stárnutí sherry octů [4]

1.3 Chemické složení octů

Chemické složení octů závisí na použitých surovinách, postupu technologické výroby a chemickými, fyzikálními a mikrobiálními změnami během fermentace [15]. Jelikož se tato práce zabývá stanovením polyfenolických látek, je jim v dalších kapitolách věnován větší prostor.

1.3.1 Aminokyseliny

Aminokyseliny se vyskytují v původních surovinách, také vznikají jako produkty mikrobiálního rozkladu proteinů. V octech se vyskytují ve formě volných i neproteinových aminokyselin. Nejvíce se vyskytuje kyselina glutamová, a to jak v obilních, tak i ovocných octech. Celková koncentrace aminokyselin roste se stářím octa. Bylo zjištěno, že octové kvasinky při fermentaci hroznového moštu využívají specifické aminokyseliny, L-arginin, kyselinu L-glutamovou, L-glutamin, L-aspartát, L-asparagin, L-threonin a L-serin. Nejdůležitějším zdrojem dusíku pro octové bakterie je L-leucin [16]. Aminokyseliny mají vliv na organoleptické vlastnosti, například glycin, alanin a prolin jsou nositelé sladké chuti. Leucin, arginin, methionin a tryptofan jsou nositelé hořké chuti [4,15].

1.3.2 Organické kyseliny

V octech se vyskytuje mnoho organických kyselin, jsou jednak v základních surovinách ale také vznikají v průběhu fermentace. Dle provedené studie, vznikají organické kyseliny pomalu při ethanolovém kvašení, oproti tomu při octovém kvašení rapidně roste jejich obsah. Ethanol-dehydrogenáza a aldehyd-dehydrogenáza, kterou vylučují octové bakterie oxiduje ethanol na kyselinu octovou. Dále produkují kyselinu vinnou, mléčnou, jablečnou a citronovou [9]. Kvasinky produkují kyselinu pyrohroznovou a jantarovou, čímž také přispívají k celkovému množství organických kyselin [17]. Nejvýznamnější je kyselina octová, její obsah v octech je také nejvyšší a tvoří přibližně 30–50 % celkových organických kyselin. Mezi těkavé zástupce patří kyselina octová, mravenčí, propionová, máselná a chinová. Mezi netěkavé organické kyseliny v octech patří mléčná, jablečná, pyroglutamová, citronová, jantarová, vinná a fumarová [4,15,18].

Organické kyseliny jsou hlavními složkami, dávající octům chuť a aroma [19]. Bylo zjištěno, že ovocné octy obsahují více organických kyselin než octy obilné, díky tomu jsou více aromatické a mají bohatší chuť [18]. Kyselina octová přispívá velmi silně k typické octové vůni a kyselé chuti octů. Pokud se v octu vyskytují také kyselina mléčná, vinná, jablečná a jantarová

tlumí projev kyseliny octové a ocet zjemňuje [15]. Organické kyseliny řídí hladinu glukózy v krvi a mohou regulovat metabolismus lipidů [18].

1.3.3 Sacharidy

Sacharidy jsou základním zdrojem uhlíku a energie během fermentace. Souvisejí s chutí a hustotou octů. Většinou se vyskytují ve formě monosacharidů, které vznikly degradací polysacharidů nebo oligosacharidů během fermentačního procesu. Monosacharidy, které se nejčastěji vyskytují v octech jsou glukóza, fruktóza, xylóza, manóza a arabinóza. Disacharidy obsažené v octech jsou sacharóza a maltóza. Bylo zjištěno, že balzamický ocet obsahuje devět cukrů (galaktózu, glukózu, fruktózu, manózu, ribózu, sorbózu, xylózu, a sacharózu) a čtyři cukerné alkoholy (manitol, glycerol, erythritol a inositol) [4,15].

Byly studovány vzorky tradičního balzamického octa, kdy nejvíce zastoupeným sacharidem byla glukóza (153–294 g/kg), fruktóza (131–279 g/kg), xylóza (0,11–0,39 g/kg), ribóza (0,078–0,429 g/kg), rhamnóza (0,061–0,195 g/kg), galaktóza (0,136–0,388 g/kg), manóza (0,41–1,46 g/kg), arabinóza (0,33–1,00 g/kg) a sacharóza (0,46–6,84 g/kg). Kvasný ocet lihový obsahuje nejméně sacharidů a živin ze všech octů [20].

1.3.4 Melanoidiny

Tyto makromolekulární sloučeniny vznikají při reakcích redukcí cukrů a sloučenin obsahující volné aminoskupiny, jako jsou aminokyseliny, peptidy či proteiny prostřednictvím Maillardovy reakce. Během tepelného zpracování octů jsou škrob, hemicelulózy a bílkoviny hydrolyzovány na redukcí cukry a aminokyseliny, které slouží jako vstupní reaktanty pro tvorbu melanoidinů. Po tepelné úpravě dávají potravině hnědé zbarvení. Typicky se nacházejí v pražené kávě, kakau a chlebu, ale i v octech a dalších potravinách. Teplota pražení kávy dosahuje teplot nad 200 °C. U octů, konkrétně u tradičního čínského obilného octa, stačí k jejich tvorbě tepelná úprava o mnohem menší, a to okolo 80–90 °C [15,21-23].

1.3.5 Vitaminy a minerály

V octech se vyskytují vitaminy skupiny B a vitamin C. Obilné octy obsahují hlavně vitaminy B₁, B₂, kyselinu nikotinovou a nikotinamid. U palmového octa byl zjištěn vysoký obsah vitaminu C (217 mg/l) [15].

Minerální látky se do octů dostávají z hlavních surovin, vody, ale také ze sudů, v kterých probíhá proces fermentace [4]. Mezi hlavní prvky ve vinných octech patří Ca, K, Mg, Na, P

a S. Draslík je nejhojněji zastoupen, jeho koncentrace může být navyšována tím, že se do octů či vín přidává konzervační složka metabisulfít draselný. Ve španělských octech z Andalusie (Vinagre de Jerez, Vinagre de Montilla-Moriles a Vinagre del Condado de Huelva) byla provedena prvková analýza pomocí ICP-OES a byly stanoveny tyto prvky: Al, As, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, S, Sr, V a Zn. Bylo také zkoumáno, zda má stárnutí octů vliv na prvkové složení. Ve většině případů byl obsah minerálů ve starých octech (analyzovaná paleta octů byla z různých oblastí) vyšší než v mladých, nejvíce se hodnoty lišily pro prvky Al, B, Cu, K, Mg, Pb, S, Sr a Zn. Koncentrace prvků K, Ca, Cu, Cd, Mn, Zn a Pb může být navyšována tím, že se vyskytují v hnojivech, pesticidech či fungicidech. Prvky jako jsou Cd a Pb mohou být navyšovány v důsledku antropogenního znečištění [24-26].

1.3.6 Polyfenolické látky

Polyfenolické látky jsou rozmanitá skupina sloučenin, která je distribuována v ovoci, zelenině, obilí či rostlinách. Jedná se o sekundární metabolity, které si rostliny tvoří jako ochranné látky vůči různým vlivům jako je UV záření, napadení hmyzem, viry či bakteriemi [27]. Kromě látek přírodního původu, lze do fenolických látek zařadit i synteticky vyráběné látky sloužící jako antioxidanty přidávané do potravin, jedná se o butylhydroxytoluen, butylhydroxyanisol, propylgalát (ester kyseliny gallové) a terc-butylhydrochinin [28]. Skupina fenolických látek v sobě zahrnuje jak jednoduché molekuly (fenolové kyseliny), tak i vysokomolekulární polymery (taniny a lignany). Mohou se vyskytovat jak volně, tak i ve formě esterů, aldehydů, ketonů či methoxyderivátů [29,30]. Ovlivňují sensorické vlastnosti rostlinných produktů, jelikož se jedná o barviva (flavonoidy a lignany), chuťové látky (taniny) a vonné látky (jednoduché fenoly a fenolické kyseliny). Tyto látky jsou zodpovědné za svíravost octů, podílejí se na barvě a vůni octů. Jsou to také antioxidanty a fytoestrogeny mající antimikrobiální, antialergické, antimutagenní, antitrombotické a protizánětlivé účinky [29,31,32].

V octech se vyskytuje široká škála polyfenolických látek, lze je rozdělit do níže uvedených skupin:

- **Jednoduché fenoly:** fenol, pyrokatechol (benzen-1,2-diol)
- **Fenolové kyseliny:** hydroxyskořicové kyseliny, hydroxybenzoové kyseliny
- **Alkylfenoly:** 3,4-xylenol (3,4-dimethylfenol), 4-ethylcatechol, 4-ethylfenol, 4-methylcatechol, 4-vinylfenol, *o*-kresol, *m*-kresol, *p*-kresol
- **Methoxyfenoly a alkylmethoxyfenoly:** guajakol, 4-ethylguajakol, 4-methylguajakol, 4-vinylguajakol
- **Dimethoxyfenoly a alkyldimethoxyfenoly:** 4-methylsyringol, syringol
- **Alkylfenolické alkoholy, alkylfenylmethoxy alkoholy:** koniferylalkohol, homovanillylalkohol, hydroxytyrosol, tryptophol, tyrosol
- **Hydroxybenzketony a jejich deriváty:** acetosyringon, acetovanillon, isoacetosyringon, isoacetovanillon, isopropionsyringon, isopropionvanillon,
- **Hydroxybenzethery:** 4-hydroxy-3-methoxybenzyl(ethyl)ether
- **Flavanoly:** (-)-epikatechin, (+)-katechin
- **Hydroxykumariny:** aeskuletin, skopoletin

Hojně se však v octech vyskytují fenolické kyseliny a flavonoidy.

Fenolické kyseliny

Tyto kyseliny lze rozdělit na deriváty hydroxyskořicové (řetězec C3-C6) a hydroxybenzoové kyseliny (řetězec C1-C6). Nejběžnější hydroxyskořicové kyseliny jsou: ferulová, kávová, *p*-kumarová, sinapová. Mezi hydroxybenzoové kyseliny patří: *p*-hydroxybenzoová, protokatechuová, vanilová a syringová. Vyskytují se ve formě esterů, glykosidů či amidů [33]. Kyselina kávová a ferulová ve volné či esterifikované formě jsou nejvíce zastoupenou fenolickou kyselinou v ovoci i obilovinách [31,34]. Obrázek 3 znázorňuje základní strukturu, benzoových kyselin (A) a skořicových kyselin (B), z kterých poté vycházejí ostatní kyseliny.

1.4 Změny polyfenolického složení

Polyfenolický profil octů závisí na mnoha faktorech, lze je rozdělit na tři hlavní části, kterými jsou výběr a předúprava suroviny, výběr výrobní metody a také podmínky skladování konečného výrobku. Konkrétní polyfenolické látky v octech lze sledovat kvalitativně a kvantitativně. Lze je také vyjádřit společně jako celkový obsah fenolických látek (TPC). TPC se stanovuje Folin-Ciocalteu metodou. Při ní dochází k redukci Folin-Ciocalteova činidla, což je směs fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny, za alkalických podmínek, kdy vznikají modré produkty. Fenolický antioxidant je donorem elektronu a redukuje iont Mo^{6+} na Mo^{5+} . Výsledky jsou vyjadřovány jako ekvivalent kyseliny gallové (mg GAE/ml). Lze se však setkat s tím, že se jako referenční látka využívá katechin, kyselina kávová či chlorogenová [37].

1.4.1 Vliv hlavní suroviny na složení polyfenolických látek

Významný vliv vedoucí ke zvýšení polyfenolů ve vinných octech je fermentace společně se slupkami. Nárůst je pozorován u kyseliny gallové, benzoové, syringové, katechinu, epikatechinu, tyrosolu a vanilinu [4]. Další studie [38] zkoumala rozdíly mezi vinnými octy z oblastí Jerez a Huelva ve Španělsku. Obě tyto oblasti leží na jihozápadě Španělska, používají podobné postupy výroby a také stejnou výchozí surovinu, kterou jsou vybrané odrůdy vín jako: Zalema, Pedro Ximénez, Listán de Huelva a další. Přesto však na polyfenolické složení mají vliv specifické zeměpisné podmínky těchto oblastí. V tabulce 1 si lze všimnout významných rozdílů v obsahu kyseliny gallové, *p*-kumarové a kyseliny protokatechuové vyskytujících se ve vinných odrůdách Jerez a Huelva.

Tabulka 1: Rozdíl polyfenolického složení vinných odrůd Jerez a Huelva [38]

Druh sloučeniny	Jerez [mg GAE/l]	Huelva [mg GAE/l]
Kyselina gallová	50,7	36,7
Kyselina syringová	11,7	6,5
Kyselina protokatechuová	58,2	67,8
Kyselina kávová	6,6	2,2
Kyselina <i>p</i> -kumarová	8,1	1,7
Protokatechuový aldehyd	1,8	1,6
Vanilin	4,3	3,0

Nejenom typ hlavní suroviny ovlivňuje složení polyfenolů, ale také její zbarvení. Při výrobě datlového octa bylo zjišťováno TPC příslušných datlí v mg GAE/100 g čerstvých datlí. Hodnota TPC se pohybovala od 147,6 do 475,5 mg GAE/100 g čerstvých datlí. Nejvyšší hodnotu 475,5 mg GAE/100 g měl nejtmaší druh Khistawi, nejmenší obsah měl nejsvětější druh Barban 147,6 mg GAE/100 g [39]. Tuto skutečnost potvrdila jiná studie [40], zkoumající souvislost mezi zbarvením octů z plodů dřínu obecného a obsahem TPC, kde octy z červených plodů vykazovaly větší hodnoty TPC, oproti octům vyrobených z plodů oranžových či žlutých. Tato skutečnost platí i v jiných maticích. Studie brazilských medů opět potvrdila, že nejtmaší medy vykazovaly větší hodnoty TPC než medy světlé [41].

V Írácké studii se zabývali porovnáním obsahu polyfenolických látek v různých druzích datlí, datlového octa a také porovnáním běžně dostupných octů v Íráku. Do první skupiny lze zahrnout „artificial octy“ a destilované kvasné octy s TPC od 0 do 70 mg GAEL/l. Druhá skupina zahrnovala jablečné a vinné octy, jejichž hodnota TPC se pohybovala v rozmezí 100-352 mg GAEL/l. Poslední skupinou poté byly vzorky, jejichž obsah polyfenolů byl vyšší než 352 mg GAEL/l, kam ve většině případů spadaly právě datlové octy [39]. V tabulce 2, lze vidět porovnání různých druhů octů podle jejich hodnoty TPC (mg GAE/l). Můžeme si všimnout, že nejvyšších hodnot dosahovaly octy datlové a vinné. Ve studii, však nebyly zkoumány například balzamikové octy, které vykazují též velmi vysoké hodnoty TPC. Nejmenší obsah TPC je samozřejmě u octů destilovaných. V některých případech u nich polyfenoly nebyly vůbec stanoveny.

Tabulka 2: Porovnání celkového obsahu fenolických látek v různých typech octů [39]

Výrobce	Druh octa	Země původu	TPC [mg GAE/l]
Teeba Al Jabal	*Artificial	Libanon	-
Al-Wafe	*Artificial	Írák	-
-	*Datlový ocet	Írák	1453,0
Durra	Datlový ocet	Sýrie	752,9
Sham Gardens	Datlový ocet	Írák	577,9
Al Walaem	Česnekový	Sýrie	196,7
Al Wadi Al Akhdar	Vinný	Libanon	346,9
Kemal Kukrer	Vinný	Turecko	294,9
American garden	Vinný	USA	128,9
Zer	Jablečný	Turecko	63,1
Taksan	Jablečný	Írán	13,9

*Artificial vinegar = směs vody a kyseliny octové, v České republice nesmí být prodáván pod názvem ocet

* Datlový ocet = připraven přímo pro analýzu v laboratoři z datlového substrátu

1.4.2 Vliv technologického zpracování na složení polyfenolických látek

V průběhu technologického procesu dochází k velkým změnám obsahu polyfenolických látek. Pro zjištění změn obsahu polyfenolických látek po procesu acetifikace, byly zkoumány vzorky jablečných ciderů, bílých vín, červených vín, a také jejich octové analogy vyrobené v bioreaktorech pro tuto analýzu. V tabulce 3 je vidět pokles TPC oproti původnímu substrátu u všech sledovaných vzorků [42].

Tabulka 3: Pokles celkového obsahu fenolických látek po acetifikaci [42]

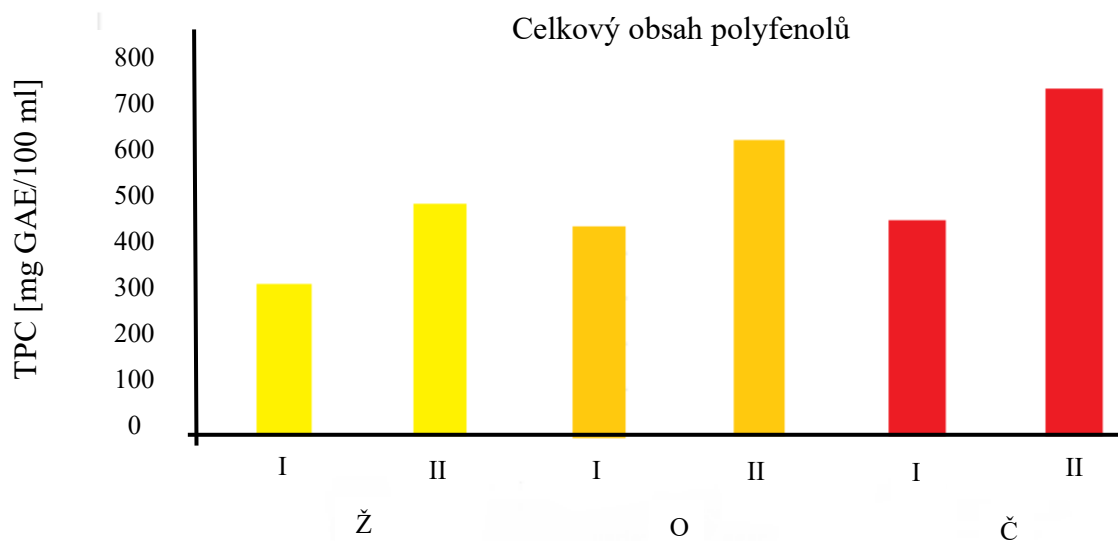
Vzorek	TPC [mg GAE/l]	Pokles TPC po acetifikaci [%]
Jablečný cider (1)	609	-
Ocet z jablečného cideru (1)	416	32
Jablečný cider (2)	814	-
Ocet z jablečného cideru (2)	462	43
Bílé víno (1)	592	-
Bílý vinný ocet (1)	509	14
Bílé víno (2)	211	-
Bílý vinný ocet (2)	205	1,9
Červené víno (1)	1448	-
Červený vinný ocet (1)	1262	13

Tabulka 4 znázorňuje změny obsahu konkrétních polyfenolů při technologické výrobě jablečného octa. Tyto fáze zpracování vzorku jsou znázorněny zkratkami (JK) pro jablečný koncentrát, (JC) pro jablečný cider, (DJO) pro dekantovaný jablečný ocet, (DFJO) pro dekantovaný a filtrovaný jablečný ocet, (KP) pro konečný produkt. U všech vybraných polyfenolů lze sledovat pokles jejich obsahu. Je nutné zmínit, že surový ocet nestárnul v dřevěných sudech, ale byl před finálními úpravami uchovávan po dobu 3 měsíců v polyesterových nádržích potažených pryskyřicí [43].

Tabulka 4: Změny obsahu vybraných polyfenolů během zpracování octů [43]

Jablečný ocet					
Fáze zpracování vzorku	Kyselina gallová [mg/100 ml]	Kyselina syringová [mg/100 ml]	Kyselina kávová [mg/100 ml]	Kyselina <i>p</i> -kumarová [mg/100 ml]	Katechin [mg/100 ml]
JK	1,0 ± 0,10	5,2 ± 0,30	10,3 ± 0,10	2,0 ± 0,10	70,0 ± 5,00
JC	0,22 ± 0,02	0,48 ± 0,03	2,3 ± 0,10	0,30 ± 0,01	16,0 ± 1,00
DO	1,8 ± 0,10	0,4 ± 0,10	1,12 ± 0,04	0,20 ± 0,02	7,4 ± 0,20
DFJO	5,2 ± 0,10	0,20 ± 0,01	0,52 ± 0,01	0,11 ± 0,01	2,8 ± 0,30
KP	0,8 ± 0,40	0,12 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,08 ± 0,01	2,4 ± 0,10

Na obsah polyfenolů má také vliv způsob technologické výroby octa. V laboratoři byly připraveny dva panely vzorků. První panel zahrnoval vzorky šťáv z dřínu obecného, které se nechaly volně kvasit ve fermentačních baňkách překryté sterilní gázou pro regulaci přístupu kyslíku. Druhý panel vzorků obsahoval stejné šťávy, ale jejich fermentace byla řízena. Nejprve byly ovocné šťávy naočkovány kvasinkami rodu *Saccharomyces bayanus* a zakryty zátkami pro anaerobní podmínky po dobu 18 dní, poté již proběhlo spontánní octové kvašení po dobu 42 dní [40]. Na obrázku 5 si lze všimnout, že první panel (I) vykazuje ve všech případech menší hodnoty TPC než panel druhý (II). Označení (Ž) značí octy vyrobené ze žlutých plodů, (O) octy vyrobené z oranžových plodů a označení (Č) octy z plodů červených. Největších hodnot TPC dosahují octy z červených plodů při přípravě řízenou fermentací.

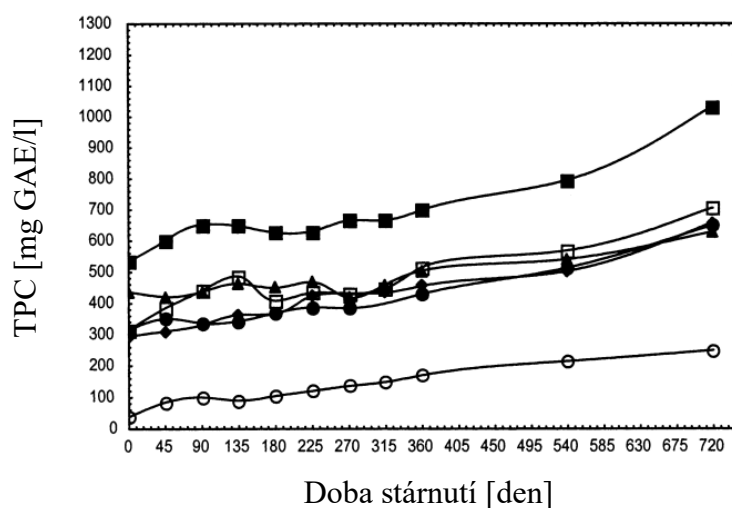


Obrázek 5: Porovnání celkového obsahu polyfenolů v octech z dřínu obecného [40]

1.4.3 Vliv skladování octa na složení polyfenolických látek

Sud patří mezi nejstarší nádoby na víno či ocet. Při konečných úpravách sudu je nutné spojit jednotlivé díly neboli dužiny k sobě a sud uzavřít. K tomu se používá ožehnutí vnitřku sudu ohněm, takzvaný „toasting“. Stupeň ožehnutí lze dělit na lehké, střední a silné ožehnutí, které ovlivňuje chemické změny v hloubce dřeva. Typ ožehnutí silně ovlivňuje konečné aroma produktu. Střední ožehnutí dosahuje do hloubky 2 mm, silné ožehnutí přibližně do 3 až 4 mm. Termodegradací celulózy a hemicelulózy vznikají furanové deriváty, degradací lipidů vznikají laktony. Z pohledu polyfenolických látek je důležitá termodegradace ligninu, kdy vznikají těkavé fenolické látky, jako jsou například: guajakol, eugenol nebo vanilin. Eugenol dává octům kořeněné aroma připomínající vůni hřebíčku a kouře. Významná je také termodegradace hydrolyzovatelných taninů [44,45]. Množství a rychlost extrakce polyfenolických látek ze sudů závisí na druhu a původu dřeva, stáří sudů, době používání (nový sud, či sud po mnoha cyklech stárnutí). Pro urychlení doby stárnutí, se dřevěné sudy nahrazují dubovými pilinami [46].

