

# **Extrakce fenolových kyselin z rostlinných potravin pevného charakteru**

Bc. Věra Maňásková

---

Diplomová práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Věra Maňásková**  
Osobní číslo: **T11115**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Extrakce fenolových kyselin z rostlinných potravin  
pevného charakteru**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Prostudujte výskyt fenolických látek v potravinách a jejich vlastnosti.
2. Charakterizujte extrakční metody pro izolaci fenolických látek.
3. Popište metody stanovení fenolických látek.

### II. Praktická část

1. Stanovte vhodnou metodu pro izolaci fenolických látek z pevného materiálu.
2. Změřte obsah vybraných fenolických látek.
3. Porovnejte výsledky s dostupnou literaturou.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin 2*. Havlíčkův Brod: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.

[2] ROTSCHOVÁ, J. a J. STRNADOVÁ. *Laboratorní přístroje a postupy*. *Chemické Listy [online]*. 2006, č. 2 [cit. 2013-01-10]. Dostupné z:

[http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006\\_02\\_114-117.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_02_114-117.pdf).

[3] ZITKA, O., J. SOCHOR, O. ROP, S. SKALICKOVA, P. SOBROVA, J. ZEHNALIK, M. BEKLOVA, B. KRŠKA, V. ADAM a R. KIZEK. *Comparison of Various Easy-to-Use Procedures for Extraction of Phenols from Apricot Fruits*. *Molecules [online]*. 2011, č. 4 [cit. 2013-01-10]. Dostupné z: [www.mdpi.com/journal/molecules](http://www.mdpi.com/journal/molecules).

[4] CHVÁTALOVÁ, Kateřina. *Studium antiradikálové aktivity fenolových kyselin a jejich vlivu na redoxní stav železa a mědi [online]*. Brno, 2006 [cit. 2013-01-14]. Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/14202/lf\\_d/DSP\\_chvatalova.pdf](http://is.muni.cz/th/14202/lf_d/DSP_chvatalova.pdf). Disertační práce. Masarykova Univerzita Brno, Lékařská fakulta.

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Pavel Hanuštiak**

Ústav technologie potravin


Datum zadání diplomové práce:

**16. ledna 2013**

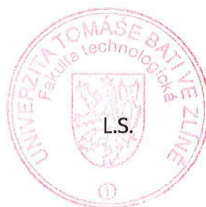
Termín odevzdání diplomové práce:

**2. května 2013**

Ve Zlíně dne 4. února 2013



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Maňásková Věra

Obor: Technologie, hygiena a ekonomika  
výroby potravin

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby<sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 29. 4. 2013

  
.....

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce se zabývá výběrem vhodné extrakční metody k izolaci fenolových kyselin z pevného vzorku rostlinného původu a zjištěním, které z vybraných fenolových látek se ve vzorku nacházejí. Stanovována byla kyselina 4-aminobenzoová, 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, vanilinová, kávová, p-kumarová, ferulová, sinapová a vanilin. Výběr vhodné extrakční metody se odvíjel od zjištěného obsahu stanovovaných fenolových látek. Vzorek představuje mouku z rozdrcených semen révy vinné. V teoretické části je popsána réva vinná, antioxidanty ze skupiny polyfenolů, extrakční metody a HPLC metoda. V praktické části jsou vyhodnoceny výsledky z laboratoří.

Klíčová slova: semena révy vinné, polyfenoly, fenolové kyseliny, extrakce, chromatografie, HPLC

## **ABSTRACT**

This thesis deals with the selection of suitable extraction method for the isolation of phenolic acids from solid samples of plant origin and finding that the selected phenolic compounds in the sample are located. Determined the 4-aminobenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic, vanillic, caffeic, p-coumaric, ferulic, sinapic and vanillin. Selection of a suitable extraction method was based on the identified content of determined phenolic compounds. The sample represents the flour from the crushed seeds of grapes. The theoretical part describes the grapevine, a group of antioxidants polyphenols extraction method and HPLC method. The practical part analyzes the results from the lab.