Bylo studováno šest sherry octů, které stály v sudech z amerického dubu. Na obrázku 6 lze vidět nárůst TPC v závislosti na době stárnutí. U všech vzorků se po 2 letech stárnutí obsah TPC přibližně zdvojnásobil, polyfenolický index rostl okolo 125 mg/l za rok. Mezi analyzované látky patřily: kyselina gallová, kyselina protokatechuová, kyselina vanilová, kyselina *p*-kumarová, kyselina skořicová, hydroxymethylfurfural, furfural, vanilin, protokatechuový aldehyd, kyselina *p*-hydroxybenzoová, tyrosol, *p*-hydroxybenzaldehyd, syringaldehyd a koniferylaldehyd a další [46].



Obrázek 6: Nárůst polyfenolického obsahu během stárnutí octů v sudech [46]

1.5 Antioxidační vlastnosti octů

Antioxidační látky jsou pro lidský organismus velmi důležité, některé si lidské tělo syntetizuje samo, jiné jsou přijímány potravou. Při normální funkci organismu stačí přijímané a biologicky syntetizované antioxidanty bojovat s volnými radikály a zabraňovat jim jejich možné degenerativní účinky na lidský organismus. Volné radikály vznikají v organismu při metabolické činnosti, dále jsou přijímány potravou. Pod jejich větší expozici se dostáváme při přemíře opalování, kouření cigaret nebo konzumací nezdravých potravin. Mezi volné radikály lze zařadit reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS). Označení volné radikály je dáno tím, že ve své struktuře mají jeden či více nespárovaných elektronů, díky kterým jsou reaktivní. V tomto stavu přetrvávají jen velmi krátkou dobu (10^{-9} – 10^{-12} s), poté se potkají s jinou molekulou předají jí nebo odejmou elektron, a tím ze zúčastněné molekuly vzniká nový radikál a je nastartována radikálová řetězová reakce [47].

Radikály odvozené od ROS jsou: superoxidový ($-\cdot\text{O}_2^-$), hydroxylový ($-\cdot\text{OH}$), alkylový ($-\text{R}\cdot$), alkoxylový ($-\text{RO}\cdot$), peroxylový ($-\text{ROO}\cdot$) a hydroperoxylový ($-\text{HOO}\cdot$) radikál. Radikály obsahující dusík jsou poté odvozeny od oxidu dusného ($-\text{NO}\cdot$) a oxidu dusičitého ($-\text{NOO}\cdot$) [32]. V případě přemíry volných radikálů v organismu vzniká oxidační stres, který může vyústit v mnohá závažná onemocnění. Mohou interagovat s proteiny, nukleovými kyselinami a mastnými kyselinami v buněčných membránách a plazmatických lipoproteinech a modifikovat je. Radikálové poškození nukleových kyselin může vést k dědičným mutacím a onkologickým onemocněním. Poškození proteinů může naopak nastartovat vznik autoimunitních onemocnění. Poškození lipidů a proteinů v plazmatických lipoproteinech může vést k rozvoji aterosklerózy či onemocnění koronárních tepen. Dále mají také neurodegenerativní vliv či vliv na rozvoj kardiovaskulárních onemocnění [9,48].

Pojem antioxidační aktivita (AOA) látek lze vysvětlit jako schopnost eliminovat volné radikály. Dalším pojmem je antioxidační kapacita látek, ta se vyjadřuje jako množství molů reaktivních radikálů, které byly eliminovány 1 molem antioxidantu za určitou dobu [32].

AOA fenolických látek je daná tím, že jsou donory elektronu nebo vodíku, jelikož jejich struktura obsahuje mnoho hydroxylových skupin, které vychytávají volné radikály nebo chelatují kovové ionty [27]. Mají redukční účinky, kde hydroxylová skupina na benzenovém jádře může být oxidována a vzniká sloučenina chinonu [49]. AOA je tedy závislá na chemické struktuře těchto látek. Například fenolické kyseliny vykazují větší AOA v závislosti na úrovni hydroxylace a tato schopnost klesá, když je hydroxylová skupina substituovaná

methoxyskupinou. Hydroxyskořicové kyseliny vykazují větší AOA než hydroxybenzoové, jelikož jsou lepšími donory [29].

Ocť obsahují velké množství biologicky aktivních látek, mnoho z nich plní funkci antioxidantů. Mezi hlavní látky patří primárně fenolické látky a melanoidiny, ale také některé aminokyseliny, vitaminy či organické kyseliny. Bylo zjištěno, že vysokomolekulární melanoidiny syntetizované během stárnutí tradičního balzamikového octa, mohou přispívat k celkové antioxidační aktivitě až 40–50 % [21]. Hroznové ocť vykazují vyšší antioxidační kapacitu než jablečné ocť [15]. Právě tradiční balzamikový ocet je považován za bohatý zdroj antioxidačních sloučenin, mezi které patří fenolické kyseliny, flavanoly, polymerní taniny a melanoidiny [4,15,18,50]. Některé bioflavonoidy mají větší antioxidační aktivitu než například vitamín C či D a jsou až 1000x účinnější v potlačení oxidace LDL cholesterolu než vitamín E [48].

Pro stanovení antioxidačních vlastností lze použít mnoho metod, je dobré je vzájemně kombinovat, jelikož každá metoda měří jiný aspekt antioxidačních schopností.

Metoda TEAC, neboli (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), se využívá pro stanovení celkové AOA. Principem je reakce vzorku s kation-radikálem ABTS \cdot^+ (2,2-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonátem)). Antioxidanty jsou donorem vodíku, tato změna se sleduje v absorpčních spektrech při vlnové délce 735 nm. Antioxidační kapacita vzorku je poté udávána jako ekvivalentní množství syntetického derivátu Troloxu. Antioxidační aktivita vzorku se udává jako koncentrace Troloxu v (mmol/l) [51].

Metoda FRAP, (Ferric-Reducing Antioxidant Power), je chemickou metodou, při které antioxidanty reagují s oxidanty, redukují je a tím je inaktivují. Dochází k redukcí komplexu Fe $^{3+}$ -2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazinu) (Fe $^{3+}$ -TPTZ) na Fe $^{2+}$ -TPTZ, kdy se poté měří nárůst absorpance při 593 nm. Tato metoda není zcela vhodná, jelikož nedochází k zachycení polyfenolických látek, které reagují pomalu [51]. Mezi další metody patří DPPH metoda (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) nebo CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) [43].

2 ANALÝZA POLYFENOLICKÝCH LÁTEK V OCTECH

Polyfenolické antioxidanty lze analyzovat separačními technikami, jako je plynová chromatografie či kapalinová chromatografie. Používají se i elektromigrační techniky jako kapalinová elektroforéza. Nejvíce používaná je však vysokoúčinná kapalinová chromatografie [52]. V následujících kapitolách jsou popsány principy a aplikace metod kapalinové chromatografie pro analýzu polyfenolů, včetně přípravy vzorků k analýze.

2.1 Úprava vzorku před analýzou

Jelikož ocet obsahuje kromě veliké škály polyfenolických látek různého charakteru i sacharidy, aminokyseliny, melanoidiny a další látky, je vhodné v některých případech přistoupit k přečištění vzorku. Navíc se polyfenoly vyskytují oproti již zmiňovaným analytům v nízkých koncentracích, a proto je nutné látky komplikující chromatogramy eliminovat [53,54].

2.1.1 Extrakce kapalina-kapalina

Principem extrakce v systému kapalina-kapalina (LLE) je ustanovení fázové rovnováhy mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Většinou se extrahuje z vodného roztoku do různých organických rozpouštědel. Účinnost extrakce závisí na volbě rozpouštědla, na době a teplotě extrakce [55]. Volba extrakčního činidla závisí na polaritě analyzovaných sloučenin. K extrakci polárních látek se používají extrakční činidla jako: diethylether, ethylacetát, aceton, ethanol a methanol. Podle způsobu provedení lze LLE dělit na jednostupňové, mnohastupňové či kontinuální extrakce. Mnohem selektivnější je však použití extrakce pevnou fází (SPE) [56].

2.1.2 Extrakce pevnou fází

Při extrakci pevnou fází se na pevné fázi selektivně zachycují analyty ze vzorku na základě svých chemických vlastností. Rušivé složky zachyceny nejsou a dochází k zakoncentrování vzorku s vhodným složením. Tato metoda je tedy mnohem selektivnější než LLE extrakce, navíc využívá menších objemů vzorků i rozpouštědel. Používají se kolonky obsahující různé absorpční materiály, jako jsou například: polyamidové náplně, polyvinylpolypyrrolidon, sephadex, silikagel či mikrokrytalická celulóza. Kolonky se silikagelem mohou být různě modifikované, kde je na jejich povrch navázán nepolární C8 řetězec (oktyl), C18 (oktadecyl) nebo diol. Samotným materiálem kolonek je sklo či polypropylen. Kromě typických kolonek se sorbenty se lze setkat s extrakčními disky, jedná

se o teflonové membrány s příslušným sorbentem. Velkou výhodou je možnost jejich uchování pro pozdější analýzy. Použitím on-line SPE, tedy přímého spojení extrakce se separací v jedné instrumentaci dosahujeme větší přesnosti a citlivosti, jelikož vzorky dávkujeme přímo a manipulace se vzorky je výrazně minimalizována.

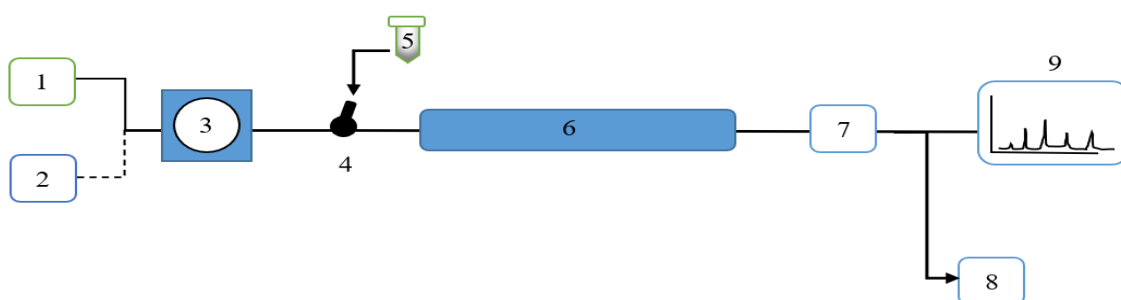
Provedení SPE lze popsat několika kroky. Prvním krokem je kondicionování kolonky. Jedná se o promytí kolonky vhodným rozpouštědlem, při kterém dochází k aktivování stacionární fáze. Následuje dávkování vzorku rozpuštěného v obdobném rozpouštědle, kdy dle vlastností SF a analytů, dochází k selektivnímu zachycování látek na pevné fázi a matrice. Nechtěné části vzorku jsou eluovány pryč. Třetím krokem je promývání, kdy dochází k odstranění zachycených částí matrice z kolonky. Čtvrtým krokem je sušení, tento krok se zařazuje, pokud se eluční rozpouštědlo velmi liší od promývacího roztoku. Kolonka je vysušena proudem inertního plynu. Posledním krokem je eluce, kolonka je promývána elučním rozpouštědlem a konečně dochází k desorpci žádaných látek [53,57]. Tabulka 5 znázorňuje používané sorbenty a eluční rozpouštědla při nepolární, polární a dalších typech extrakcí.

Tabulka 5: Různé principy extrakcí s vhodnými sorbenty a elučními rozpouštědly [57]

Princip	Sorbent	Eluční rozpouštědlo
Nepolární extrakce	C18, C8, CN, Fenyl	Hexan, dichlormetan, acetonitril, alkoholy
Polární extrakce	Silikagel, NH ₂ , CN, OH	Trichlormetan, ethylacetát, voda
Kationtová výměna	Silně kyselý katex	Kyseliny, roztoky solí, pufrý
Aniontová výměna	Bazický anex	Zásady, roztoky solí, pufrý
Extrakce ve směsném modu	CN/SiOH, NH ₂ /C18,	Chloroform, aceton, methanol, ethylacetát
Nepolární extrakce na polymeru	PS-DVB kopolymer	Ethylacetát, methanol, acetonitril

2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) patří mezi nejčastěji používanou separační metodu, při které dochází ke kvalitativnímu a kvantitativnímu stanovení látek ve vzorku. Vzorek je po dávkování do mobilní fáze unášen směrem k separační koloně, která plní funkci pevné fáze. V koloně dochází k odlišné distribuci analytů mezi stacionární (SF) a mobilní (MF) fází v průběhu ustavování rovnováhy. Distribuci analytů mezi dvě fáze lze popsat rozdělovací konstantou K_D , ta je dána podílem koncentrace složky ve stacionární fázi ku koncentraci složky ve fázi mobilní. Platí, že čím vyšší hodnotu K_D analyt má, tím déle je zachycován ve SF a jeho retence je větší. Každý analyt stráví v koloně určitou dobu, kterou vyjadřuje retenční čas. Retenční čas v sobě zahrnuje jak setrvání látky v mobilní fázi (mrtvý retenční čas), tak i čas strávený ve fázi stacionární (redukovaný retenční čas). Grafickým výstupem analýzy je chromatogram, který znázorňuje závislost měřené veličiny detektorem vztaženou na dobu analýzy. Na chromatogramu jsou rozseparované látky ve formě píků, jejichž vrchol odpovídá retenčnímu času a slouží k identifikaci analytu [55]. Na obrázku 7 je vidět schéma kapalinového chromatografu.



Obrázek 7: Schéma kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá ze: (1) zásobníku mobilní fáze, (2) odplyňovače neboli degasseru, (3) čerpadla či souboru čerpadel, (4) dávkovacího ventilu (autosampleru) pro vzorek (5), (6) kolony, (7) detektoru, (8) shromažďovací odpadní nádoby, (9) systému zpracovávající signál detektoru (PC jednotka) [58,59]. Jako první komponenty celé instrumentace jsou zásobníky s mobilními fázemi, je nutné je umístit výš než čerpadlo, aby docházelo k přirozenému vyrovnávání tlaků mezi atmosférickým tlakem a tlakem uvnitř systému. Mobilní fáze musí být odplyněna, jelikož zavzdušněná mobilní fáze může způsobovat problémy při separaci, jako je nestabilita základní linie, neopakovatelné retenční časy či špatná

opakovatelnost dávkovaného objemu. K odplynění mobilní fáze slouží vakuový degasser. Pohyb mobilní fáze celým systémem má na starost čerpadlo. Čerpadla jsou membránová či pístová, vyrobena z nerezové oceli. Hlavní kritérium, které musí čerpadlo plnit je stabilní průtok mobilní fáze. Nestabilita by vedla k odlišným retenčním časům, a tedy nepřesným výsledkům. Podstatné jsou však také další parametry, jako možnost širokého rozmezí pracovních tlaků od 1 do 100 MPa, a co nejmenší vnitřní objem čerpadla. Pro eluci látek může být nastaven režim isokratické nebo gradientová eluce. V případě isokratické eluce čerpá čerpadlo neměnnou MF v průběhu celé separace. Při gradientovém režimu dochází k cíleným změnám MF ve prospěch polárnější složky dle nastavení metody. Mísení probíhá ve směšovací zařízení. Dávkování vzorku je ve většině případů zcela automatické přes injekční jehlu dávkovače a vícecestného ventilu. Vícecestný ventil vykonává více činností, má na starosti oplach dávkovací jehly, dávkování vzorku do kolony nebo promývání kolony mobilní fází před další analýzou [60,61].

Nejdůležitější komponentou instrumentace je analytická kolona. Díky široké možnosti aplikací jsou dostupné kolony různých délek, vnitřního průměru a velikostí částic SF [55]. Obecně však lze analytické kolony charakterizovat jako kolony z nerezové oceli, dlouhé 10-150 mm s vnitřním průměrem okolo 0,2 až 5 mm, naplněné částicemi stacionární fáze o velikosti 3 až 5 μm . Jsou uloženy do termostatu, který má na starosti udržovat rovnoměrnou distribuci teploty, jinak se programová změna u HPLC neprovádí. Kolony musí být odolné, musí zvládnout odolávat vysokým pracovním tlakům a chemickému působení mobilní fáze. Někdy se před analytickou kolonu, umísťuje ochranná předkolona, která zamezuje poškozování kolony a zvyšuje její životnost. Životnost analytické kolony je přibližně 500 až 2000 injektovaných dávek vzorku [57,58].

Po separaci nastává detekce analytů. Detekční systémy volíme podle povahy analytů a dostupné instrumentace. Detektor by měl být univerzální, citlivý, poskytovat odezvu nejlépe na všechny hledané analyty a jeho signál by měl být nezávislý na změně složení MF, teploty a průtoku. HPLC detektory jsou spektrofotometrické (s fixní vlnovou délkou, s měnitelnou vlnovou délkou, s programovatelnou vlnovou délkou nebo diodovým polem), fluorescenční, elektrochemické (amperometrické a coulometrické), univerzální detektory na bázi aerosolu (detektor rozptylu světla a corona detektor), refraktometrické, vodivostní a hmotnostní spektrometry [57].

2.3 Fázové systémy kapalinové chromatografie

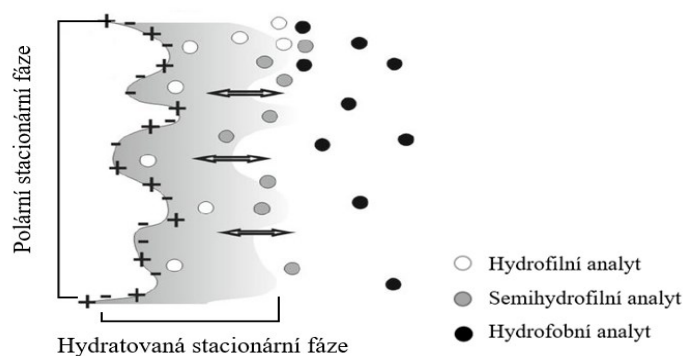
Jak již bylo zmíněno dříve, při chromatografické separaci, se látky rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze, fázi stacionární a mobilní. Pro polární látky se nejvíce používá separace na reverzní fázi, u silně polárních látek také separace hydrofilně interakční [55].

2.3.1 Separace na reverzní fázi

Jedná se o nejpoužívanější režim HPLC, při kterém se analyzují primárně polární, středně polární látky ale i některé nepolární analyty. Reverzní separace je založena na dělení analytů podle rozdělovacích koeficientů mezi mobilní a stacionární fázi, kdy mobilní fáze je více polární než stacionární fáze kolony. SF mají nepolární charakter a skládají se z nosiče, kterým je silikagel či nějaký hybridní sorbent, na němž jsou napojeny dlouhé nepolární uhlíkaté řetězce. Mezi nejběžnější SF lze zařadit C4 (butyl), C8 (oktyl), C18 (oktadecyl), C30 (triakontyl), fenyl a bifenyl [62]. Často používanou mobilní fází je směs methanolu, acetonitrilu a vody v různých poměrech, používají se i roztoky s pufrací kapacitou [53,58]. Nejčastěji se používá lineární gradientová eluce. Retence látek na RP roste se zvětšujícím se počtem a délkou alkylů v homologických řadách a dále s počtem aromatických jader. Naopak retence se snižuje s počtem silně polárních a iontových skupin (-NH₂, -OH, -COOH, -SO₃H). Silně polární látky a látky iontové povahy se na nepolární SF zdržují slabě, eluují velmi rychle a často jsou eluovány s mrtvým objemem kolony. V tom případě je lepší volit separaci hydrofilně-interakční [57].

2.3.2 Separace hydrofilně-interakční

Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) je technika, která se používá pro separaci silně polárních látek dobře rozpustných ve vodě, kdy je retence těchto látek v systému RP velmi nízká a naopak, v systémech NP dochází u některých analytů až k přílišnému zdržování na koloně. Hlavním hnacím mechanismem separace je dělení analytů mezi hydrofobní částí mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvou, která se tvoří na povrchu fáze stacionární, tento princip znázorňuje obrázek 8. Tato difuzní vrstva vody je imobilizována na polárních centrech stacionární fáze a k jejímu vzniku se doporučuje, aby mobilní fáze obsahovala alespoň 3 % vody. Používané polární stacionární fáze (SF) lze je rozdělit do tří skupin: neutrální SF, které jsou bez elektrostatických interakcí (diol, amid a cyklodextrin), nabitě SF, které jsou se silnými elektrostatickými interakcemi (silikagel a aminopropyl silikagel), zwitterionty, které jsou se slabými elektrostatickými interakcemi (sulfobetain a ZIC-HILIC) [63,64].



Obrázek 8: Princip HILIC separace [64]

Nejpoužívanějšími jsou kolony z nemodifikovaného silikagelu či kolony s modifikovanými silikagelovými fázemi neboli chemicky vázanými fázemi. Chemicky vázané fáze jsou například: aminopropylové, amidové, nitrilové, karbamátové, diolové, polyethylenglykolové či s polyhydroxylovými (cyklodextranovými a sorbitolovými), zwitteriontovými, sulfobetainovými či fosforylcholinovými skupinami [60]. Velmi perspektivním materiálem pro HILIC separace je silikagel typu C s hydrosilovaným povrchem, kde jsou silanolové skupiny (-Si-OH) nahrazeny hydridovými skupinami (-Si-H), případně modifikovanými méně polárními skupinami (C18, cholesterol a kyselina undekanová). Lze využít i monolitických HILIC kolon na bázi silikagelu či organických polymerů [59].

Mobilní fáze kromě malého množství vody musí obsahovat vysoký podíl organického rozpouštědla, zpravidla více než 60 %. Nejvíce používaným organickým rozpouštědlem je acetonitril, tetrahydrofuran nebo aceton. Dalšími interakcemi, které se uplatňují jsou druhotné elektrostatické interakce, které by neměly v separacích dominovat a lze je omezit přidáním amonných organických solí kyselin do mobilní fáze (mravenčan/octan amonný). Hlavními výhodami HILIC systému je dobrá retence polárních látek, použití vyšších průtoků MF, kdy vysoký podíl organické složky snižuje zpětný tlak v systému. Dále je velmi kompatibilní s ionizací vzorku elektrosprejem a hmotnostní detekcí, díky vysokému podílu acetonitrilu v MF [57,59,63,65,66,67]. Čím jsou analyty polárnější, jsou v systému více zadržovány. Jejich retenci lze snížit zvýšením polarity MF (klesá s rostoucím podílem vody/pufu) [63]. Pro analýzu bazických analytů je vhodnější použít SF modifikovanou amidovou skupinou nebo zwitteriontovou sulfobetainovou skupinou. Kyselé látky jsou naopak lépe separovat na SF modifikovaných propylamino skupinou [57].

2.4 Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Nejvíce používanými HPLC detektory jsou jednoznačně spektrofotometrické a detektory hmotnostně spektrometrické. Tyto detektory se používají také nejčastěji u analýz polyfenolických látek [57].

2.4.1 Spektrofotometrická detekce v ultrafialové a viditelné oblasti

Jak již bylo zmíněno dříve, patří sem detektory lišící se nastavením vlnových délek. Patří sem detektory s jednou fixní vlnovou délkou, dále s měnitelnou vlnovou délkou, kdy se pracuje s konkrétními vlnovými délkami. Další možností jsou detektory s programovatelnou vlnovou délkou umožňující detekci při určitém rozmezí vlnových délek, anebo měření při dvou či čtyřech vlnových délkách současně. Posledním typem je detektor diodového pole (DAD), snímající celé spektrum v průběhu chromatografické separace. Tyto detektory lze souhrnně popsat jako nedestruktivní, se selektivní odezvou, umožňující gradientovou eluci. Pro všechny tyto detektory platí, že detekují absorpci elektromagnetického záření analyzovaných složek v eluentu, pocházejícího ze zdroje. Snímá se v oblasti vlnových délek 190-800 nm, rozsah 190-400 nm odpovídá ultrafialové oblasti (UV), rozsah 400-800 nm poté viditelné oblasti (VIS). Aby bylo možné tyto detektory využít, musí mít analyty uskupení atomů a vazeb dovolující absorpci elektromagnetického záření zdroje [68,69]. O této situaci hovoříme, pokud má daná molekula chromofor. Chromofory jsou části molekul mající konjugované násobné vazby nebo dvojné vazby v aromatických či heterocyklických sloučeninách. U nearomatických sloučenin se jedná o sloučeniny mající nevazebný elektronový pár, mají tedy ve své struktuře atomy S, O a N. Pokud zkoumané látky neobsahují chromofor, využívá se vhodná derivatizace. Sloučeniny, které lze detekovat většinou podléhají svými absorpčními pásy přechodům:

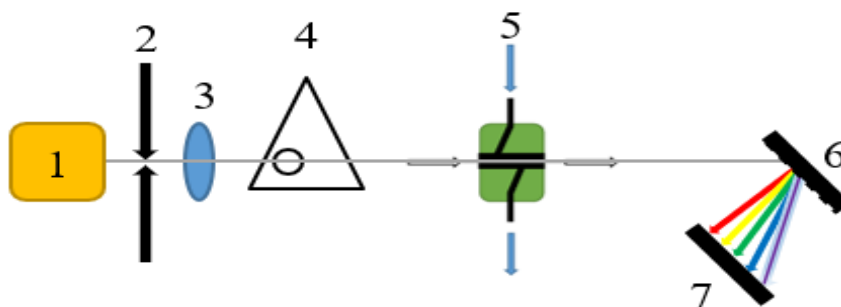
$\pi \rightarrow \pi^*$ - pro násobné vazby a konjugované systémy

$n \rightarrow \pi^*$ - pro volný elektronový pár a π -elektrony

$n \rightarrow \sigma^*$ - pro sloučeniny obsahující heteroatomy

Obrázek 9 znázorňuje instrumentaci detektoru diodového pole. Instrumentace se skládá ze (1) zdroje, (2) štěrbin, (3) čočky, (4) clony, (5) měrné cely detektoru (Z-cely), (6) konkávní holografické mřížky a (7) diodového pole. Záření ze zdroje, čímž je deuteriová výbojka, prochází měrnou celou detektoru a je spektrálně rozdělené pomocí holografické mřížky na jednotlivé vlnové délky, tedy bílé světlo zdroje je rozděleno na barevné spektrum paprsků. Na každou fotodiodu v diodovém poli poté dopadá zářivý tok o určité vlnové délce, tento

světelný tok je zeslabený absorpcí analytů v cele detektoru. Fotodiody jsou napojené na kondenzátory, které jsou předem nabitě na určitou hodnotu. Po dopadu toku na fotodiodu dochází k fotoelektrickému proudu, který vybijí kondenzátor. Toto vybití je přímo úměrné intenzitě dopadajícího záření. Poté následuje nabití kondenzátorů a je měřen proud, který je potřebný na jejich opětovné nabití. Spektrální rozlišení je dáno počtem fotodiód, jejich počet se pohybuje od 512 do 1024 [28,68-71].



Obrázek 9: Schéma detektoru s diodovým polem

Mezi hlavní výhody DAD detektoru patří možnost porovnání spektrogramů s knihovnou spekter a možnost ověření, zda chromatografický pík zastupuje pouze jednu látku, anebo dochází ke koeluci analytů [69]. Pokud však mají látky velmi podobná chromoforová centra, tedy látky jsou si strukturně blízké, mají také obdobná UV spektra a jejich identifikace může být ztížena. V tomto případě je vhodné využít kombinovanou detekci s hmotnostním spektrometrem [71,72].

2.4.2 Hmotnostně spektrometrická detekce

Hmotnostně spektrometrické detektory se skládají z iontového zdroje, kde probíhá ionizace vzorku, dále analyzátoru, kde dochází k rozdělení iontů podle poměru m/z a detektoru, který detekuje vzniklé ionty. Lze se setkat s mnoha druhy ionizačních technik, ale ve spojení s kapalinovou chromatografií se používá hlavně ionizace elektrosprejem (ESI), ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Volba ionizační techniky závisí na povaze analyzovaných analytů. APPI se využívá u nepolárních látek, APCI u látek nepolárních až středně polárních. Avšak pro látky polární, které analyzujeme v systému RP či HILIC, nejvíce dominuje ionizace elektrosprejem. Při ESI, dochází ke kontinuálnímu přivádění vzorku spolu s mobilní fází kapilárou k iontovému zdroji.

Ústí kapiláry je pod napětím a vytváří se zde elektrostatické pole. Vlivem elektrostatického pole dochází k vytvoření aerosolu kapiček s velkým nábojem. Vzniklé kapičky jsou poté díky sušícímu plynu postupně odpařovány, čímž se zmenšují a zvětšuje se jejich povrchový náboj. Po překonání kritické hodnoty jsou kapičky už tak malé, že mohou být považovány za ionty. Vzniklé ionty jsou vtahovány fokusačním systémem do hmotnostního analyzátoru. Hmotnostních analyzátorů je velká škála. Za zmínku stojí jednoduchý kvadrupól, jedná se o čtyři kovové tyče, kdy je na dvě protilehlé tyče vloženo kladné stejnosměrné napětí a na druhou dvojici napětí záporné, zároveň je na všechny čtyři tyče vloženo střídavé napětí. V moment, kdy je konkrétní poměr stejnosměrného napětí a amplitudy, dochází k oscilaci pro iont s určitým poměrem m/z . Tento vybraný iont osciluje mezi tyčemi a pokračuje dále do detektoru. Detektorem může být elektronový násobič, fotonásobič nebo Faradayova klec.

S hmotnostním spektrometrem ve spojení s kapalinovou chromatografií můžeme pracovat v režimu kdy se zaznamenávají kladné ionty, vznikají $[M + H]^+$ protonované molekuly, nebo záporné ionty $[M - H]^-$ [52]. Mobilní fáze musí být těkavá, přidávají se do ní různá aditiva jako kyselina mravenčí, octová či trifluoroctová. Pro kvantifikování sloučenin je nejvhodnější metoda vnitřního standardu [73,74].

2.5 Stanovení polyfenolických látek ve vzorcích octů

Odborná literatura, zabývající se polyfenolickými látkami v octech, se nejvíce zaměřuje na spektrofotometrické stanovení celkového obsahu fenolických látek pomocí Folin-Ciocalteu metody, zjištění antioxidační kapacity či jiné biologické aktivity těchto látek. Studií o samotném stanovení polyfenolů v octech je mnohem méně [11,50,54,75-78]. Častěji jsou polyfenoly stanovovány v jiných matricích jako jsou různé druhy vín, džusů, ciderů, piva, čajů [79], rostlinných extraktů, ovoce, zeleniny a dalších [80]. Úprava vzorků octů před samotnou analýzou je jednodušší, než je tomu u jiných matric. Pokud jsou polyfenoly stanovovány v rostlinných matricích, kde se vyskytují také ve vázané formě například v buněčné stěně, musí se provést kyselá či alkalická hydrolýza vzorku či jejich kombinace a následná extrakce, nejčastěji ethylacetátem [81]. Poté se provádí LLE nejčastěji za použití ethylacetátu, a to při pH 7 a 2, kdy se poté analyzuje neutrální a kyselý podíl každý zvlášť. Uvedená úprava vzorku není zcela selektivní a stále nedochází k výraznému zjednodušení chromatogramů [53,82]. Extrakce je jednoznačně ovlivněna teplotou, se zvyšující se teplotou extrakce, se rozpouštědlo dostává lépe do matric vzorků, díky snížené viskozitě a sníženému povrchovému napětí.

U polyfenolických látek může být však tato skutečnost na škodu, jelikož při příliš vysoké teplotě dochází k jejich oxidaci [83].

Vzorky sloužící k analýze polyfenolů jsou často okyselovány, aby se zabránilo ionizaci analytů. Úprava pH se častěji provádí u jiných vzorků než u vzorků octů, jelikož hodnota pH octů se pohybuje v rozmezí 2–3 [39,84]. V jedné analýze byly však vzorky octů okyseleny 1M HCl na hodnotu pH 2,0 a třikrát extrahovány ethylacetátem, poté byl u takto upravených vzorků ethylacetát odpařen pomocí rotační vakuové odparky. Zbytek byl rozpuštěn v methanolu, přefiltrován přes membránový filtr a analyzován [11]. Pro polyfenoly s nízkou molekulovou hmotností se jeví methanol jako nejúčinnější extrakční činidlo, zatímco například flavanoly s vyšší molekulovou hmotností jsou mnohem lépe extrahovány vodným acetonem [83].

Vzorky jsou před analýzou temperovány na teplotu laboratoře, přibližně na teplotu 20 °C [50,76]. V drtivé většině jsou vzorky octů přefiltrovány přes různé druhy membránových filtrů (polyvinylidenfluoridové, nylonové a polytetrafluorethylenové) nejčastěji o velikosti pórů 0,45 µm nebo 0,22 µm [29,40,42,46,50,76,77,85,86]. Pro úpravu zakalených octů byly v jedné analýze vzorky centrifugovány. Pro přečištění lze zvolit off-line či on-line SPE extrakci [29,54,87]. Přečišťovací kolonkou je nejčastěji typ C18 [29,54,87], Discovery DPA-6S (polyamid) [85] či Nexus SPE s hydrofilními a lipofilními vlastnostmi [87]. Pro vzorky octů byl vyvinut průtokový off-line systém pro prekoncentraci a extrakci polyfenolických látek. Pro selektivní zachycení analytů byla použita mini kolona obsahující nanočástice CoFe_2O_4 potažené celulórou s rozměry (75 mm x 3,2 mm) [56].

Po úpravě vzorku přistupujeme k samotné analýze. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie na obrácených fázích s různými druhy detekce je bezpochyby nejpoužívanější metodou stanovení [42,50,53,76,77,87,88]. V RP režimu se pracuje s kolonami: Phenomenex Luna C18 [77,76], Zorbax C18 [86], LiChrospher® RP-18 HPLC [56], Atlantis C18 [85], Acclaim C18 [50], Intersil C8 [87], Fenyl [11], Grom-Sil 120 ODS-4 HE [42], Merck Superspher 100 RP-18 [46], Purospher RP-18 [88] a Cadenza Imtakt C5-C18 [40].

V případě HILIC separací, se pro stanovení polyfenolů používají kolony jako Diol HILIC nebo kolony na bázi sulfobetainu [89].

V analýze zabývající se stanovením fenolických kyselin v balzamikové glazuře, což je vlastně zahuštěný balsamický ocet, byla před analytickou kolonu umístěna ochranná předkolona typu C18 [85]. V jiné analýze červených vinných octů, byla před analytickou kolonu Acclaim C18, umístěna předkolona ze stejného materiálu [50], jako předkolona byla

použita také Zorbax SB C18 [86] a Nova-Pak C18 [46]. Teplota kolony při separaci bývá 22,5 °C [46], 25 °C [85,88], 30 °C [42,86], 35 °C [50] a 40 °C [11,76].

Při separacích jednoznačně dominuje gradientová eluce [11,42,50,56,76,85]. Při separacích na reverzní fázi lze mobilní fázi popsat jako směsnou, složenou ze dvou složek (A), (B), kdy se mění podíl složek, čímž se mění polarita MF. Nejčastěji se jedná o různé poměry vody a acetonitrilu [11], často je součástí i malé množství kyseliny octové [11] nebo kyseliny mravenčí [51]. Také se používá okyselená voda 0,1% či 0,2% trifluoroctovou kyselinou (A), a stejně takto okyselený acetonitril (B) [76,85,86]. Kyselina mravenčí byla použita v mobilní fázi složené z (A) vody-kyseliny mravenčí, (99:1, v:v), z (B) acetonitrilu-(A) (60:40, v:v) [77]. Byla také použita mobilní fáze složená z (A) vodného roztoku kyseliny octové (1%), (B) metanolu [56] nebo mobilní fáze o různé polaritě systému methanol-voda okyselené kyselinou octovou na pH 3–4 [87,88].

U HILIC separací také převládá gradientová eluce [89-91]. Byly použity mobilní fáze složené z acetonitrilu (A) a 0,5% vodného roztoku kyseliny mravenčí (B) [90], nebo 0,4% roztoku kyseliny trifluoroctové v acetonitrilu (A) a 0,4% vodného roztoku kyseliny trifluoroctové (B) [91]. Další použitou mobilní fází byl 10 mM roztok kyseliny mravenčí o pH 2,8 nebo 10 mM roztok octanu amonného o pH 7 a 9 (A) a methanol nebo acetonitril (B) [92].

Pokud se volí vhodná detekce těchto analytů, často se přistupuje ke spektrofotometrické detekci v UV-VIS oblasti [11,31,42,86] v rozmezí vlnových délek od 190–380 nm. Vhodnými vlnovými délkami jsou: 280 nm pro flavanoly, 320 nm pro hydroxyskořicové kyseliny a 360 nm pro flavonoly. Vhodnější je však detektor diodového pole (DAD) [40,50,53,56,76,85-88]. Identifikace sloučenin je dle retenčních časů analytů a charakteristických UV spekter.

Mezi další nejčastěji používané detektory patří bezpochyby hmotnostní spektrometr (MS) s ionizací elektrosprejem, nejčastěji v módu negativních iontů [28,42,53,56,77,78]. Kvantitativní stanovení je poté prováděné metodou kalibrační křivky daného standardu. Při analýze vinných a jablečných octů bylo použito spojení LC-DAD-ESI-MSⁿ, kde MSⁿ značí tandemovou hmotnostní spektrometrii [77] nebo LC-TOF-MS/MS, kde TOF označuje analyzátor doby letu [93].

Pro separaci rozmanitých polyfenolických struktur různých polarit, které by nebylo možné účinně separovat, přistupujeme ke dvoudimenzionální kapalinové chromatografii (LC×LC). Jedna dimenze, tedy jeden separační systém, pracuje s kolonou, na níž probíhá jiný separační mechanismus a jsou voleny jiné podmínky separace (gradientová eluce, jiné složení MF), než u druhé dimenze. V této situaci se zkoušelo spojení reverzní C18 kolony v první dimenzi

a kolony HILIC v druhé dimenzi. Pro separaci fenolických kyselin a flavonů bylo také použito spojení LC s PEG kolonou a LC s C18 kolonou. Jak lze předpokládat retenční chování analytů bylo různé. Fenolické kyseliny byly relativně málo zadržovány, jak na PEG, tak i na C18, zatímco flavonové glykosidy byly více zadržovány na C18 než na PEG. Flavonové aglykony byly poté silně zadržovány na obou kolonách. Tímto propojením dochází ke zvýšení možného počtu separovaných sloučenin, tedy píkové kapacity, která by v ideálním případě měla být násobkem píkových kapacit jednotlivých dimenzí [33,94,95].

Kromě HPLC se setkáváme i s ultra vysokoúčinnou kapalinou chromatografií (UHPLC) s hmotnostní detekcí. Takto byly analyzovány fenolické sloučeniny v octu z cukrové třtiny [96]. V analýze zabývající se identifikací a kvantifikací polyfenolických látek a jejich aldehydových derivátů ve víně, lihovinách a octech se osvědčilo spojení UHPLC-MS, kdy před analýzou byla provedena online prekoncentrace na SPE kolonce, aby se zabránilo možným interferencím zkoumaných matic. U této analýzy byly zkoušeny různé analytické kolony. Kolona Acclaim HILIC-10 nedokázala zadržovat velké množství nepolárních analytů, píky na chromatogramech byly široké a nepravidelné. Další zkoušenou kolonou byla C18, kde docházelo k uspokojivé separaci. Poslední testovanou kolonou byla Poroshell 120 EC, která však byla méně efektivní a selektivní [29].

Byly analyzovány vinné octy ze dvou španělských oblastí, Jerez a Condado de Huelva, jejichž výrobky mají chráněné označení původu. Obě tyto oblasti leží na jihozápadě Španělska a technologie těchto octů je podobná. Podle složení polyfenolických látek lze tyto octy odlišit. Byla použita metoda UHPLC s kolonou BEH C18 (100 mm x 2,1 mm x 1,7 μ m) a DAD detekcí. Vzorky octů byly před analýzou přefiltrovány přes 0,20 μ m nylonový filtr [38,97].

U analýz nesmíme zapomenout na další používanou separační metodu jakou je plynová chromatografie (GC). Použití plynové chromatografie je pro polyfenoly komplikovanější vzhledem k nutnosti derivatizace na těkavější analyty methylocí, trifluoacetylací nebo trimethylsilylací. Takto byly analyzovány fenolické kyseliny v tradičním balzamikovém octu z Modeny, po předchozí derivatizaci N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoacetamidem (BTSFA). K detekci se běžně používá plamenově-ionizační nebo hmotnostní detektor, který je citlivější a selektivnější [33,98].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité přístroje a zařízení

Navazování standardů bylo provedeno na analytických digitálních váhách (Sartorius, Ústí nad Labem). Pro přípravu standardů a vzorků byly použity mikropipety (Thermo Scientific, Finland) a potřebné laboratorní nádoby (navazovací lodičky, lžičky, baňky a kádinky). Pro úplné rozpuštění standardů byla použita ultrazvuková lázeň (Fisherbrand, USA). Absorpční spektra standardů byla proměřena pomocí UV-VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2600 (Shimadzu, Japonsko) s použitím kyvet 6030-UV s optickou dráhou 10 mm (Hellma, Německo). Vzorky octů byly centrifugovány na centrifuze (Biofil, Čína).

Samotná chromatografická separace byla provedena na dvou kapalinových chromatografech:

1. Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, USA)

Jehož součástí byly komponenty:

- autosampler G1389A, MicroALS (Agilent Technologies, USA)
- čerpadlo G1376A, CapPump (Agilent Technologies, USA)
- detektor G1315B, DAD (Agilent Technologies, USA)

2. Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, USA)

Jehož součástí byly komponenty:

- autosampler G7129C, 1260 Vialsampler (Agilent Technologies, USA)
- čerpadlo G7104C, 1260 Flexible Pump (Agilent Technologies, USA)
- detektor G7115A, 1260 DAD WR (Agilent Technologies, USA)
- detektor G6160A, Infinity Lab LC/MSD iQ (Agilent Technologies, USA)

Při separacích byly použity tyto kolony:

1. InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 (rozměry: 150 x 3 mm, zrnitost 2,7 μm , Agilent, USA)
2. Kinetex C18 (rozměry: 100 x 3 mm, zrnitost: 2,6 μm , Phenomenex, USA)
3. Kinetex Polar C18 (rozměry: 100 x 3 mm, zrnitost: 2,6 μm , Phenomenex, USA)

3.2 Použité vzorky a chemikálie

3.2.1 Chemikálie

Navážené standardní látky byly rozpuštěny v demineralizované vodě (upravené stanicí Milli-Q®, Merck, Německo) a metanolu (HPLC gradient grade, Merck, Německo). Pro mobilní fázi byla použita demineralizovaná voda (upravená stanicí Milli-Q®, Merck, Německo) okyselena kyselinou octovou ($\geq 99,7\%$, Sigma Aldrich, USA) a acetonitril (HPLC gradient grade, Sigma Aldrich, USA). Ke zjištění mrtvého objemu chromatografického systému byla použita thiomočovina ($\geq 99,0\%$, Sigma Aldrich, USA). Pro zjištění zpoždění gradientu byl použit aceton ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich, USA).

3.2.2 Standardy

1. Kyselina kávová	Mr (180,16 g/mol)	(97%, Sigma Aldrich, USA)
2. Kyselina ferulová	Mr (194,18 g/mol)	(99%, Sigma Aldrich, USA)
3. Kyselina protokatechuová	Mr (154,12 g/mol)	($\geq 97\%$, Sigma Aldrich, USA)
4. Kyselina kumarová	Mr (164,16 g/mol)	(98%, Sigma Aldrich, USA)
5. Kyselina chlorogenová	Mr (354,31 g/mol)	($\geq 95\%$, Sigma Aldrich, USA)
6. Kyselina gallová	Mr (170,12 g/mol)	($\geq 98\%$, Fluka, Německo)
7. Kyselina syringová	Mr (198,18 g/mol)	($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, USA)
8. Kyselina vanilová	Mr (168,15 g/mol)	($\geq 97\%$, Fluka, Německo)
9. (+)-Katechin	Mr (290,26 g/mol)	(>97%, Fluka, Německo)
10. (-)-Epikatechin	Mr (290,27 g/mol)	(>90%, Fluka, Německo)
11. Vanilin	Mr (152,15 g/mol)	(99%, Sigma Aldrich, USA)
12. Furfural	Mr (96,08 g/mol)	(neuveveno, Sigma Aldrich, USA)
13. Protokatechuový aldehyd	Mr (138,12 g/mol)	(97%, Sigma Aldrich, USA)
14. Syringol	Mr (154,16 g/mol)	(99%, Sigma Aldrich, USA)
15. Konyferylalkohol	Mr (180,07 g/mol)	(98%, Sigma Aldrich, USA)

3.2.3 *Vzorky octů*

1. Jablečný ocet kvasný
 - značka: Bzenecký ocet
 - druh: jablečný
 - stav: neotevřený
 - zakoupeno v Hypermarketu Albert
 - zakoupeno dne: 15. 6. 2021

2. Aceto Balsamico di Modena IGP
 - značka: Kaiser Franz Josef
 - druh: vinný
 - stav: neotevřený
 - zakoupeno v Hypermarketu Albert
 - zakoupeno dne: 15. 6. 2021

3. Japanese Rice Vinegar
 - značka: Yutaka
 - druh: rýžový
 - stav: neotevřený
 - zakoupeno v Hypermarketu Albert
 - zakoupeno dne: 15. 6. 2021

3.3 *Pracovní postup*

3.3.1 *Příprava roztoků standardů*

Roztoky standardů byly připraveny na výchozí koncentraci 1 g/l. Byly naváženy 4 mg každého standardu do skleněné vialky o objemu 4 ml. Byly přidány 2 ml methanolu a vody 50:50 (v/v). Pro úplné rozpuštění byly připravené roztoky vloženy do ultrazvukové lázně na 10 minut.

K analýze na UV-VIS spektrometru bylo odebráno 500 μ l ze standardních roztoků do 25 ml baněk doplněných na celkový objem destilovanou vodou. Pro proměření základní linie, byla použita demineralizovaná voda. Připravené roztoky analytů bylo potřeba více zředit,

aby hodnota absorpance byla kolem hodnoty 1, kdy je dané fotometrické měření zcela spolehlivé.

Pro HPLC analýzu bylo ze standardních roztoků odpipetováno 5 μl do vialek a ty doplněny 495 μl demineralizovanou vodou na celkový objem. Takto byl také připraven směsný standard, zahrnující všech 15 analytů a doplněn 425 μl demineralizované vody na celkový objem 500 μl .