Keywords: seeds of grapevine, polyphenols, phenolic acids, extraction, chromatography, HPLC

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce panu Ing. Pavlu Hanuštiakovi, Ph.D. za jeho odborné rady, připomínky a konzultace. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Evě Lorencové za konzultace, pomoc v laboratořích a ochotu. Velké poděkování patří mé rodině a mému příteli za psychickou podporu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 ROSTLINA RÉVA VINNÁ</b> .....	<b>13</b>
1.1 PLODY RÉVY VINNÉ .....	14
1.2 SEMENA RÉVY VINNÉ .....	15
<b>2 ANTIOXIDANTY</b> .....	<b>16</b>
<b>3 POLYFENOLY</b> .....	<b>19</b>
3.1 ROZDĚLENÍ.....	20
3.1.1 Fenolové kyseliny.....	20
3.1.2 Flavonoidy.....	21
3.1.2.1 Flavonoly .....	22
3.1.2.2 Flavony .....	22
3.1.2.3 Isoflavony.....	22
3.1.2.4 Flavanony.....	22
3.1.2.5 Anthokyanidiny.....	22
3.1.2.6 Flavanoly.....	23
3.1.3 Stilbeny.....	23
3.1.4 Lignany.....	23
3.2 DŮLEŽITÉ FENOLICKÉ LÁTKY.....	23
3.2.1 4-aminobenzoová kyselina .....	23
3.2.2 3,4-dihydroxybenzoová kyselina.....	24
3.2.3 4-hydroxybenzoová kyselina.....	24
3.2.4 Vanilinová kyselina.....	25
3.2.5 Kávová kyselina .....	25
3.2.6 Vanilin.....	25
3.2.7 p-kumarová kyselina .....	26
3.2.8 Ferulová kyselina .....	26
3.2.9 Sinapová kyselina.....	27
<b>4 EXTRAKČNÍ METODY</b> .....	<b>28</b>
4.1 EXTRAKCE.....	28
4.1.1 Podle způsobu provedení .....	28
4.1.2 Podle zúčastněných fází .....	29
4.1.3 Podle charakteru extrahovaných látek.....	30
4.2 EXTRAKČNÍ METODY PRO IZOLACI FENOLICKÝCH LÁTEK.....	30
4.2.1 Extrakce kapalina-pevná látka (LSE, Liquid-Solid Extraction).....	30
4.2.2 Extrakce podporová mikrovlnným ohřevem (MASE, Microwave Assisted Solvent Extraction).....	31
4.2.3 Zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE, Accelerated Solvent Extraction nebo také PLE, Pressurised Liquid Extraction- kapalinové extrakce podporovaná tlakem) .....	31
4.2.4 Superkritická fluidní extrakce (SFE, Supercritical Fluid Extraction) .....	32
4.2.5 Extrakce ultrazvukem.....	32



4.2.6	Extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou (PHWE- Pressurized Hot Water Extraction) .....	33
4.2.7	Enzymatická hydrolyza .....	33
4.2.8	Extrakce tuhou fází (SPE, Solid-Phase Extraction) .....	33
4.2.9	Třepání .....	34
4.2.10	Působení teploty .....	34
<b>5</b>	<b>CHROMATOGRAFIE .....</b>	<b>35</b>
5.1	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	35
5.1.1	HPLC (Hight performance liquid chromatography) .....	36
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>42</b>
7.1	ANALYZOVANÝ VZOREK .....	42
7.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	42
7.3	PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	42
7.4	POSTUP PRÁCE.....	43
7.4.1	Příprava mobilní fáze .....	44
7.4.2	Extrakce rozpouštědlem za působení teploty a času .....	44
7.4.3	Extrakce rozpouštědlem za působení 50 °C, ultrazvuku a času.....	44
7.4.4	Kalibrační křivky standardů .....	45
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>46</b>
8.1	KALIBRAČNÍ KŘIVKY STANDARDNÍCH LÁTEK .....	46
8.1.1	Kalibrační křivka kyseliny 4-aminobenzoové.....	46
8.1.2	Kalibrační křivka kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové.....	47
8.1.3	Kalibrační křivka kyseliny 4-hydroxybenzoové.....	47
8.1.4	Kalibrační křivka kyseliny vanilinové.....	48
8.1.5	Kalibrační křivka kyseliny kávové.....	48
8.1.6	Kalibrační křivka vanilinu.....	49
8.1.7	Kalibrační křivka kyseliny p-kumarové .....	49
8.1.8	Kalibrační křivka kyseliny ferulové .....	50
8.1.9	Kalibrační křivka kyseliny sinapové .....	50
8.2	STANOVENÍ FENOLOVÝCH KYSELIN V ROSTLINNÉM MATERIÁLU METODOU HPLC-UV-VIS .....	51
8.2.1	Stanovení fenolových kyselin po extrakci rozpouštědlem za působení teplot a časů.....	51
8.2.2	Stanovení fenolových kyselin po extrakci rozpouštědlem za působení 50 °C a ultrazvuku.....	62
8.3	DISKUZE.....	69
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>80</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>82</b>

<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>84</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>85</b>

## ÚVOD

Réva vinná pro mnohé spotřebitele představuje jen požitek z dobrého vína, které je z ní vyráběno. Není to však jen víno, čím nás může obohatit. Hrozny jsou hodnotným ovocem. Obsahuje vitamin C a vitaminy skupiny B, požíváním hroznů lépe prochází moč močovým měchýřem, obsahují vlákninu.