3.3.2 Příprava vzorků octů

Pro odstranění zákalu byl vzorek balzamikového octa centrifugován po dobu 5 minut, toto bylo provedeno preventivně i u ostatních vzorků. Vzorky nebylo třeba ředit a pro chromatografickou analýzu bylo do vialky odebráno 500 μl příslušného vzorku.

3.3.3 Pracovní podmínky HPLC analýzy

Analýza všech standardů a vzorků byla prováděna na kapalinovém chromatografu v RP systému s detekcí diodovým polem a detekcí hmotnostním spektrometrem. Při analýze byly použity kolony InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, Kinetex C18 a Kinetex Polar C18. Směsná mobilní fáze byla složena ze složky (A) demineralizované vody okyselené kyselinou octovou 0,1% a složky (B) acetonitrilu. Byly testovány tři profily gradientů: od 5 % do 50 % ACN, od 5 % do 70 % ACN a posledním gradientem od 5 % do 100 % ACN. Díky povaze kolony Kinetex Polar bylo možné u této kolony nastavit koncentrační gradient již od 0 % ACN v MF. Dávkovací objem činil 5 μl a průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min u kolony InfinityLab Poroshell 120 SB-18 u zbylých kolon poté na 0,3 ml/min. Při separacích byla nastavena teplota kolony na 30 °C. Detekce standardů i vzorků probíhala při více vlnových délkách. Celková doba analýzy byla nastavena na 25 minut, doba gradientu na 23 min. Pracovní podmínky hmotnostního spektrometru byly nastaveny takto: skenování v pozitivním a negativním módu v rozmezí od 90 až 700 m/z . S frekvencí záznamu spektra 6 Hz.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Určení vhodné vlnové délky pro detekci analytů

Ke zjištění vhodné vlnové délky pro nastavení detekčních parametrů detektoru diodového pole, bylo využito měření na UV-VIS spektrofotometru. Pro měření absorpčních spekter bylo voleno rozmezí vlnových délek 200–400 nm. V příloze 3 jsou uvedena proměřená spektra standardních roztoků polyfenolů. Schopnost polyfenolů silně absorbovat záření v UV-VIS oblasti je dáno tím, že díky absorpci dochází k elektronovým přechodům molekulárních orbitalů typu π , tato skutečnost poté vede k vzniku charakteristických spekter. Absorpční spektra byla z důvodu strukturně odlišných látek různá, a proto byla potřeba využít detekce diodového pole s nastavením tří různých signálů pro pokrytí většího rozmezí vlnových délek, 254 nm, 280 nm a 340 nm vše s referencí 400 nm. Při 400 nm je absorbance standardních látek prakticky nulová, a proto byla použita pro kompenzaci vlivu gradientové eluce na detekční signál. Při hodnotě 280 nm dávaly všechny analyty dostačující signál, a proto byla tato vlnová délka zvolena, pro odečtení retenčních časů při kvalitativní analýze. Pro kvantitativní analýzu byly poté vybrány vlnové délky odpovídající absorpčním maximům daných látek.

4.2 Chromatografická separace

Standardy a vzorky byly separovány pomocí gradientové eluce. U kolon InfinityLab Poroshell 120 SB-C18 a Kinetex C18, byly proměřeny profily gradientů od 5 % do 100 % ACN, oproti tomu gradienty na koloně Kinetex Polar C18 začínají již od 0 % ACN v MF. Na rozdíl od prvních dvou kolon obsahuje kolona Kinetex Polar částice s modifikovaným polárním povrchem, který zabraňuje kolapsu oktadecylových řetězců a může být používána v čistě vodných mobilních fázích. Tabulka 6 znázorňuje profily zkoušených gradientů u příslušných kolon.

Tabulka 6: Zkoušené profily gradientů u příslušných kolon

Poroshell 120 SB-C18, Kinetex C18						Kinetex Polar C18					
Gradient 1		Gradient 2		Gradient 3		Gradient 1		Gradient 2		Gradient 3	
t [min]	Φ_{ACN} [%]	t [min]	Φ_{ACN} [%]	t [min]	Φ_{ACN} [%]	t [min]	Φ_{ACN} [%]	t [min]	Φ_{ACN} [%]	t [min]	Φ_{ACN} [%]
0	5	0	5	0	5	0	0	0	0	0	0
23	100	23	70	23	50	23	100	23	70	23	50
24	5	24	5	24	5	24	0	24	0	24	0

Pro popis průběhu gradientů byla vypočtena strmost zvolených gradientů, podle vzorce (1).

$$B = \frac{\varphi_k - \varphi_p}{t_g} \quad (1)$$

B – strmost gradientu [min^{-1}]

φ_k – koncová koncentrace složky mobilní fáze s vyšší eluční silou [%]

φ_p – počáteční koncentrace složky mobilní fáze s vyšší eluční silou [%]

t_g – doba gradientu [min]

Vypočtené hodnoty strmosti gradientů jsou uvedeny v tabulce 7. Pro výpočet strmosti byla uvažována pouze stoupající část gradientu tzn. bez návratu na počáteční podmínky.

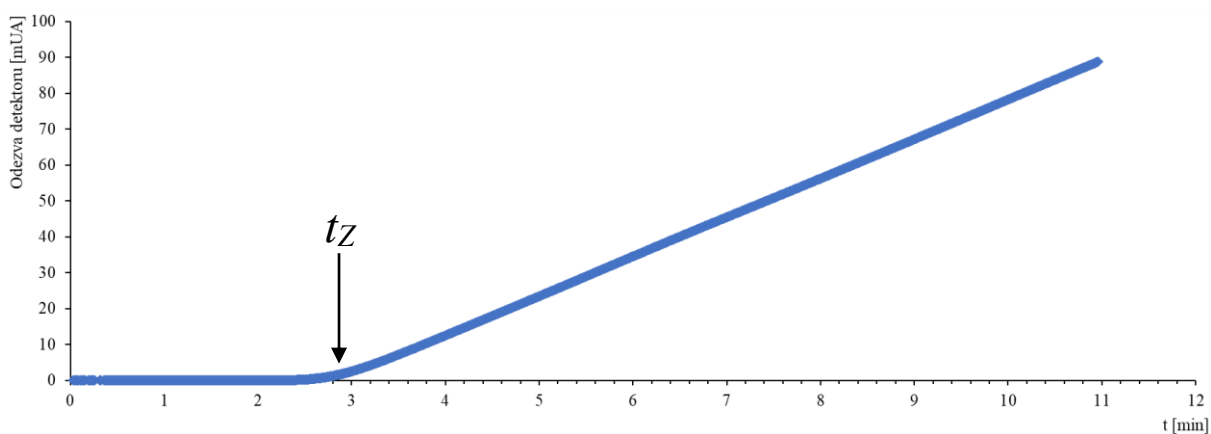
Tabulka 7: Vypočtené hodnoty strmosti gradientů u příslušných kolon

Poroshell 120 SB-C18, Kinetex C18			Kinetex Polar C18		
Gradient 1	Gradient 2	Gradient 3	Gradient 1	Gradient 2	Gradient 3
Strmost gradientu B [min^{-1}]	Strmost gradientu B [min^{-1}]	Strmost gradientu B [min^{-1}]	Strmost gradientu B [min^{-1}]	Strmost gradientu B [min^{-1}]	Strmost gradientu B [min^{-1}]
0,041	0,028	0,019	0,043	0,030	0,022

U prvních dvou kolon je průběh gradientů stejný, jelikož na strmost gradientu má vliv doba gradientu, počáteční a koncová koncentrace acetonitrilu. Pozvolnější gradient je u všech kolon vždy gradient 3, jelikož za stejnou dobu 23 minut musí dojít pouze k nárůstu do 50 % ACN v mobilní fázi, kdežto u gradientu 1, musí za tuto dobu dojít nastavená koncentrace až do 100 % ACN v MF. Tato strmost má velký vliv na separaci, tento jev je dále popsán v kapitole 4.4.

4.3 Zpoždění gradientu

Při chromatografické analýze byly separace nejprve prováděny na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series s DAD detekcí. Z důvodu složité matrice octů a obtížné identifikace látek pouze na základě shody retenčních časů a UV spekter bylo rozhodnuto, že se reálné vzorky a směsné standardy proměří také na kapalinovém chromatografu Agilent 1260 Infinity II s DAD a MS detekcí. Vytvořená metoda byla poté přenesena do softwaru chromatografu s MS detekcí, přičemž byl využit tzv. ISET systém (Intelligent System Emulation Technology). Ten umožňuje přizpůsobit vnitřní objemy čerpadla a napodobit tak jakýkoliv typ chromatografu. K tomu bylo potřeba proměřit zpoždění gradientu prvního chromatografu, který popisuje graf 1. Zpoždění gradientu bylo proměřeno pomocí lineární změny složení mobilní fáze voda/voda + 0,1% aceton a s použitím spojky místo kolony. V grafu 1 si lze všimnout, že zpoždění gradientu, t_Z , dosahuje přibližně 2,9 minut. Protože bylo zpoždění gradientu měřeno při objemovém průtoku mobilní fáze 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, odpovídá průměrná naměřená hodnota 870 μl . Pro analýzy s ISET systémem byla hodnota zpoždění zaokrouhlena na nastavených 900 μl .



Graf 1: Zpoždění gradientu na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 Series

4.4 Porovnání retenčního chování polyfenolických látek

Pro sadu standardů fenolických kyselin, flavonoidů a dalších látek, uvedených v příloze 1 a 2, bylo proměřeno retenční chování na třech kolonách při třech profilech gradientů, tabulka 6. Retenční časy jsou uvedeny v příloze 4 v tabulkách 12, 13, 14, jako průměrné hodnoty tří analýz. Z retenčních časů byl vypočítán retenční faktor v gradientu dle vzorce (2), (příloha 4, tabulka 12, 13, 14).

$$k' = \frac{t_{R,g}}{t_{m,g}} - 1 \quad (2)$$

k' – retenční faktor látky v gradientu

$t_{R,g}$ – retenční čas látky v gradientu [min]

$t_{m,g}$ – mrtvý retenční čas látky v gradientu [min]

Jelikož byl uvedený retenční faktor k' vypočítán z gradientových dat, není totožný s retenčním faktorem při izokratické analýze. Pro retenční čas látky v gradientu $t_{R,g}$ bylo také vypočteno složení mobilní fáze v bodě eluce, φ_e , podle rovnice (3). Hodnoty φ_e jsou uvedeny v příloze 4, tabulka 12, 13, 14.

$$\varphi_e = \varphi_0 + (t_{R,g} - t_Z) \cdot B \quad (3)$$

φ_e – složení mobilní fáze v bodě eluce [%]

φ_0 – počáteční koncentrace acetonitrilu v gradientu [%]

t_Z – čas zpoždění gradientu [min]

$t_{R,g}$ – retenční čas analytu v gradientu [min]

B – strmota gradientu [min^{-1}]

Vliv polarity analytů

Pro výběr vhodné kolony a složení mobilní fáze bylo sledováno retenční chování látek při již zmíněných profilech gradientů, tabulka 6. Za prvé lze vidět, že polárnější analyty jsou eluovány nejdříve, to je jasný principiální jev na reverzní fázi. Například, první eluovanou látkou byla vždy kyselina gallová, (kyselina 3,4,5-trihydroxybenzoová), oproti tomu kyselina protokatechuová, (3,4-dihydroxybenzoová kyselina), obsahující o jednu hydroxylovou skupinu

méně byla eluována jako druhá. Bylo ověřeno, že deriváty hydroxybenzoových kyselin (kys. gallová, protokatechuová, syringová a vanilová) jsou eluovány dříve, než deriváty kyseliny hydroxyskořicové (kys. ferulová, kumarová a kávová), jelikož jejich struktura obsahuje delší uhlíkový řetězec na benzenovém jádře. Dále retence rostla s větším počtem methoxy skupin v chemické struktuře, pro příklad kyselina kávová obsahující pouze hydroxyskupiny byla vždy eluována dříve, než její strukturní analog (kyselina ferulová) obsahující však jednu methoxy skupinu, (příloha 4, tabulka 12, 13, 14).

Vliv strmosti gradientu

Pokud se na separaci díváme z pohledu strmosti gradientu, lze sledovat stejný trend u všech kolon a to, že s rostoucí koncentrací organického rozpouštědla se retence snižovala a látky byly eluovány rychleji (příloha 5, graf 20, 21, 22) a (příloha 6, graf 23, 24, 25). Jinak řečeno, retenční časy analytů byly vždy nejkratší při gradientu 1 a nejdelší při gradientu 3. Toto chování lze dobře porovnat, jelikož všechny gradienty mají stejnou dobu trvání 23 minut. Při strmějším gradientu sice dochází k rychlejší eluci, což by bylo dobré z pohledu rychlejší analýzy, ale tento rozdíl retenčních časů není tak významný, nicméně dochází k nežádoucímu shlukování píků. Oproti tomu při pozvolnějším gradientu, (gradientu 3), docházelo sice k delší retenci, ale dané látky měly čas se lépe rozseparovat a nedocházelo k takové koeluci píků (příloha 5, graf 22) a (příloha 6, graf 25). Proto bylo pro skupinu patnácti polyfenolických látek vybrán pozvolnější gradient. Pro látky, které se vždy eluovaly mezi prvními, nedocházelo k významnému posunu retenčních časů při gradientu, jelikož se vždy začínalo na stejné původní koncentraci 5 % nebo 0 % ACN. Pro příklad retence kyseliny gallové na koloně Polar C18 odpovídala při gradientu 1 (5,84 min), gradientu 2 (6,00 min), gradientu 3 (6,16 min) uvedeno v příloze 4, tabulce 14. Pro déle eluující látky, tedy ty méně polární byl rozdíl v retenci největší, protože strmost měla výraznější vliv. To lze pozorovat například u syringolu kdy při gradientu 1 byl retenční čas (11,06 min), gradientu 2 (12,67 min) a gradientu 3 (14,80 min), (příloha 4, tabulka 14).

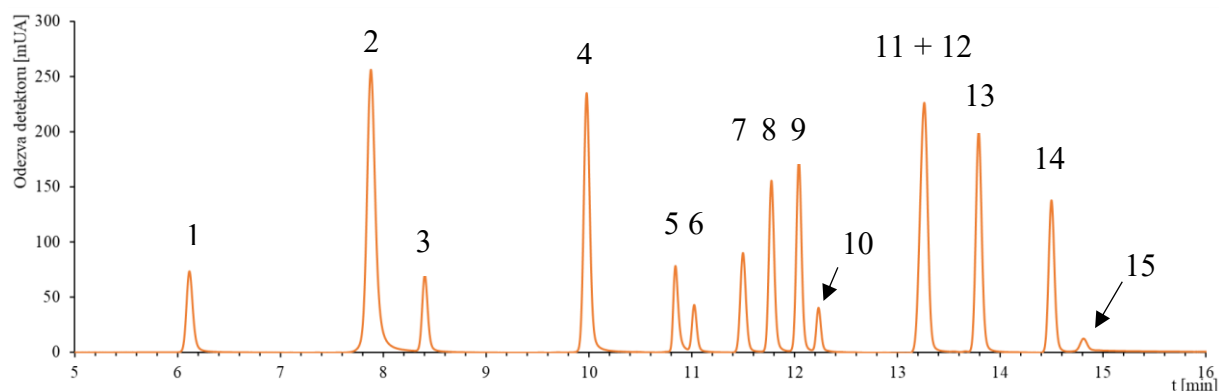
Vliv stacionární fáze

Všechny zkoušené kolony jsou z povrchově porézních částic, kde stacionární fází je řetězec C18. Kolona Kinetex Polar C18 má navíc modifikovaný povrch umožňující použití čistě vodných fází. Na koloně Kinetex Polar C18 nedocházelo ke změně elučního pořadí analytů, (příloha 4, tabulka 14). Oproti tomu, u kolony Kinetex C18 došlo ke změně eluce mezi epikatechinem a kyselinou syringovou u gradientu 1 a 2, (příloha 4, tabulka 13).

4.5 Chromatografická separace podle zvoleného profilu gradientu a kolony

4.5.1 Vliv nastavení profilu gradientu a kolony na separaci analytů

K nejlepší separaci docházelo na koloně Kinetex Polar C18 a koloně Kinetex C18 při použití profilu gradientu 3. Kolona Kinetex Polar C18 byla účinnější jelikož, chromatografické píky byly vyšší a užší (příloha 6, tabulka 23, 24, 25), než na koloně Kinetex C18 (příloha 5, tabulka 20, 21, 22). Chromatografické separace na koloně Infinity Poroshell 120 SB-C18 nejsou uvedeny ani diskutovány, jelikož píky byly širší a nesymetrické. Graf 2 znázorňuje nejvhodnější chromatografickou separaci na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu 3.

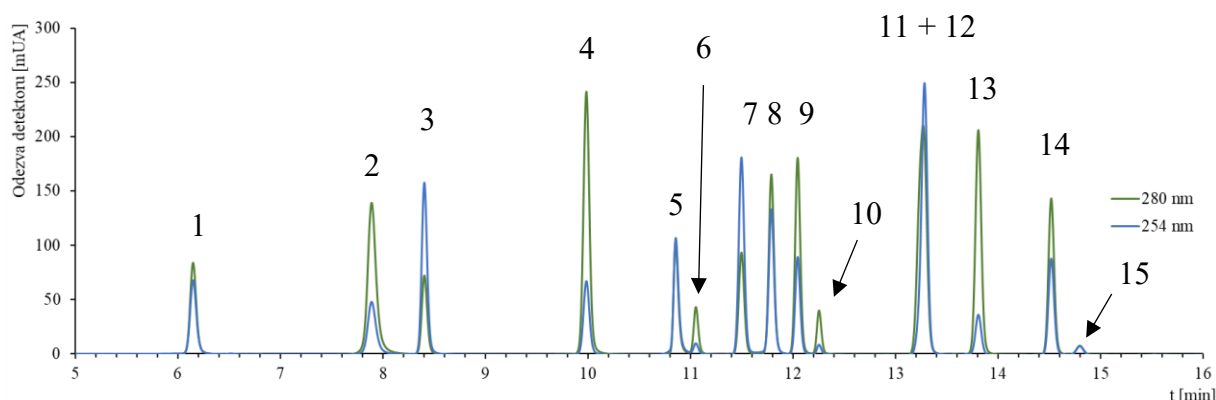


1) *K. gallová* 2) *Furfural*, 3) *K. protokatechuová*, 4) *Protokatechuový aldehyd*, 5) *K. chlorogenová*, 6) *Katechin*, 7) *K. vanilová*, 8) *K. kávová*, 9) *K. syringová*, 10) *Epikatechin*, 11) *Vanilin*, 12) *Konyferylalkohol*, 13) *K. kumarová*, 14) *K. ferulová*, 15) *Syriгол*

Graf 2: Chromatogram směšného standardu

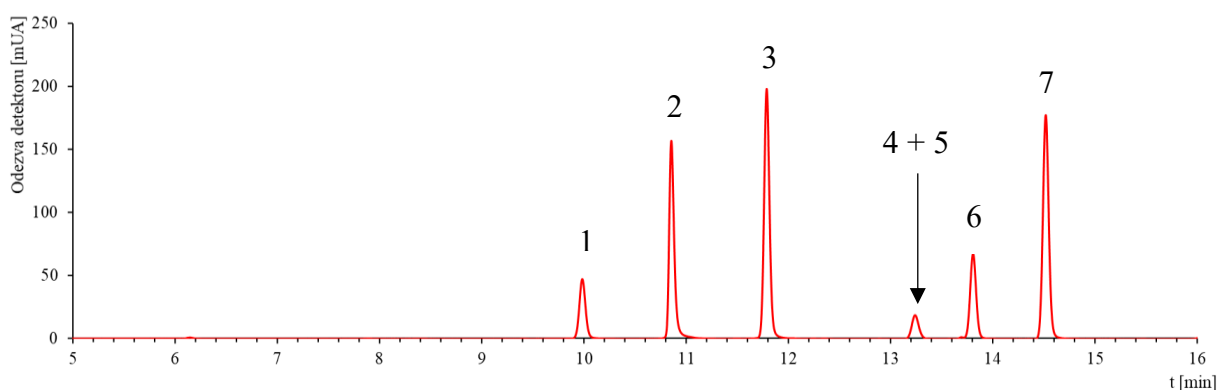
4.5.2 Vliv nastavení vlnové délky na detekci analytů

Po zvolení vhodného profilu gradientu a kolony je potřeba také zvolit nejvhodnější vlnovou délku pro kvalitativní analýzu. Níže uvedené grafy 3 a 4 znázorňují separaci při profilu gradientu 3 na koloně Polar C18. Při 254 nm lze detekovat všechny zkoumané analyty, ale ve většině případů poskytují analyty vyšší odezvy při 280 nm. Tuto skutečnost lze vidět v grafu 3, kdy u 9 analytů byla zaznamenána vyšší odezva detektoru, a proto byly odečítány retenční časy standardů při této vlnové délce. Graf 4 znázorňuje separaci při 340 nm. Volba této vlnové délky je nevhodná, jelikož jsou na chromatogramu pouze protokatechuový aldehyd, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, vanilin, konyferylalkohol, kyselina kumarová a kyselina ferulová. Pro jasnější zobrazení, začínají chromatogramy v páté minutě.



1) *K. gallová* 2) *Furfural*, 3) *K. protokatechuová*, 4) *Protokatechuový aldehyd*, 5) *K. chlorogenová*, 6) *Katechin*, 7) *K. vanilová*, 8) *K. kávová*, 9) *K. syringová*, 10) *Epikatechin*, 11) *Vanilin*, 12) *Konyferylalkohol*, 13) *K. kumarová*, 14) *K. ferulová*, 15) *Syrigol*

Graf 3: Chromatografická separace směšného standardu při 254 a 280 nm



1) *Protokatechuový aldehyd*, 2) *K. chlorogenová*, 3) *K. kávová*, 4) *Vanilin*, 5) *Konyferylalkohol* 6) *K. kumarová*, 7) *K. ferulová*

Graf 4: Chromatografická separace směšného standardu při 340 nm

4.6 Stanovení polyfenolů ve vzorcích octů

Kvalitativní analýza octů, později i kvantitativní analýza u vybraných analytů byla provedena na koloně Kinetex Polar C18, kde docházelo k nejlepšímu dělení v rámci testovaných kolon. Nejvhodnějším gradientem byl zvolen lineární gradient od 0 do 50 % ACN v MF s dobou gradientu 23 minut. Pro identifikaci vybraných polyfenolů v reálných vzorcích byly použity retenční časy standardů při vlnové délce 280 nm a také snímání jejich UV spekter a hmotnostních spekter v pozitivním a negativním módu. Konkrétní proměřená spektra

a retenční časy byly vloženy do metody. Poté do reálných vzorků stačilo promítnout dané standardy a jednoznačně určit, které analyty se ve vzorcích octů vyskytují. V tabulce 8 lze vidět zprůměrované retenční časy standardů ze třech měření, jejich molární hmotnosti a hodnoty molekulových iontů příslušných standardů.

Tabulka 8: Retenční časy a m/z nalezené v hmotnostních spektrech jednotlivých standardů

Označení analytu	Standard	$t_{R,g}$ [min]	M [g/mol]	m/z molekulového iontu	
				Pozitivní mód $[M + H]^+$	Negativní mód $[M - H]^-$
1	K. gallová	6,16	170,12	-	169,2
2	Furfural	7,90	96,08	-	95,0
3	K. protokatechuová	8,41	154,12	-	153,3
4	Protokatechuový aldehyd	9,99	138,12	-	137,4
5	K. chlorogenová	10,87	354,31	-	353,5
6	Katechin	11,05	290,26	-	289,6
7	K. vanilová	11,50	168,15	-	167,3
8	K. kávová	11,78	180,16	-	179,4
9	K. syringová	12,05	198,18	-	197,4
10	Epikatechin	12,26	290,27	-	289,5
11	Vanilin	13,24	152,15	-	151,4
12	Konyferylalkohol	13,29	180,07	-	179,2
13	K. kumarová	13,81	164,16	-	163,5
14	K. ferulová	14,51	194,18		193,4
15	Syringol	14,80	154,16	155,4	-

Nalezené polyfenolické látky jsou uvedeny v tabulce 9. V jablečném a balzamikovém octě byly nalezeny všechny analyty. V rýžovém octě nebyla nalezena kyselina kávová, syringová, ferulová, konyferylalkohol a syringol.

Tabulka 9: Přehled polyfenolických látek nalezených ve vzorcích octů

Označení analytu	Analyt	Japanese Rice Vinegar	Jablečný ocet kvasný	Aceto Balsamico di Modena IGP
1	K. gallová	✓	✓	✓
2	Furfural	✓	✓	✓
3	K. protokatechuová	✓	✓	✓
4	Protechuový aldehyd	✓	✓	✓
5	K. chlorogenová	✓	✓	✓
6	Katechin	✓	✓	✓
7	K. vanilová	✓	✓	✓
8	K. kávová	×	✓	✓
9	K. syringová	×	✓	✓
10	Epikatechin	✓	✓	✓
11	Vanilin	✓	✓	✓
12	Konyferylalkohol	×	✓	✓
13	K. kumarová	✓	✓	✓
14	K. ferulová	×	✓	✓
15	Syringol	×	✓	✓

✓ nalezeno

× nenalezeno

Pomocí hmotnostní detekce byly v rýžovém octě jednoznačně nalezeny kyselina protokatechuová, protokatechuový aldehyd a kyselina vanilová. Dále se shodovaly retenční časy standardů a UV spektra u kyseliny protokatechuové, kumarové, chlorogenové, gallové, vanilové, katechinu, epikatechinu, vanilinu, furfuralu a protokatechuového aldehydu. U jablečného octa se pomocí hmotností detekce identifikovala kyselina chlorogenová, kávová, gallová, protokatechuová, protokatechuový aldehyd, katechin a epikatechin. Dále byla u jablečného octa shoda retenčních časů a UV spekter se standardy u všech patnácti analytů. Posledním analyzovaným octem byl ocet Balsamico di Modena IGP, v kterém byla hmotnostní detekcí identifikována kyselina protokatechuová, gallová, kávová, syringová, protokatechuový aldehyd a konyferylalkohol. Shoda retenčních časů a UV spekter byla opět pro všechny analyty.

Ke kvantitativnímu stanovení byla vybrána kyselina protokatechuová (KP) a kávová (KK), které se vyskytovaly v minoritním měřítku a kyselina chlorogenová (KCH), která měla dominantní pík v jablečném octě. Byl připraven standardní roztok, z něhož byla poté připravena kalibrační řada roztoků 1, 10, 50, 100 a 200 mg/l. Analýza každého kalibračního roztoku byla provedena třikrát a z experimentálně naměřených ploch píků (příloha 7, tabulka 15) byla sestrojena kalibrační křivka pro každou kyselinu. Rovnice kalibračních závislostí, spolehlivosti a směrodatné odchylky směrnic a úseků jsou uvedeny v tabulce 10. Směrodatná odchylka úseku je statisticky nevýznamná a kalibrační křivku lze považovat za procházející nulou. Z rovnic kalibračních závislostí uvedených v tabulce 10 a experimentálně naměřených ploch daných kyselin v reálných vzorcích octů (tabulka 16, příloha 8), byly vypočteny koncentrace analytů. Všechny octy byly také analyzovány třikrát a koncentrace kyselin jsou uvedeny v tabulce 11. Pro porovnání byly odečteny plochy píků standardů měřených při DAD detekci (příloha 7, tabulka 15) a MS detekci. Pro kvantitativní stanovení byla zvolena DAD detekce, jelikož zjištěná spolehlivost pro všechny analyty dosahovala vždy minimálně 0,99. Pro odečtení ploch píků byl vždy volen záznam separace při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu stanovované látky. Pro kyselinu protokatechovou při vlnové délce 254 nm, pro kyselinu chlorogenovou při 330 nm a pro kyselinu kávovou při 320 nm. V případě MS detekce by bylo potřeba provést metodu vnitřního standardu, aby bylo možné analyty spolehlivě kvantifikovat. Kalibrační data pro MS detekci zde proto nejsou uvedena.

Tabulka 10: Kalibrační parametry fenolických kyselin

DAD Detekce				
Zkratka analytu	Rovnice kalibrační závislosti	Spolehlivost R ²	Směrodatná odchylka směrnice	Směrodatná odchylka úseku
KP	$y = 52,08x + 31,57$	0,9999	0,17	17,33
KCH	$y = 46,65x + 0,85$	0,9999	0,12	12,05
KK	$y = 77,52x - 149,29$	0,9989	0,70	71,53

Tabulka 11 znázorňuje obsah kyseliny protokatechuové (KP), chlorogenové (KCH) a kávové (KK) v reálných vzorcích octů.

Tabulka 11: Koncentrace polyfenolických kyselin ve vzorcích octů

Vzorek	Zkratka analytu	DAD detekce	
		Koncentrace [mg/l]	Směrodatná odchylka [mg/l]
Japanese Rice Vinegar	KP	0,013	0,006
	KCH	0,15	0,0006
	KK	-	-
Jablečný ocet kvasný	KP	1,59	0,004
	KCH	33,17	0,29
	KK	4,12	0,03
Aceto Balsamico di Modena IGP	KP	6,20	0,22
	KCH	0,63	0,11
	KK	4,19	0,07

Obsah kyseliny protokatechuové byl největší v octě Aceto Balsamico di Modena IGP 6,2 mg/l, méně u jablečného kvasného octa 1,59 mg/l a pouze 0,013 mg/l v Japanese Rice Vinegar. Koncentrace kyseliny chlorogenové byla největší v jablečném kvasném octě 33,17 mg/l. Oproti tomu, Aceto Balsamico di Modena IGP obsahoval pouze 0,63 mg/l a Japanese Rice Vinegar dokonce jen 0,15 mg/l. Kyselina kávová nebyla detekována v Japanese Rice Vinegar, avšak v jablečném kvasném octě byla nalezena koncentrace 4,12 mg/l a v Aceto Balsamico di Modena IGP 4,19 mg/l. Pro porovnání obsahů polyfenolických kyselin, byla použita databáze Phenolic explorer [99] a odborné články [29,100,101]. Dle databáze porovnávající různé octy, byl obsah kyseliny protokatechuové přibližně 8,1 mg/l a kyseliny kávové cca 2,8 mg/l. Ve studii [100] se obsah kyseliny kávové v jablečných octech pohyboval od 0,04 mg/l do 3,03 mg/l, obsah kyseliny chlorogenové od 0,83 mg/l do 26,42 mg/l. Ve studii [101] zabývající se tradičními rýžovými octy Zhenjiang, se koncentrace kyseliny kávové pohybovala od 1,61 mg do 7,37 mg/l a obsah kyseliny chlorogenové od 2,14 mg/l do 15,09 mg/l. Jedná se však o octy, které stárnou v sudech několik let. Studie [29] rozdělovala octy na běžné a balzamikové. V běžných octech byl obsah kyseliny protokatechuové přibližně 2 mg/l a kyseliny kávové okolo 2,44 mg/l. Octy balzamikového typu obsahovaly kyselinu

protokatechuovou o koncentraci 6,11 mg/l a kyselinu kávovou 3,14 mg/l. Variabilita ve výsledcích je způsobena tím, že pro polyfenolické kyseliny nejsou v octech žádné legislativní limity a jejich složení závisí na mnoha faktorech: na odrůdě hlavní suroviny, úpravě výchozí suroviny, technologickém způsobu výroby, zda ocet stárnul v dřevěných sudech, době stárnutí či z jakého konkrétního dřeva byly sudy zhotoveny.

5 ZÁVĚR

Při separacích byly vyzkoušeny tři kolony určené pro separace na reverzní fázi. Nejlepších výsledků dosahovaly kolony Kinetex C18 a Kinetex Polar C18. Obě kolony vykazovaly uspokojivé separace při použití gradientu od 5 do 50 % ACN v MF za dobu 23 min. Nejčastěji používanou kolonou v odborné literatuře je jednoznačně běžná C18. V této diplomové práci byla použita starší kolona C18, která vykazovala menší účinnost. Proto byla pro další analýzy vybrána účinnější kolona Polar C18, která navíc umožňuje pracovat s čistě vodnými fázemi. V případě potřeby lze také polární polyfenolické látky separovat v HILIC systému, který však v rámci této diplomové práce nebyl zkoumán. Nejvhodnější nalezené podmínky byly použity při analýze vybraných polyfenolických látek a ke kvantifikaci kyseliny protokatechuové, chlorogenové a kávové v reálných vzorcích rýžového, jablečného a balzamického octa. Nalezené výsledky jsou víceméně ve shodě s výsledky nalezenými v odborné literatuře.

6 LITERATURA

- [1] MAS, A., TRONCOSO, A.M., GARCÍA-PARRILLA M.C., TORIJA, M.J. Vinegar. *Encyclopedia of Food and Health*. 2016. 418-423. ISBN 9780123849533.
- [2] JOHNSON, C.S., GAAS, C.A. Vinegar: Medicinal Uses and Antiglycemic Effect. *MedGenMed*. 2006. 8(2):61.
- [3] ANTOL, M.N. *Ocet: jeho neuvěřitelná tajemství*. Hodkovičky. Pragma, 2010. ISBN 978-80-7349-219-9.
- [4] BEKATOROU, A. *Advances in vinegar production*. Boca Raton. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2020. ISBN 978-0-8153-6599-0.
- [5] VYHLÁŠKA Č. 248/2018 SB.: *Vyhláška o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí*. 2018.
- [6] ZHANG, X.L., ZHENG, Y., XIA M.L., WU, Y.N., LIU, X.J., XIE, S.K., WU, Y.F., WANG M. Knowledge Domain and Emerging Trends in Vinegar Research: A Bibliometric Review of the Literature from WoSCC. *Foods*. 2020. 9(2). ISSN 2304-8158.
- [7] *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Dostupné z: http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCEURO/cceuro22/CL00_18e.pdf
- [8] HO, C., LAZIM, A., FAZRY, S., ZAKI, U., LIM, S. Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. *Food Chemistry*. 2017. 221. 1621-1630. ISSN 0308-8146.
- [9] BUDAK, N., AYKIN, E., SEYDIM, A., GREENE, A., GUZEL-SEYDIM, Z. Functional Properties of Vinegar. *Journal of Food Science*. 2014. 79(5). 757-764. ISSN 00221147.
- [10] VELKÝ PŘEHLED DRUHŮ A JEJICH POUŽITÍ V KUCHYNI. *Jíme Jinak*. Dostupné z: <https://www.jimejinak.cz/velky-prehled-druhu-octu-a-jejich-pouziti-v-kuchyni-vite-kdy-ktery-pouzit/>
- [11] DUAN, W., XIA, T., ZHANG, B., LI, S., ZHANG, CH., ZHAO, CH., SONG, J., WANG, M. Changes of Physicochemical, Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity during the Brewing Process of Zhenjiang Aromatic Vinegar. *Molecules*. 2019. 24(21). ISSN 1420-3049.
- [12] MORGAN, J., MOSAWY, S. The Potential of Apple Cider Vinegar in the Management of Type 2 Diabetes. *International Journal of Diabetes Research*. 2016. 129-134. ISSN 2163-1646.

- [13] GRÉGROVÁ, A., ČÍŽKOVÁ, H., MAZÁČ, J., VOLDŘICH, M. Hodnocení autenticity kvasného lihového octa (část I): Způsoby výroby a metody analýzy. *Kvasný průmysl*. 2012. 58(10). ISSN 2571-3868.
- [14] KADLEC, P., MELZOCH K., VOLDŘICH, M. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava. Key Publishing. 2012. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [15] XIA, T., ZHANG, B., DUAN, W., ZHANG, J., WANG, M. Nutrients and bioactive components from vinegar: A fermented and functional food. *Journal of Functional Foods*. 2020. 64. 1-12. ISSN 17564646.
- [16] VALERO, E., BERLANGA, T.M., ROLDÁN, P.M., JIMÉNEZ, C., GARCÍA, I., MAURICIO, J.C. Free amino acids and volatile compounds in vinegars obtained from different types of substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005. 85(4). 603-608. ISSN 00225142.
- [17] QI, W., WANG, C., CAO, X., ZHAO, G., WANG, CH., HOU, L. Flavour Analysis of Chinese Cereal Vinegar. *IERI Procedia Journal*. 2013. 5. 332-338. ISSN 22126678.
- [18] LIU, Q., TANG, G.Y., ZHAO, C.N., GAN, R.Y., LI, H.B. Antioxidant Activities, Phenolic Profiles, and Organic Acid Contents of Fruit Vinegars. *Antioxidants*. 2019. 8(4). ISSN 2076-3921.
- [19] CHEN, H., CHEN, T., GIUDICI, P., CHEN, F. Vinegar Functions on Health: Constituents, Sources, and Formation Mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016. 15(6). 1124-1138. ISSN 15414337.
- [20] VINEGAR. *Harvard T.H. CHAN*. 2019. <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/food-features/vinegar/>
- [21] VERZELLONI, E., TAGLIAZUCCHI, D., CONTE, A. From balsamic to healthy: Traditional balsamic vinegar melanoidins inhibit lipid peroxidation during simulated gastric digestion of meat. *Food and Chemical Toxicology*. 2010. 48(8-9). 2097-2102. ISSN 02786915.
- [22] LIU, J., GAN, J., NIRASAWA, S., ZHOU, Y., XU, J., ZHU, S., CHENG, Y. Cellular uptake and trans-enterocyte transport of phenolics bound to vinegar melanoidins. *Journal of Functional Foods*. 2017. 37. 632-640. ISSN 17564646.
- [23] WANG, Z., ZHANG, Z., LI, S., ZHANG, X., XIA, M., XIA, T., WANG, M. Formation mechanisms and characterisation of the typical polymers in melanoidins from vinegar, coffee and model experiments. *Food Chemistry*. 2021. 355. ISSN 03088146.
- [24] PANEQUE, P., MORALES, M.L., BURGOS, P., PONCE, L., CALLEJÓN, R.M. Elemental characterisation of Andalusian wine vinegars with protected designation of origin by ICP-OES and chemometric approach. *Food Control*. 2017. 75. 203-210. ISSN 09567135.

- [25] MARENGO, E., ACETO, M. Statistical investigation of the differences in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines. *Food Chemistry*. 2003. 81(4). 621-630. ISSN 03088146.
- [26] HOPFER, H., NELSON, J., COLLINS, T.S., HEYMANN, H., EBELER, S.E. The combined impact of vineyard origin and processing winery on the elemental profile of red wines. *Food Chemistry*. 2015. 172. 486-496. ISSN 03088146.
- [27] YANG, B., DONG, Y., WANG, F., ZHANG, Y. Nanoformulations to Enhance the Bioavailability and Physiological Functions of Polyphenols. *Molecules*. 2020. 25(20). ISSN 1420-3049.
- [28] ALTEMIMI, A., LAKHSSASSI, N., BAHARLOUEI, A., WATSON, D., LIGHTFOOT, D. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*. 2017. 6(4). ISSN 2223-7747.
- [29] BARNABA, C., DELLACASSA, E., NICOLINI, G., NARDIN, T., MALACARNE, M., LARCHER, R. Identification and quantification of 56 targeted phenols in wines, spirits, and vinegars by online solid-phase extraction – ultrahigh-performance liquid chromatography – quadrupole-orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2015. 1423. 124-135. ISSN 00219673.
- [30] OPLETAL, L. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Praha. Karolinum. 2016. ISBN 978-80-246-2084-8.
- [31] KUMAR, N., GOEL, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*. 2019. 24. ISSN 2215017X.
- [32] ORSAVOVÁ, J. *Bioaktivní látky u netradičních surovin rostlinného původu*. Zlín. 2019. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce Doc. Ing. Jiří Mlček, Ph.D.
- [33] KHODDAMI, A., WILKES, M., ROBERTS, T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*. 2013. 18(2). 2328-2375. ISSN 1420-3049.
- [34] TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010. 2(12). 1231-1246. ISSN 2072-6643.
- [35] FLAVONOIDY. *Bezpečnost potravin*. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92217.aspx>
- [36] ŘÍHOVÁ, H. *Flavonoidy: Stručný přehled a biologický význam*. Praha. 2008. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Prof. RNDr. Eva Kvasničková.
- [37] SHAHIDI, F. *Handbook of Antioxidants for Food Preservation 1st Edition*. Woodhead Publishing. ISBN 9781782420972.

- [38] DURÁN-GUERRERO, E., SCHWARZ, M., FERNÁNDEZ-RECAMALES, M.A., BARROSO, C.G., CASTRO, R. Characterization and Differentiation of Spanish Vinegars from Jerez and Condado de Huelva Protected Designations of Origin. *Foods*. 2019. 8(8). ISSN 2304-8158.
- [39] MATLOOB, M.H., AL-HUSSEIN BALAKIT, A.A.A. Phenolic content of various date palms fruits and vinegars from Iraq. *Int. J. Chem. Sci.* 2016. 14(4). ISSN 0972-768X.
- [40] KAWA-RYGIELSKA, J., ADAMENKO, K., KUCHARSKA, A., PIÓRECKI, N. Bioactive Compounds in Cornelian Cherry Vinegars. *Molecules*. 2018, 23(2). ISSN 1420-3049.
- [41] PONTIS, J.A., COSTA L.A., SILVA, S.J.R., Adriana FLACH, A. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. *Food Science and Technology*. 2014. 34(1). 69-73. ISSN 1678-457X.
- [42] ANDLAUER, W., STUMPF, C., FÜRST, P. Influence of the Acetification Process on Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. 48(8). 3533-3536. ISSN 0021-8561.
- [43] BAKIR, S., TOYDEMIR, G., BOYACIOGLU, D., BEEKWILDER, J., CAPANOGLU, E. Fruit Antioxidants during Vinegar Processing: Changes in Content and in Vitro Bio-Accessibility. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. 17(10). ISSN 1422-0067.
- [44] STEIDL, R. *Sklepní hospodářství*. Valtice. Národní vinařské centrum. 2010. ISBN 978-80-903201-9-2.
- [45] GARCÍA-PARRILLA, M.C., CEREZO, A.B., TEFAYE, W., TRONCOSO, A.M. Phenolic Compounds as Markers for the Authentication of Sherry Vinegars: A Foresight for High Quality Vinegars Characterization. *Progress in Authentication of Food and Wine*. 2011. 201-213. ISBN 9780841226708.
- [46] TEFAYE, W., MORALES, M.L., GARCÍA-PARRILLA, M.C., TRONCOSO, A.M. Evolution of Phenolic Compounds during an Experimental Aging in Wood of Sherry Vinegar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. 50(24). 7053-7061. ISSN 0021-8561.
- [47] MURRAY, R.K. *Harperova ilustrovaná biochemie*. Praha. Galén. 2012. ISBN 978-80-7262-907-7.
- [48] MINDELL, E., MUNDIS, H. *Nová vitaminová bible: vitaminy, minerální látky, antioxidanty, léčivé rostliny, doplňky stravy, léčebné účinky potravin i léky používané v homeopatii*. Praha. Ikar. 2010. ISBN 978-80-249-1419-0.
- [49] CHEN, H., CHEN, T., GIUDICI, P., CHEN, F. Vinegar Functions on Health: Constituents, Sources, and Formation Mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2016. 15(6). 1124-1138. ISSN 15414337.

- [50] CRUZ, M., CORREIA, A. C., GONCALVES, F. J., JORDAO, A. M. Phenolic composition and total antioxidant capacity analysis of red wine vinegars commercialized in Portuguese market. *Ciência e Técnica Vitivinícola*. 2018. 33(2). 102-115. ISSN 2416-3953.
- [51] PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E. Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické Listy*. 2004. 98. 174-179. ISSN 1213-7103.
- [52] AJILA, C.M., BRAR, S.K., VERMA, M., TYAGI, R.D., GODBOUT, S., VALÉRO, J.R. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010, 31(3), 227-249. ISSN 0738-8551.
- [53] DVOŘÁKOVÁ, M., DOSTÁLEK, P., HULÍN, P. Analytické metody stanovení polyfenolů ve sladinách, mladínách a pivech. *Kvasný průmysl*. 2006. 52(4). 111-114. ISSN 2571-3868.
- [54] VERZELLONI, E., TAGLIAZUCCHI, D., CONTE, A. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry*. 2007. 105(2). 564-571. ISSN 03088146.
- [55] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava. Pavel Klouda. 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- [56] MINHO, L.A.C., BRANDAO, G.C., ANDRADE SANTANA D.D., SANTOS, O.S., ANDRADE, H. M.C., DOS SANTOS, W.N.L. Cellulose-coated CoFe₂O₄ nanoparticles as an adsorbent for extraction and preconcentration of bioactive compounds in vinegars. *Microchemical Journal*. 2019. 147. 102-111. ISSN 0026265X.
- [57] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Hradec Králové. Lucie Nováková. 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [58] DONG, M.W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Hoboken. John Wiley & Sons. 2006. ISBN 9780471973102.
- [59] JANDERA, P. Hilic chromatografie: Perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *CHEMAGAZÍN*. 2011. 2. ISSN 1210-7409.
- [60] TEORIE AUTOSAMPLERU. *Hplc*. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Teorie/autosamplers.html>
- [61] AUTOSAMPLER. *Meadowshplc*. Dostupné z: https://www.meadowshplc.com/sites/default/files/products/attachments/1100_reference_manual.pdf

- [62] REVERSED PHASE HPLC COLUMNS. *ThermoFisherSCIENTIFIC* Dostupné z: https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/chromatography/liquid-chromatography-lc/hplc-uhplc-columns/reversed-phase-hplc-columns.html?ce=E.21CMD.DL104.40884.01&cid=E.21CMD.DL104.40884.01&ef_id=EAIAIQobChMIz--R7qnY8QIVAbp3Ch0SiQDUEAAYASAAEgJ_MfD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!383095229511!e!!g!!reversed%20phase%20hplc%20columns&gclid=EAIAIQobChMIz--R7qnY8QIVAbp3Ch0SiQDUEAAYASAAEgJ_MfD_BwE
- [63] NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Hradec Králové. Lucie Nováková. 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [64] KOHLER, J. J., PATRIE, M. *Mass Spectrometry of Glycoproteins*. Totowa. Humana Press. 2013. 131-144 *Methods in Molecular Biology*. ISBN 978-1-62703-145-5.
- [65] JANDERA, Pavel. *Advances in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. Handbook of Advanced Chromatography /mass Spectrometry Techniques*. Elsevier. 2017. 39-87. ISBN 9780128117323.
- [66] VACEK, J., ONOFREJOVÁ, L., KLEJDUS, B., KUBÁŇ, V. Využití kapalinové chromatografie založené na hydrofilních interakcích pro separace polárních látek. *Chemické Listy*. 103. 381–385. 2009. ISSN 1213-7103.
- [67] GRECO, G., LETZEL, T. Main Interactions and Influences of the Chromatographic Parameters in HILIC Separations. *Journal of Chromatographic Science*. 2013. 51(7). 684-693. ISSN 0021-9665.
- [68] DETEKCE VE VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFII. *web.natur.cuni*. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>
- [69] DETEKTORY HPLC. *Web.vscht*. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/>
- [70] IMPROVED LINEARITY AND QUANTIFICATION USING THE SPD-M40 PHOTODIODE ARRAY DETECTOR. *Lcms*. Dostupné z: https://lcms.cz/labrulez-bucket-strap-h3hsga3/jpl219012_64e706f6c4/jpl219012.pdf
- [71] ULTRAVIOLET DETECTORS: PERSPECTIVES, PRINCIPLES, AND PRACTICES. *LC GC*. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/ultraviolet-detectors-perspectives-principles-and-practices>
- [72] JANDERA, P. *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů*. Pardubice. Univerzita Pardubice. 2011. ISBN 978-80-7395-392-8.
- [73] NORKOVÁ, R., JAKLOVÁ-DYTRTOVÁ, J., KAŠIČKA, V. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektromigračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chemické Listy*. 2013.107. 949–955. ISSN 1213-7103.
- [74] SPOJENÍ MS SEPARACE. *Holcapek.upce*. Dostupné z: https://holcapek.upce.cz/teaching/09_Spojneni_MS_separace.pdf

- [75] OZTURK, I., CALISKAN, O., TORNUK, F., OZCAN, N., YALCIN, H., BASLAR, M., SAGDIC, O. Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *LWT-Food Science and Technology*. 2015. 63(1). 144-151. ISSN 00236438.
- [76] BAKIR, S., TOYDEMIR, G., BOYACIOGLU, D., BEEKWILDER, L., CAPANOGLU, E. Fruit Antioxidants during Vinegar Processing: Changes in Content and in Vitro Bio-Accessibility. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. 17(10). ISSN 1422-0067.
- [77] KELEBEK, H., KADIROGLU, P., DEMIRCAN, N.B., SELLI, S. Screening of bioactive components in grape and apple vinegars: Antioxidant and antimicrobial potential. *Journal of the Institute of Brewing*. 2017. 123(3). 407-416. ISSN 00469750.
- [78] CHATATIKUN, M., KWANHIAN, W. Phenolic Profile of Nipa Palm Vinegar and Evaluation of Its Antilipidemic Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2020. 1-8. ISSN 1741-427X.
- [79] KELEBEK, H. LC-DAD–ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Turkish black tea: Effect of infusion time and temperature. *Food Chemistry*. 2016. 204. 227-238. ISSN 03088146.
- [80] GARCÍA-PARRILLA, M.C., CAMACHO, M.L., HEREDIA, F.J., TRONCOSO, A.M. Separation and identification of phenolic acids in wine vinegars by HPLC. *Food Chemistry*. 1994. 50(3). 313-315. ISSN 03088146.
- [81] VRANÁ, D. *Optimalizace HPLC/MS/MS metody pro analýzu fenolických látek obsažených v amarantovém zrně*. Pardubice. 2020. Diplomová práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce doc. Ing. Lenka Česlová PhD.
- [82] GUILLÉN, D.A., MERELLO, F., BARROSO, C.G., PÉREZ-BUSTAMANTE, J.A. Solid-Phase Extraction for Sample Preparation, in the HPLC Analysis of Polyphenolic Compounds in “Fino” Sherry Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997. 45(2). 403-406. ISSN 0021-8561.
- [83] DAI, J., MUMPER, R., J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*. 2010, 15(10). 7313-7352. ISSN 1420-3049.
- [84] RAJBHAR, K., DAWDA, H., MUKUNDAN, U. Polyphenols: Method of extraction. *Scientific reviews Chemical communications*. Indie. 2015. 5(1). 1-6. ISSN 2277-2669
- [85] LANCELLOTTI, L., ULRICI, A., SIGHINOLFI S., a MARCHETTI, A. Chemical Characterization Of Commercial Balsamic Vinegar Glaze. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2020. 94. ISSN 08891575.
- [86] CEREZO, A.B., WENDU TESFAYE, TORIJA, M.J., MATEO, E., GARCÍA-PARRILLA, M.C., TRONCOSO, A.M. The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods. *Food Chemistry*. 2008. 109(3). 606-615. ISSN 03088146.

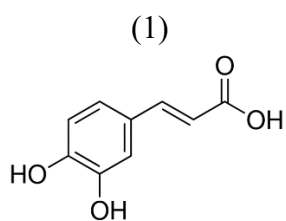
- [87] SAMANIDOU, V. F., ANTONIOU, C.V., PAPADOYANNIS, I.N. Gradient RP-HPLC determination of free phenolic acids in wines and wine vinegar samples after SPE, with photodiode array identification. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2007. 24(14). 2161-2176. ISSN 1082-6076.
- [88] KALEMBA-DROZDZ, M., KWIECIEN, I., SZEWCZYK, A., CIERNIAK, A., GRZYWACZ-KISIELEWSKA, A. Fermented Vinegars from Apple Peels, Raspberries, Rosehips, Lavender, Mint, and Rose Petals: The Composition, Antioxidant Power, and Genoprotective Abilities in Comparison to Acetic Macerates, Decoctions, and Tinctures. *Antioxidants*. 2020. 9(11). ISSN 2076-3921.
- [89] MARRUBINI, G., APPELBLAD, P., MAIETTA, M., PAPETTI, A. Hydrophilic interaction chromatography in food matrices analysis: An updated review. *Food Chemistry*. 2018. 257. 53-66. ISSN 03088146.
- [90] YANG, W., LAAKSONEN O., KALLIO, H., YANG, B. Effects of latitude and weather conditions on proanthocyanidins in berries of Finnish wild and cultivated sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*). *Food Chemistry*. 2017. 216. 87-96. ISSN 03088146.
- [91] WILLEMSE, CH.M., STANDER, M.A., VILLIERS, A. Hydrophilic interaction chromatographic analysis of anthocyanins. *Journal of Chromatography A*. 2013. 1319. 127-140. ISSN 00219673.
- [92] SENTKOWSKA, A., BIESAGA, M., PYRZYNSKA, K. Effects of the operation parameters on HILIC separation of flavonoids on zwitterionic column. *Talanta*. 2013. 115. 284-290. ISSN 00399140.
- [93] ZOU, B., XIAO, G., XU, Y., WU, J., YU, Y., FU, M. Persimmon vinegar polyphenols protect against hydrogen peroxide-induced cellular oxidative stress via Nrf2 signalling pathway. *Food Chemistry*. 2018. 255. 23-30. ISSN 03088146.
- [94] IMPROVING-HPLC-SEPARATION-POLYPHENOLS. *Chromatography online*. Dostupné z: <https://www.chromatographyonline.com/view/improving-hplc-separation-polyphenols-0>
- [95] ČESLA, P., HÁJEK, T., JANDERA, P. Optimization of two-dimensional gradient liquid chromatography separations. *Journal of Chromatography A*. 2009. 1216(16). 3443-3457. ISSN 00219673.
- [96] CHEN, G.L., ZHENG, F.J., LIN, B. Phenolic and Volatile Compounds in the Production of Sugarcane Vinegar. *ACS Omega*. 2020. 5(47). 30587-30595. ISSN 2470-1343.
- [97] ACQUITY UPLC BEH C18. *WATERS*. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186002350-acquity-uplc-beh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html>.

- [98] PLESSI, M., BERTELLI, D., MIGLIETTA, F. Extraction and identification by GC-MS of phenolic acids in traditional balsamic vinegar from Modena. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006. 19(1). 49-54. ISSN 08891575.
- [99] FOODS. *Phenol-Explorer*. Dostupné z: <http://phenol-explorer.eu/foods>
- [100] DU, G., ZHU, Y., WANG, X., ZHANG, J., TIAN, CH., LIU, L., MENG, Y., GUO, Y. Phenolic composition of apple products and by-products based on cold pressing technology. *Journal of Food Science and Technology*. 2019. 56(3). 1389-1397. ISSN 0022-1155.
- [101] ZHAO, Chaoya, Ting XIA, Peng DU et al. Chemical Composition and Antioxidant Characteristic of Traditional and Industrial Zhenjiang Aromatic Vinegars during the Aging Process. *Molecules*. 2018. 23(11). ISSN 1420-3049.

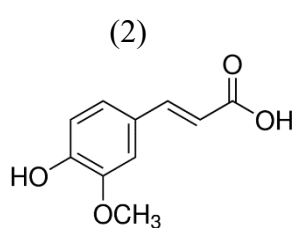
7 PŘÍLOHY

Příloha 1: Chemické struktury fenolických kyselin	70
Příloha 2: Chemické struktury dalších analyzovaných látek	71
Příloha 3: UV-VIS spektra analyzovaných látek	72
Příloha 4: Retenční data polyfenolů při třech profilech gradientů u příslušných kolon	77
Příloha 5: Chromatografická separace polyfenolů na koloně Kinetex C18 při třech profilech gradientů	80
Příloha 6: Chromatografická separace polyfenolů na koloně Kinetex Polar C18 při třech profilech gradientů	82
Příloha 7: Experimentálně naměřené plochy píků kalibračních roztoků kyseliny protokatechuové, kyseliny chlorogenové a kyseliny kávové	84
Příloha 8: Experimentálně naměřené plochy píků kyseliny protokatechuové, kyseliny chlorogenové a kyseliny kávové ve vzorcích octů.....	85
Příloha 9: Chromatogram rýžového octa.....	86
Příloha 10: Chromatogram jablečného octa	87
Příloha 11: Chromatogram balzamikového octa.....	88

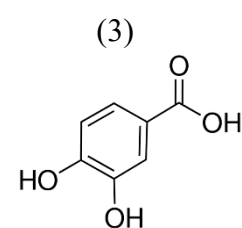
Příloha 1: Chemické struktury fenolických kyselin



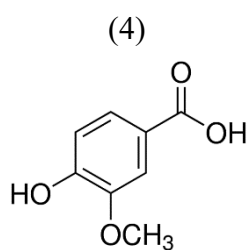
(1) Kyselina kávová



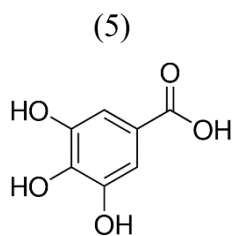
(2) Kyselina ferulová



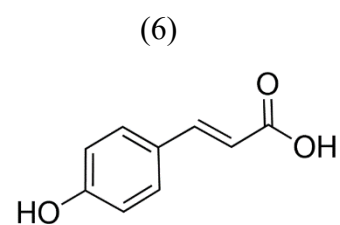
(3) Kyselina protokatechuová



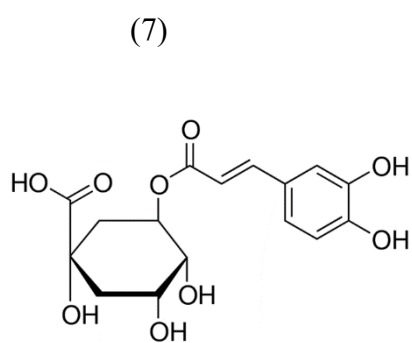
(4) Kyselina vanilová



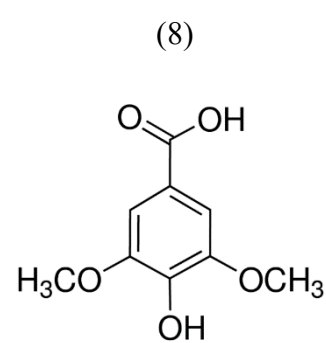
(5) Kyselina gallová



(6) Kyselina kumarová



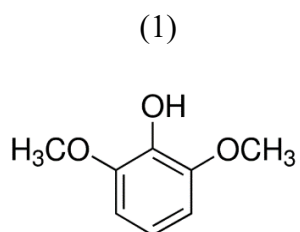
(7) Kyselina chlorogenová



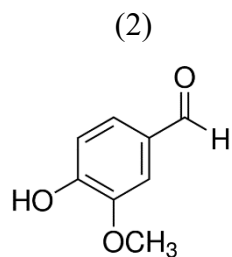
(8) Kyselina syringová

Obrázek 10: Chemické struktury fenolických kyselin

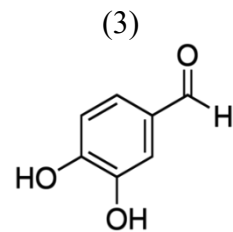
Příloha 2: Chemické struktury dalších analyzovaných látek



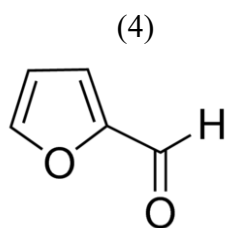
(1) Syringol



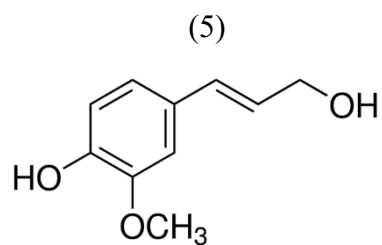
(2) Vanilin



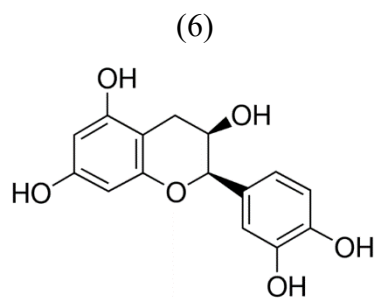
(3) Protokatechuový aldehyd



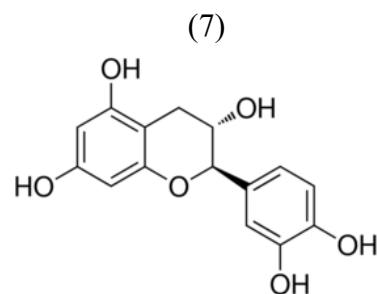
(4) Furfural



(5) Konyferylalkohol



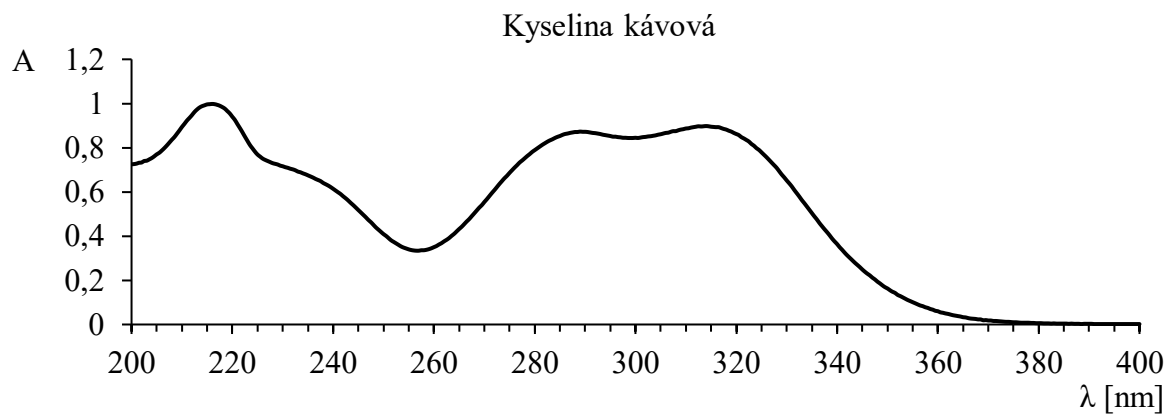
(6) (-)-Epikatechin



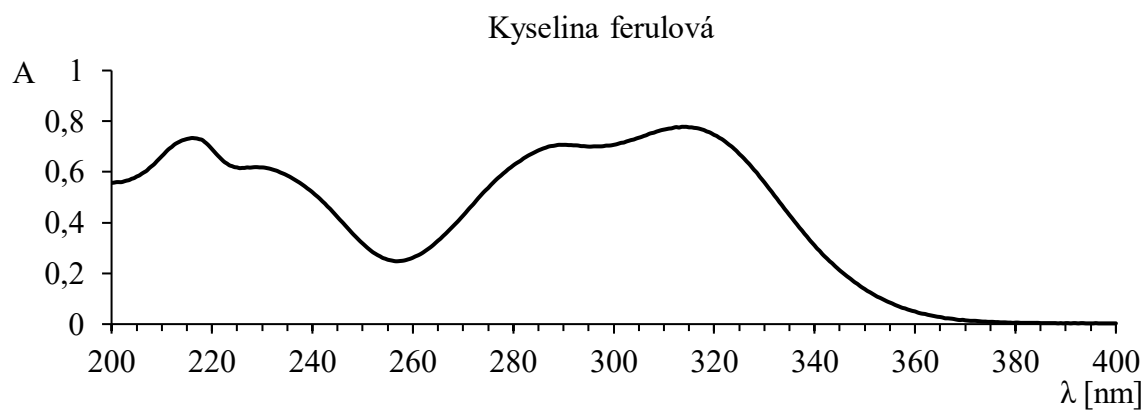
(7) (+)-Katechin

Obrázek 11: Chemické struktury dalších analyzovaných látek

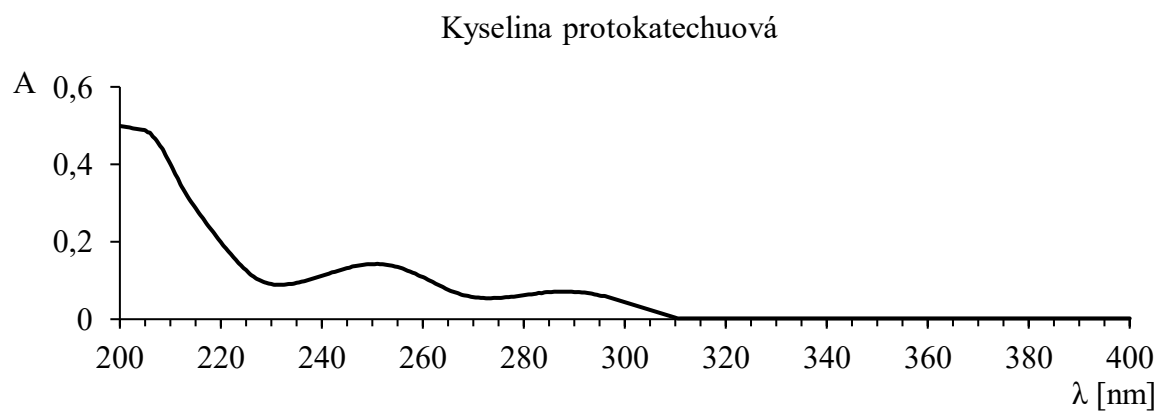
Příloha 3: UV-VIS spektra analyzovaných látek



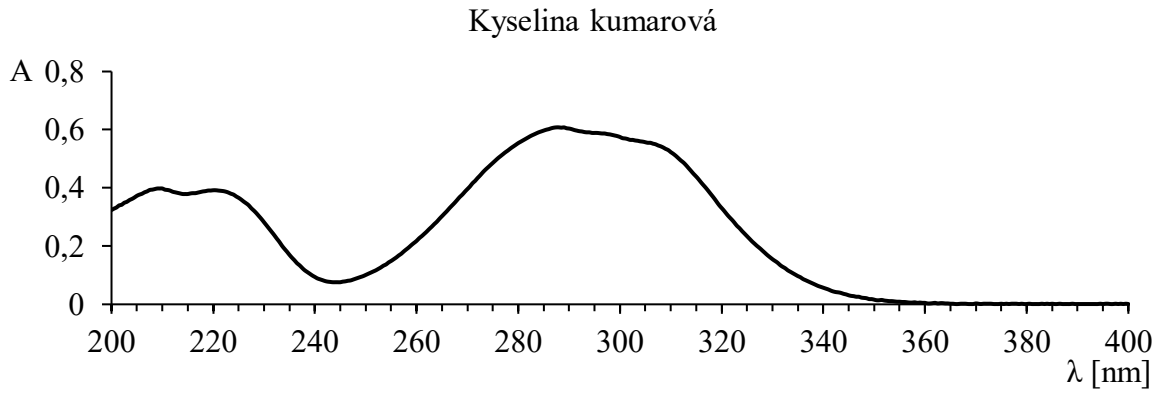
Graf 5: UV-VIS spektrum kyseliny kávové



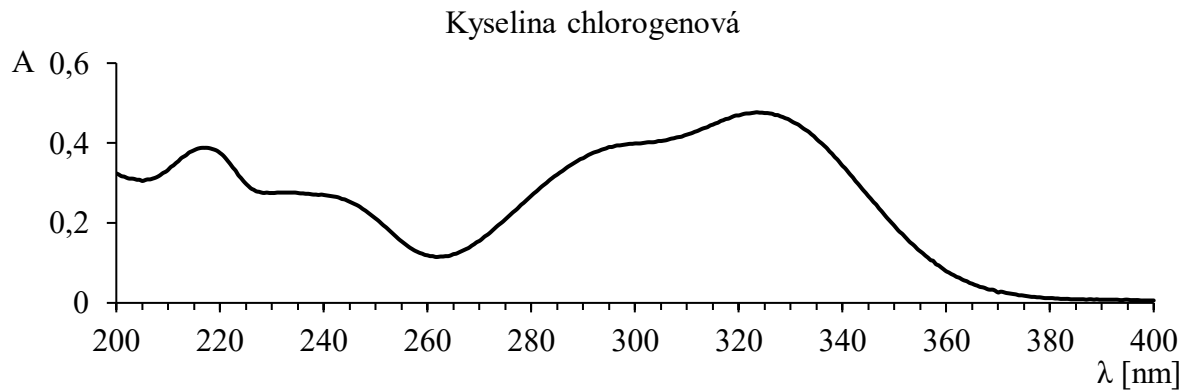
Graf 6: UV-VIS spektrum kyseliny ferulové



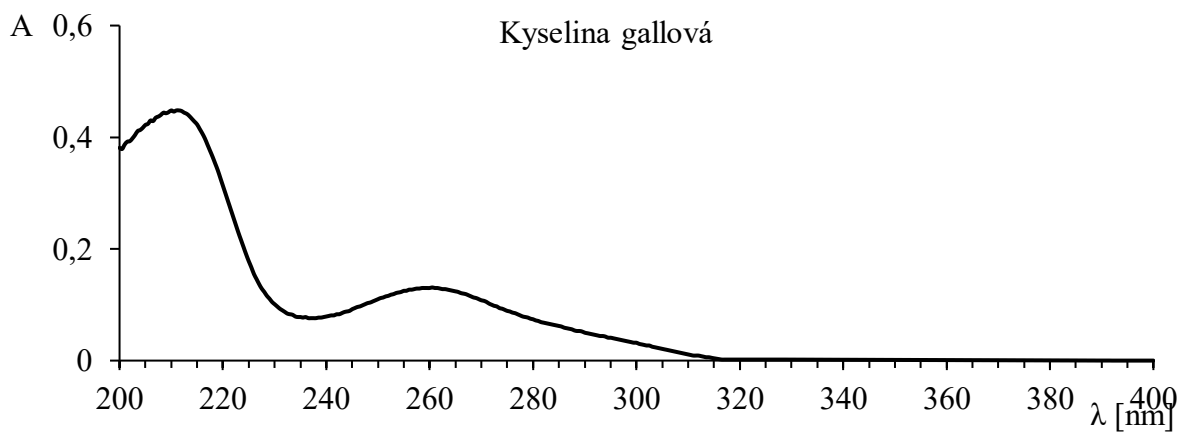
Graf 7: UV-VIS spektrum kyseliny protokatechuové



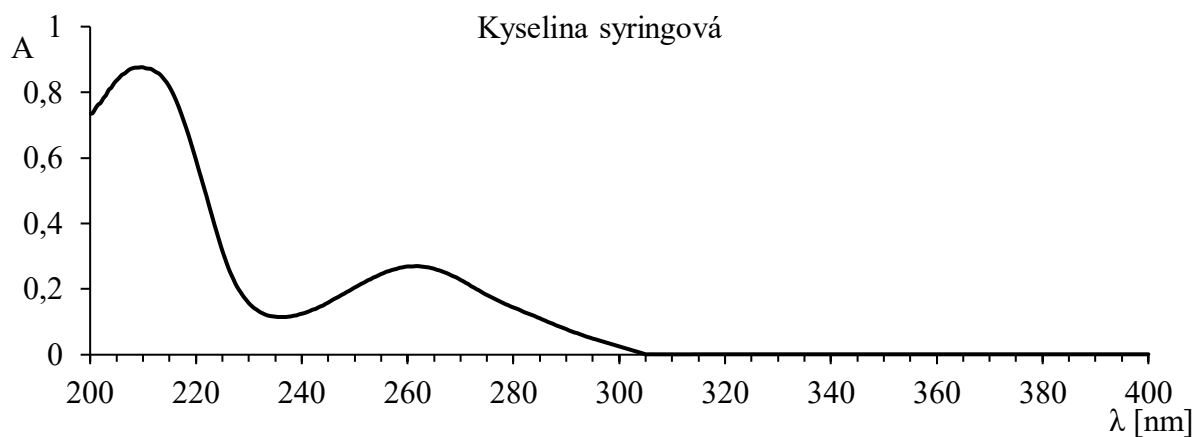
Graf 8: UV-VIS spektrum kyseliny kumarové



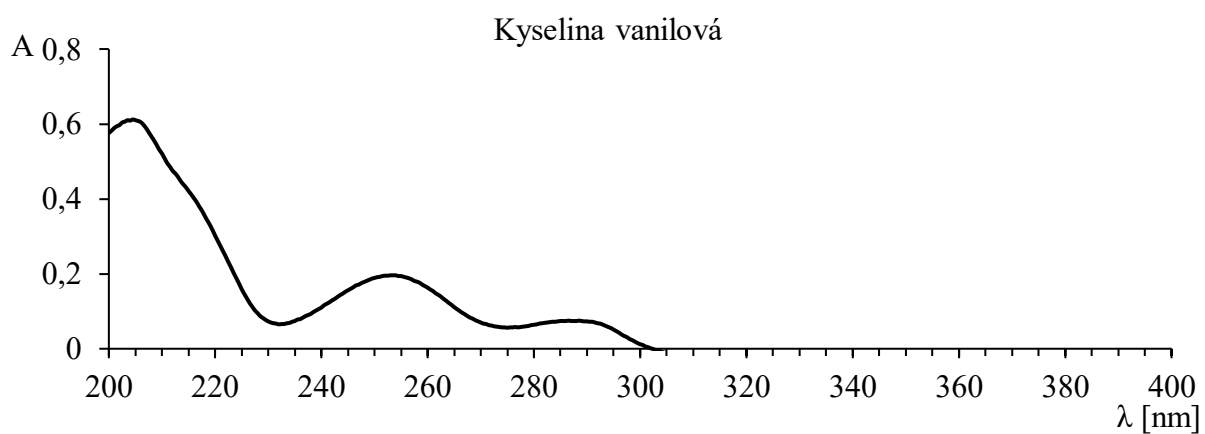
Graf 9: UV-VIS spektrum kyseliny chlorogenové



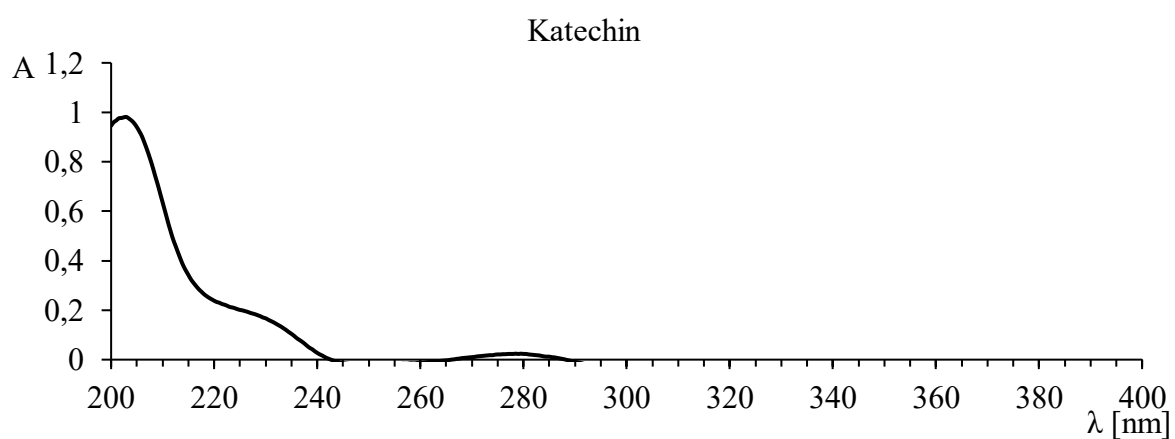
Graf 10: UV-VIS spektrum kyseliny gallové



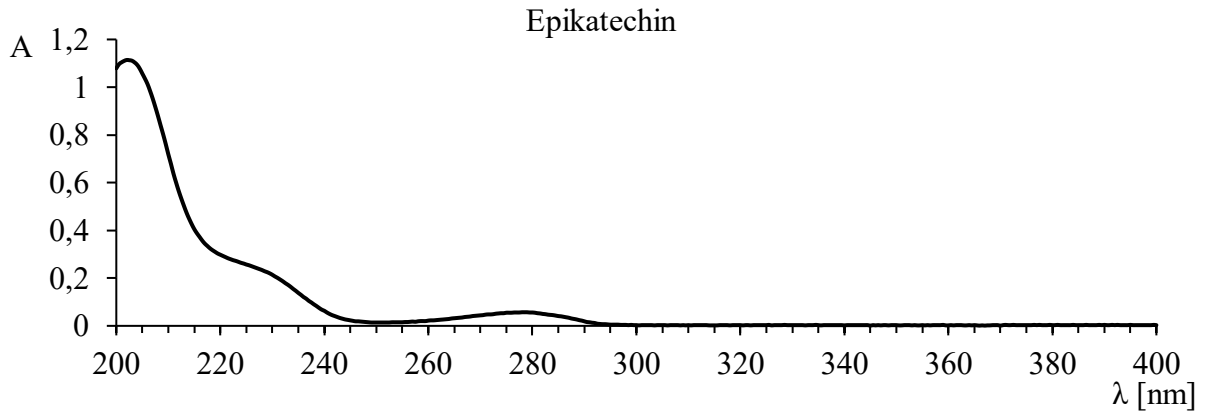
Graf 11: UV-VIS spektrum kyseliny syringové



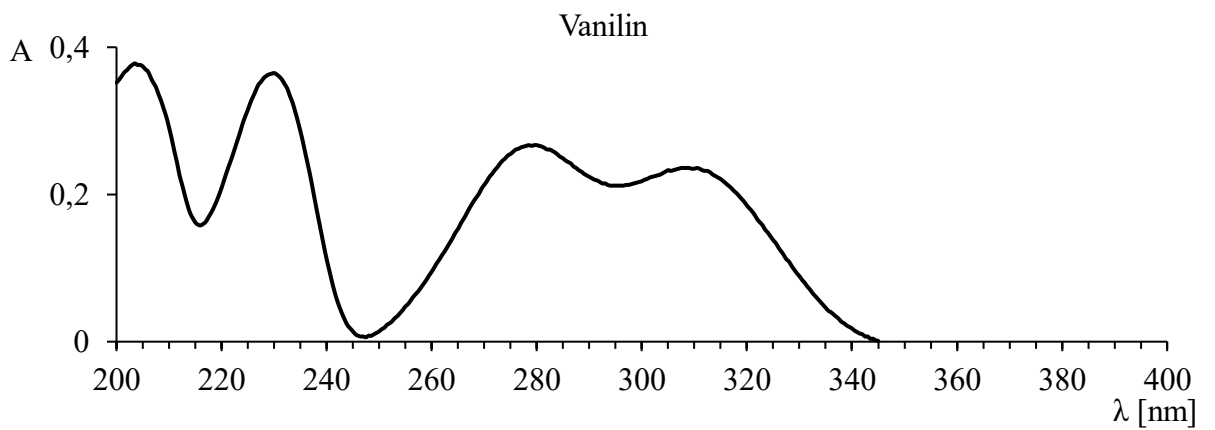
Graf 12: UV-VIS spektrum kyseliny vanilové



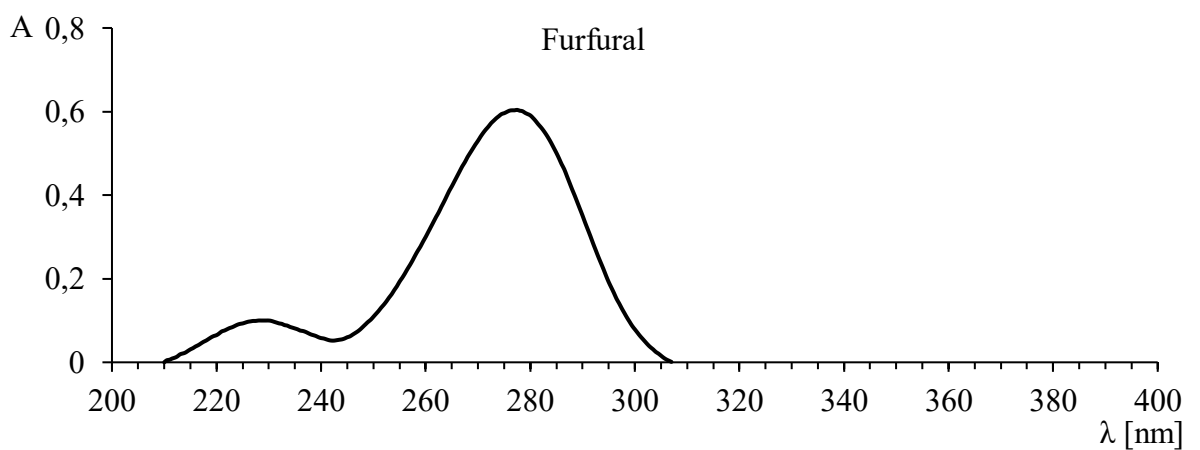
Graf 13: UV-VIS spektrum katechinu



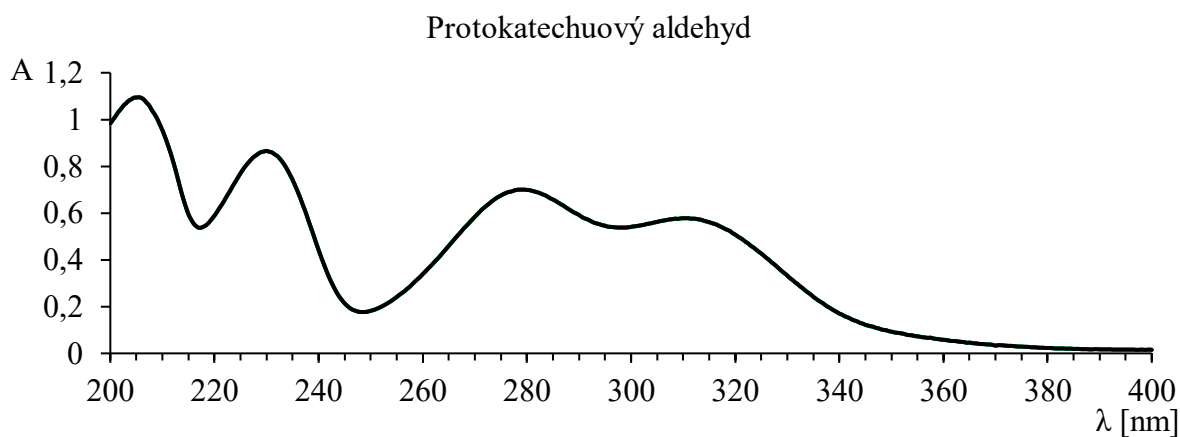
Graf 14: UV-VIS spektrum epikatechinu



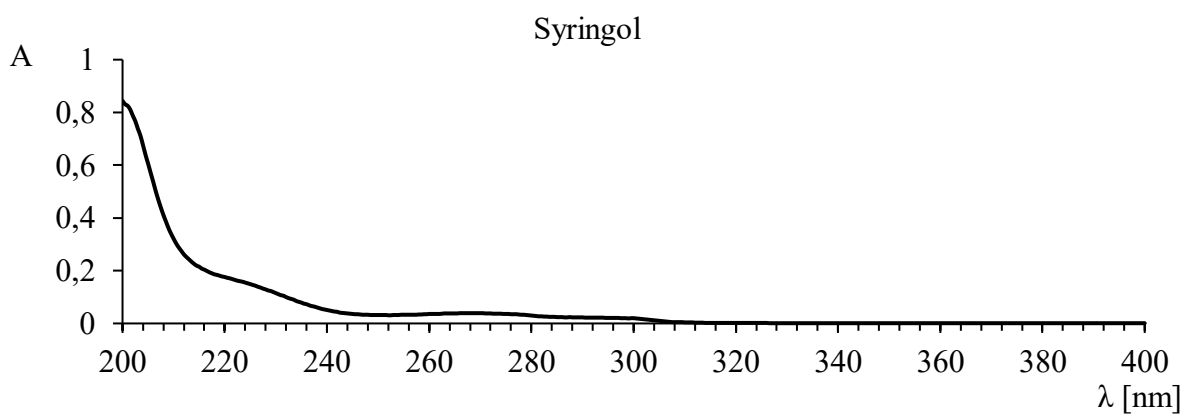
Graf 15: UV-VIS spektrum vanilinu



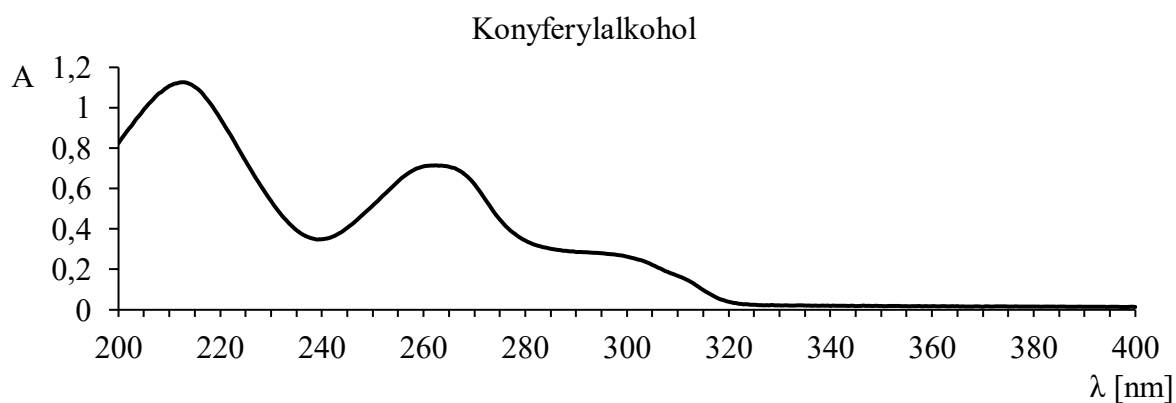
Graf 16: UV-VIS spektrum furfuralu



Graf 17: UV-VIS spektrum protokatechuového aldehydu



Graf 18: UV-VIS spektrum syringolu



Graf 19: UV-VIS spektrum konyferylalkoholu

Příloha 4: Retenční data polyfenolů při třech profilech gradientů u příslušných kolon

Tabulka 12: Retenční data standardů měřených na koloně Infinity Poroshell

Infinity Poroshell 120 SB-C18									
Standard	Gradient 1			Gradient 2			Gradient 3		
	t _{R,g} [min]	k'	φ _e [%]	t _{R,g} [min]	k'	φ _e [%]	t _{R,g} [min]	k'	φ _e [%]
Thiomočovina	1,56	-	-	1,54	-	-	1,53	-	-
Furfural	4,07	1,61	0,10	4,30	1,79	0,09	4,75	2,10	0,09
Kys. protokatechuová	4,54	1,91	0,12	4,49	1,92	0,09	5,03	2,29	0,09
Protokate. aldehyd	4,91	2,15	0,13	-	-	-	-	-	-
Kys. chlorogenová	4,98	2,19	0,14	-	-	-	7,11	3,65	0,13
Katechin	5,05	2,24	0,14	5,57	2,62	0,13	6,50	3,25	0,12
Kys. vanilová	5,63	2,61	0,16	6,34	3,12	0,15	10,22	5,68	0,19
Kys. kávová	5,63	2,61	0,16	6,49	3,21	0,15	8,18	4,35	0,15
Epikatechin	5,60	2,59	0,16	-	-	-	8,81	4,76	0,17
Kys. syringová	5,74	2,68	0,17	6,57	3,27	0,15	8,44	4,52	0,16
Vanilin	5,77	2,70	0,17	9,42	5,12	0,23	12,69	7,29	0,24
Konyferylalkohol	5,63	2,61	0,16	6,35	3,12	0,15	7,90	4,16	0,15
Kys. kumarová	6,60	3,23	0,20	7,70	4,00	0,19	10,24	5,69	0,19
Kys. ferulová	6,85	3,39	0,21	8,04	4,22	0,20	10,76	6,03	0,20
Syringol	7,23	3,63	0,23	8,62	4,60	0,21	11,8	6,71	0,22

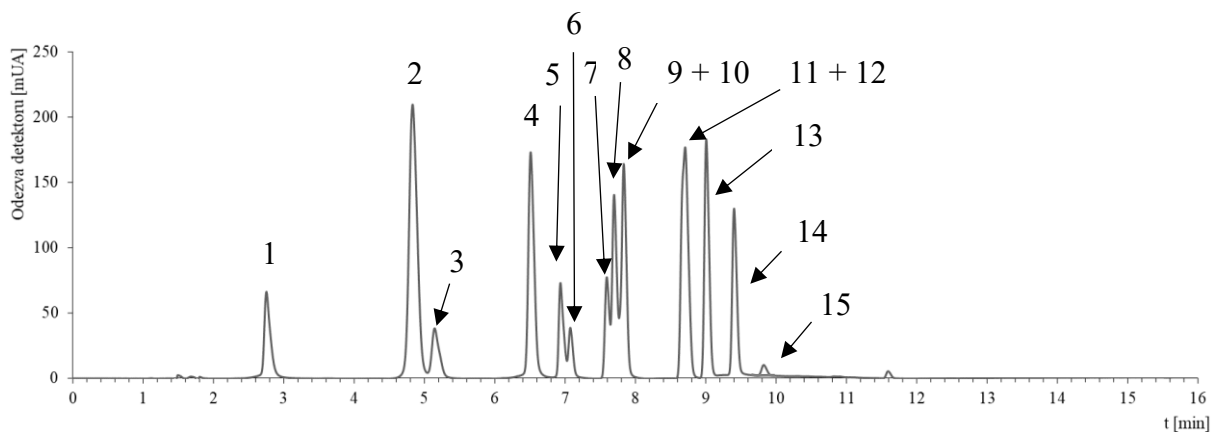
Tabulka 13: Retenční data standardů měřených na koloně Kinetex C18

Kinetex C18									
Standard	Gradient 1			Gradient 2			Gradient 3		
	t _{R,g} [min]	k'	φ _e [%]	t _{R,g} [min]	k'	φ _e [%]	t _{R,g} [min]	k'	φ _e [%]
Thiomočovina	1,43	-	-	1,44	-	-	1,45	-	-
Kys. gallová	2,79	0,96	0,05	2,76	0,92	0,05	2,79	0,92	0,05
Furfural	4,83	2,38	0,13	4,85	2,38	0,11	4,87	2,35	0,09
Kys. protokatechuová	5,19	2,64	0,14	5,18	2,61	0,11	5,25	2,62	0,10
Protokate. aldehyd	6,54	3,58	0,20	6,78	3,72	0,16	7,06	3,86	0,13
Kys. chlorogenová	6,95	3,87	0,22	7,52	4,23	0,18	8,19	4,64	0,15
Katechin	7,09	3,97	0,22	7,66	4,33	0,18	8,33	4,74	0,16
Kys. vanilová	7,61	4,33	0,24	8,24	4,74	0,20	8,94	5,16	0,17
Kys. kávová	7,72	4,41	0,25	8,43	4,87	0,21	9,41	5,48	0,18
Epikatechin	7,80	4,47	0,25	8,72	5,07	0,21	9,80	5,75	0,19
Kys. syringová	7,85	4,50	0,25	8,65	5,02	0,21	9,55	5,58	0,18
Vanilin	8,74	5,12	0,29	9,69	5,75	0,24	10,74	6,40	0,20
Konyferylalkohol	8,68	5,08	0,29	9,74	5,78	0,24	10,96	6,55	0,21
Kys. kumarová	9,02	5,32	0,30	10,20	6,10	0,26	11,59	6,98	0,22
Kys. ferulová	9,41	5,60	0,32	10,78	6,50	0,27	12,43	7,56	0,24
Syringol	11,59	7,13	0,41	11,16	6,77	0,28	12,73	7,77	0,24

Tabulka 14: Retenční data standardů měřených na koloně Kinetex Polar C18

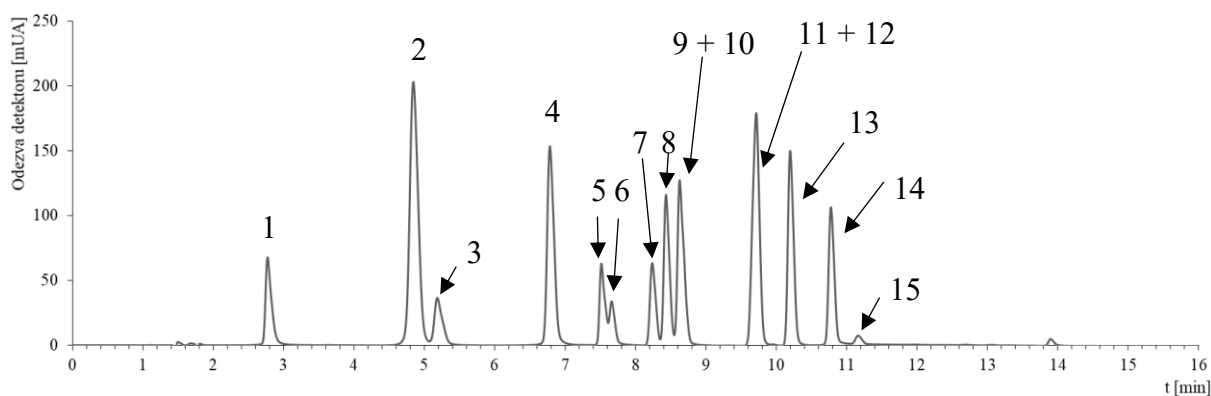
Kinetex Polar C18									
Standard	Gradient 1			Gradient 2			Gradient 3		
	t_{R,g} [min]	k'	φ_e [%]	t_{R,g} [min]	k'	φ_e [%]	t_{R,g} [min]	k'	φ_e [%]
Thiomočovina	1,63	-	-	1,64	-	-	1,64	-	-
Kys. gallová	5,84	2,58	0,13	6,00	2,66	0,09	6,16	2,76	0,07
Furfural	7,16	3,39	0,19	7,53	3,59	0,14	7,90	3,82	0,11
Kys. protokatechuová	7,31	3,48	0,19	7,85	3,79	0,15	8,41	4,13	0,12
Protokate. aldehyd	8,30	4,09	0,23	9,11	4,55	0,19	9,99	5,09	0,15
Kys. chlorogenová	8,36	4,13	0,24	9,53	4,81	0,20	10,87	5,63	0,17
Katechin	8,58	4,26	0,25	9,70	4,91	0,21	11,05	5,74	0,18
Kys. vanilová	9,06	4,56	0,27	10,20	5,22	0,22	11,50	6,01	0,19
Kys. kávová	9,13	4,60	0,27	10,36	5,32	0,23	11,78	6,18	0,19
Epikatechin	9,26	4,68	0,28	10,54	5,43	0,23	12,05	6,35	0,20
Kys. syringová	10,00	5,13	0,31	11,51	6,02	0,26	12,26	6,48	0,20
Vanilin	10,16	5,23	0,32	11,59	6,07	0,26	13,24	7,07	0,22
Konyferylalkohol	10,17	5,24	0,32	11,60	6,07	0,26	13,29	7,10	0,23
Kys. kumarová	10,28	5,31	0,32	11,90	6,26	0,27	13,81	7,42	0,24
Kys. ferulová	10,62	5,52	0,34	12,39	6,55	0,29	14,51	7,85	0,25
Syringol	11,06	5,79	0,35	12,67	6,73	0,30	14,80	8,02	0,26

Příloha 5: Chromatografická separace polyfenolů na koloně Kinetex C18 při třech profilech gradientů



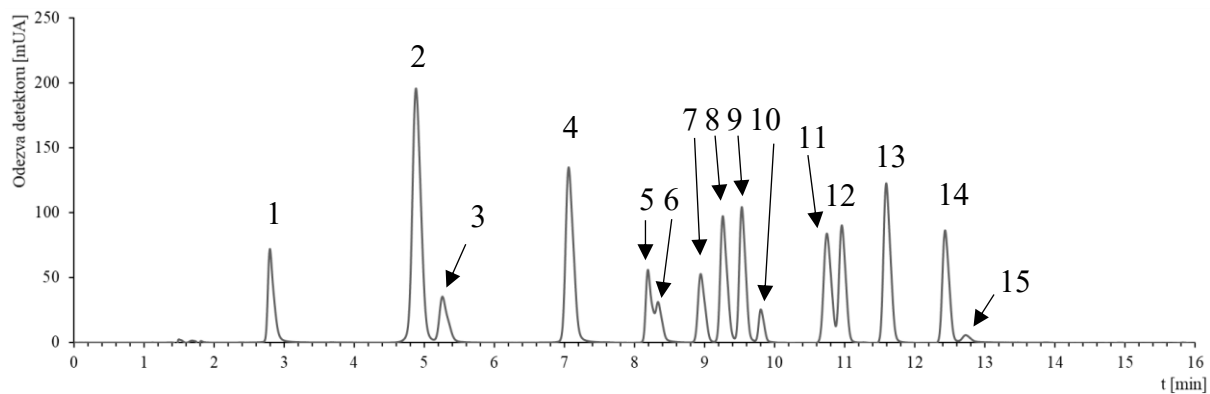
- 1) *K. gallová* 2) *Furfural*, 3) *K. protokatechuová*, 4) *Protokatechuový aldehyd*, 5) *K. chlorogenová*, 6) *Katechin*, 7) *K. vanilová*,
8) *K. kávová*, 9) *Epikatechin*, 10) *K. syringová*, 11) *Konyferylalkohol*, 12) *Vanilin*, 13) *K. kumarová*, 14) *K. ferulová*, 15) *Syrigol*

Graf 20: Separace polyfenolů na koloně Kinetex C18 při profilu gradientu 1



- 1) *K. gallová* 2) *Furfural*, 3) *K. protokatechuová*, 4) *Protokatechuový aldehyd*, 5) *K. chlorogenová*, 6) *Katechin*, 7) *K. vanilová*,
8) *K. kávová*, 9) *K. syringová*, 10) *Epikatechin*, 11) *Vanilin*, 12) *Konyferylalkohol*, 13) *K. kumarová*, 14) *K. ferulová*, 15) *Syrigol*

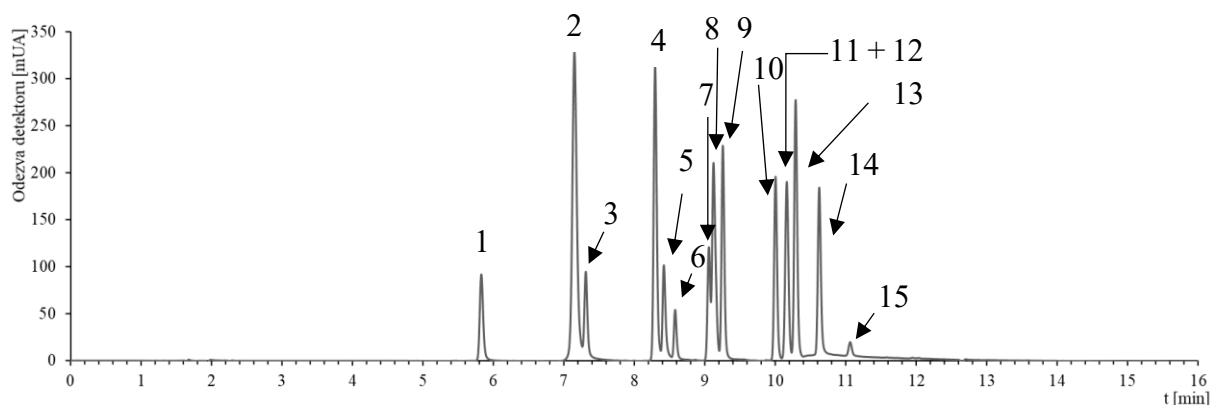
Graf 21: Separace polyfenolů na koloně Kinetex C18 při profilu gradientu 2



1) *K. gallová* 2) *Furfural*, 3) *K. protokatechuová*, 4) *Protokatechuový aldehyd*, 5) *K. chlorogenová*, 6) *Katechin*, 7) *K. vanilová*, 8) *K. kávová*, 9) *K. syringová*, 10) *Epikatechin*, 11) *Vanilin*, 12) *Konyferylalkohol*, 13) *K. kumarová*, 14) *K. ferulová*, 15) *Syrihol*

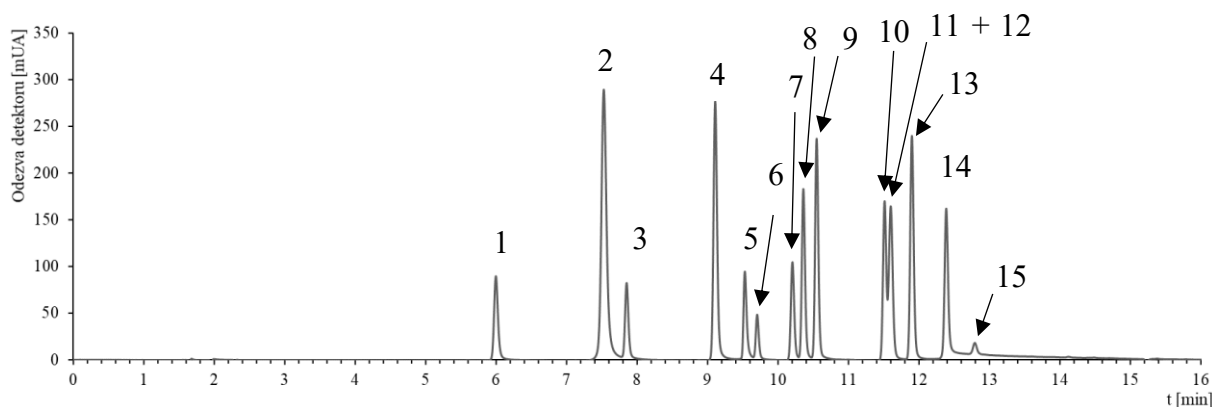
Graf 22: Separace polyfenolů na koloně Kinetex C18 při profilu gradientu 3

Příloha 6: Chromatografická separace polyfenolů na koloně Kinetex Polar C18 při třech profilech gradientů



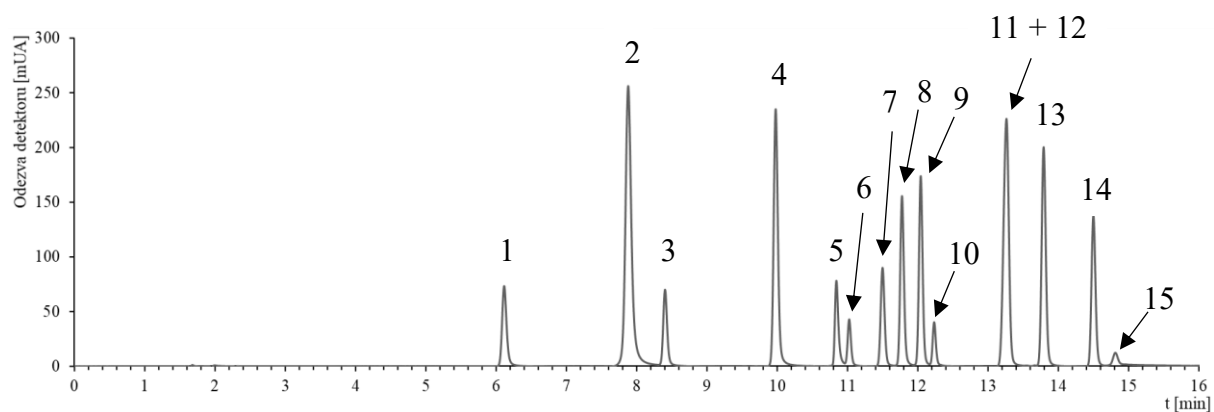
1) *K. gallová* 2) *Furfural*, 3) *K. protokatechuová*, 4) *Protokatechuový aldehyd*, 5) *K. chlorogenová*, 6) *Katechin*, 7) *K. vanilová*, 8) *K. kávová*, 9) *Epikatechin*, 10) *K. syringová*, 11) *Vanilin*, 12) *Konyferylalkohol*, 13) *K. kumarová*, 14) *K. ferulová*, 15) *Syrigol*

Graf 23: Separace polyfenolů na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu 1



1) *K. gallová* 2) *Furfural*, 3) *K. protokatechuová*, 4) *Protokatechuový aldehyd*, 5) *K. chlorogenová*, 6) *Katechin*, 7) *K. vanilová*, 8) *K. kávová*, 9) *Epikatechin*, 10) *K. syringová*, 11) *Vanilin*, 12) *Konyferylalkohol*, 13) *K. kumarová*, 14) *K. ferulová*, 15) *Syrigol*

Graf 24: Separace polyfenolů na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu 2



1) *K. gallová* 2) *Furfural*, 3) *K. protokatechuová*, 4) *Protokatechuový aldehyd*, 5) *K. chlorogenová*, 6) *Katechin*, 7) *K. vanilová*,
 8) *K. kávová*, 9) *Epikatechin*, 10) *K. syringová*, 11) *Vanilin*, 12) *Konyferylalkohol*, 13) *K. kumarová*, 14) *K. ferulová*, 15) *Syrigol*

Graf 25: Separace polyfenolů na koloně Kinetex Polar C18 při profilu gradientu 3

Příloha 7: Experimentálně naměřené plochy píků kalibračních roztoků kyseliny protokatechuové, kyseliny chlorogenové a kyseliny kávové

Tabulka 15: Plochy píků kalibrační řady roztoků fenolických kyselin

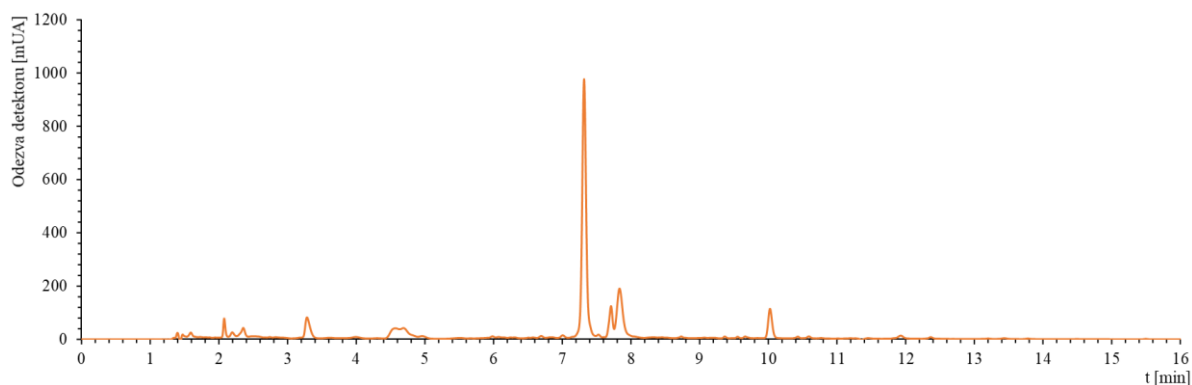
c [mg/l]	KP	KCH	KK
	Plocha	Plocha	Plocha
200	10409,74	9305,70	15430,48
	10402,30	9296,92	15358,86
	10410,51	9304,29	15457,01
100	5307,38	4719,63	7644,16
	5307,35	4710,41	7646,97
	5311,46	4712,43	7654,80
50	2670,07	2353,64	3371,05
	2673,89	2361,58	3367,51
	2675,69	2358,56	3368,22
10	520,36	452,58	736,57
	520,94	447,62	735,42
	522,67	445,74	733,10
1	50,98	23,03	71,46
	50,88	22,98	70,70
	51,12	22,44	70,28

Příloha 8: Experimentálně naměřené plochy píků kyseliny protokatechuové, kyseliny chlorogenové a kyseliny kávové ve vzorcích octů

Tabulka 16: Plochy píků fenolických kyselin ve vzorcích octů

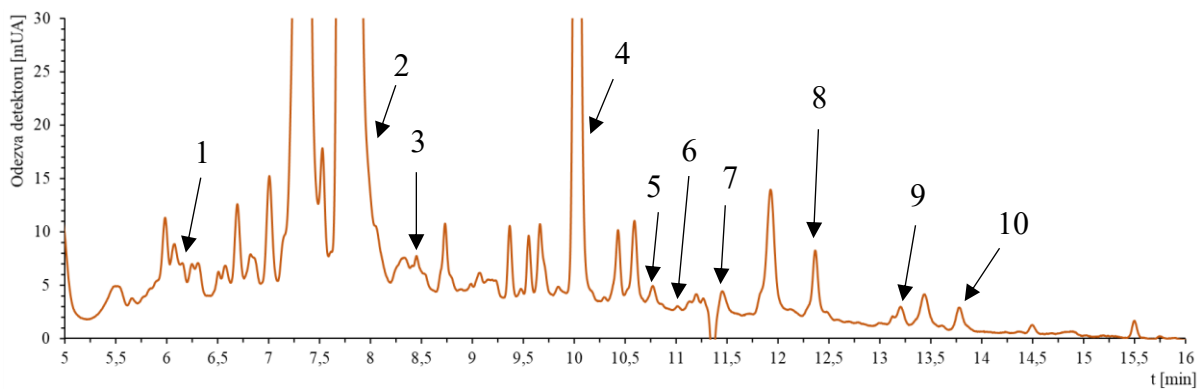
Vzorek	KP	KCH	KK
	Plocha	Plocha	Plocha
Japanese Rice Vinegar	32,57	7,88	-
	31,87	7,81	-
	32,32	7,85	-
Jablečný ocet kvasný	114,62	1529,89	166,77
	114,09	1553,83	171,12
	114,37	1561,41	172,35
Aceto Balsamico di Modena IGP	338,67	32,58	173,37
	359,15	23,06	170,58
	365,46	35,38	183,69

Příloha 9: Chromatogram rýžového octa



Podmínky analýzy: Kolona Polar C18 (100 x 3 mm; 2,6 µm); MF A: vodný roztok kyseliny octové 0,1%, B: ACN; gradientové eluce; průtok MF 0,3 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 5 µl.

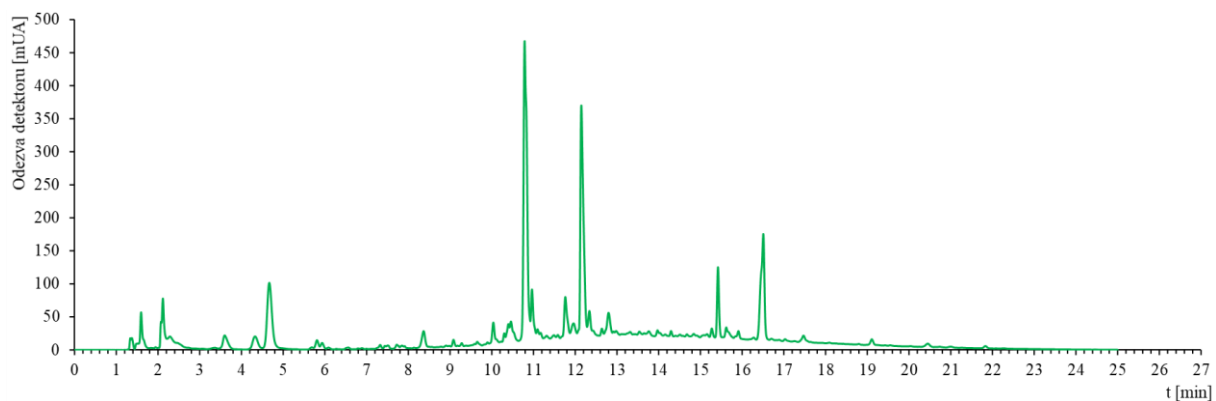
Graf 26: Chromatogram rýžového octa



1) K. gallová, 2) Furfural, 3) K. protocatechuová, 4) Protocatechuový aldehyd, 5) K. chlorogenová, 6) Katechin, 7) K. vanilová, 8) Epikatechin, 9) Vanilin, 10) K. kumarová

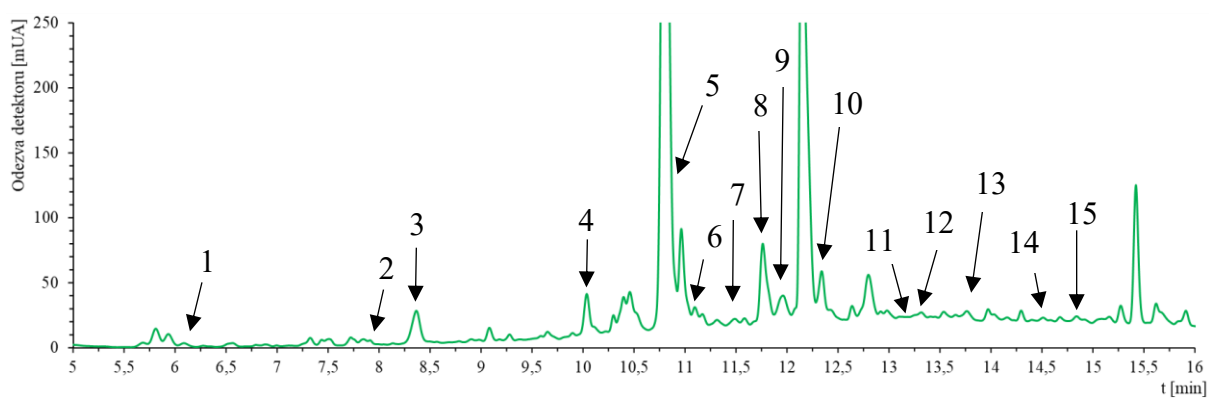
Graf 27: Přiblížený chromatogram rýžového octa

Příloha 10: Chromatogram jablečného octa



Podmínky analýzy: Kolona Polar C18 (100 x 3 mm; 2,6 μ m); MF A: vodný roztok kyseliny octové 0,1%, B: ACN; gradientové eluce; průtok MF 0,3 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 5 μ l.

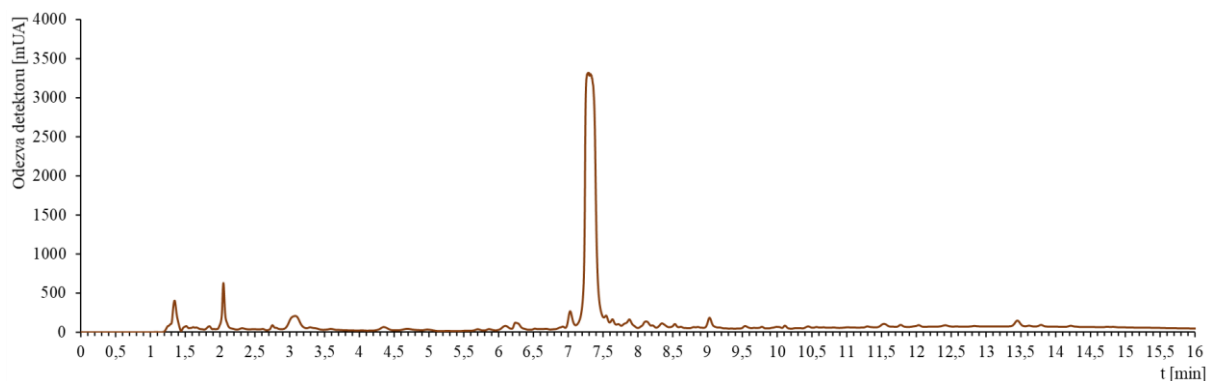
Graf 28: Chromatogram jablečného octa



1) K. gallová, 2) Furfural, 3) K. protokatechuová, 4) Protokatechuový aldehyd, 5) K. chlorogenová, 6) Katechin, 7) K. vanilová, 8) K. kávová, 9) K. syringová, 10) Epikatechin, 11) Vanilin, 12) Konyferylalkohol, 13) K. kumarová, 14) K. ferulová, 15) Syringol

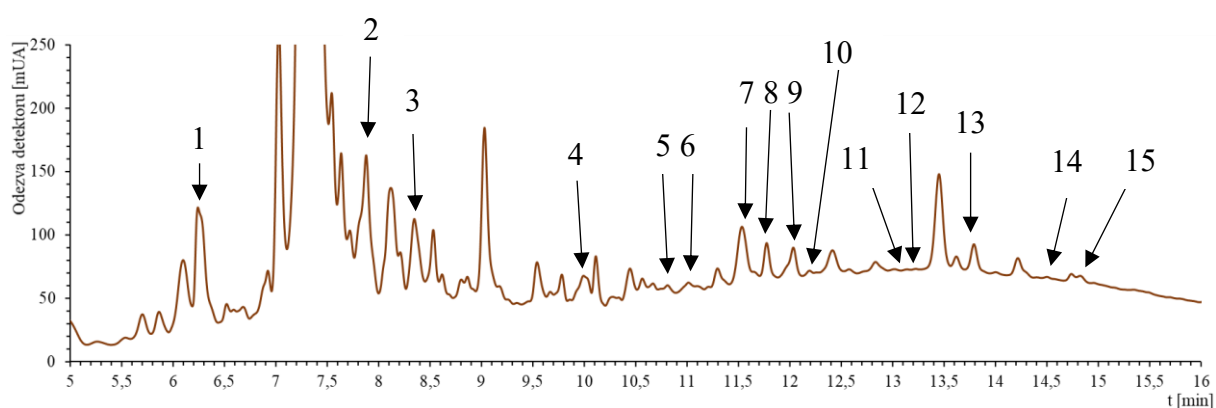
Graf 29: Přibližný chromatogram jablečného octa

Příloha 11: Chromatogram balzamického octa



Podmínky analýzy: Kolona Polar C18 (100 x 3 mm; 2,6 µm); MF A: vodný roztok kyseliny octové 0,1%, B: ACN; gradientové eluce; průtok MF 0,3 ml/min; teplota 30 °C; dávkovaný objem 5 µl.

Graf 30: Chromatogram balzamického octa



1) *K. gallová*, 2) *Furfural*, 3) *K. protokatechuová*, 4) *Protokatechuový aldehyd*, 5) *K. chlorogenová*, 6) *Katechin*, 7) *K. vanilová*, 8) *K. kávová*, 9) *K. syringová*, 10) *Epikatechin*, 11) *Vanilin*, 12) *Konyferylalkohol*, 13) *K. kumarová*, 14) *K. ferulová*, 15) *Syrigol*

Graf 31: Přibližný chromatogram balzamického octa