V dužnině bobule je obsaženo nejvíce vody, a to 55-90%, dále obsahuje glukózu a fruktózu 10-30%. Pecičky obsahují třísloviny 0,5-8%, dusíkaté látky 0,8-6% a nejvíce oleje 8-20%. Slupka obsahuje 3,5 % celulózy, 0,1-0,7% kyselin a 0,1-4% tříslovin.

Z hroznů je možné kromě vína vyrábět i mošt, želé, vinný ocet, olej a i mouku.

Pro mnohé vinaře v České republice představují zbytky z hroznů po získání vína jen pouhý odpad. Tak tomu ale není. Semena z révy vinné jsou velmi cenným zdrojem antioxidantů. Jsou využívána k výrobě oleje, kdy jsou semena vysušena a následně za studena lisována. Olej takto získaný je stále více populární. Je vhodný ke smažení, jelikož se nepřepaluje, ale i jako zálivka do salátu. Lze jej použít i k aromaterapii, kdy se přes pokožku do těla dostávají antioxidanty. Dalším produktem je bezlepková mouka získaná rozdrcením vylisovaných semen. Samotnou ji nelze použít, jelikož má hořkou chuť. Je hnědé barvy a je používána do směsi k výrobě chleba či rohlíků. Takto vyrobené pečivo je obohaceno o cenné antioxidanty a tedy zdraví prospěšné.

Produkty z vinného odpadu představují doplňkový sortiment celkové produkce vinaře, ale i tak je o ně u zákazníků zájem. Jen velmi málo vinařů u nás takto zpracovává svůj odpad. Důvodem jsou i časté legislativní překážky a hygienické normy. Naproti tomu u Rakouských vinařů je to běžné. Čeští vinaři se zde nechávají inspirovat.

Antioxidanty v semenech jsou obsaženy především v podobě polyfenolů.

Přijaté antioxidanty chrání lidský organismus před účinky volných radikálů. Snižují možnost jejich vzniku nebo je převádí do méně reaktivní či nereaktivní formy. Vlivem dnešního většího stresu, kouření, nedostatkem pohybu, nedostatečnou konzumací ovoce a zeleniny nestačí kapacita antioxidantů v lidském těle na regulaci volných radikálů. Proto je třeba přijímat antioxidanty v potravě. Lidské tělo osob oslabených nemocí, osob žijících v nezdravém životním prostředí nebo těch, jež konzumují jen maso, cukr a škrob je mnohem náročnější na příjem antioxidantů.

Antioxidanty hrají roli v prevenci proti kardiovaskulárním chorobám, rakovinnému bujení, mají protizánětlivé účinky a působí proti virům.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 ROSTLINA RÉVA VINNÁ

Réva evropská nebo se jí také říká réva ušlechtilá (*Vitis vinifera*), pochází z Evropy. Tento druh má dva poddruhy. *Vitis vinifera* s poddruhem *silvestris*, což je réva lesní, která je volně rostoucí. Pochází z Kavkazu, postupně se rozšířila do Středomoří, Řecka a po celé Evropě. Je to předchůdce dnešních kulturních odrůd révy vinné, které spadají do *Vitis vinifera* poddruh *sativa*. V Evropě se dříve vyskytovala réva lesní a až posléze činností člověka vznikly z révy lesní kulturní odrůdy révy vinné [1].

Réva vinná je botanicky řazena do čeledi révovitých. Jedná se o teplomilnou rostlinu. Jedná se o popínavou rostlinu. K přichycení pnoucí se rostliny slouží úponky. Na vinicích dorůstají výšky nejvýše 4 metry s kmenem o průměru 50 centimetrů. Nadzemní část rostliny tvoří dřevité partie mající různé odstíny hnědé podle stáří a zelené letorosty vyrůstající z jednoletého dřeva. Listy vyvíjející se na letorostech bývají okrouhlé, tři až pět laloků a průměrně o velikosti 15 centimetrů. Květy jsou žlutozelené barvy a tvoří laty. Je to jednodomá rostlina. Plodem jsou bobule různých tvarů, rozmanité barvy od zelenožluté přes žlutou, červenou až tmavofialovou. Bobule vytvářejí hrozen. Plody révy vinné se používají k výrobě nápojů i ke konzumaci. Velký kořenový systém prorůstá hluboko do půdy a obepíná velký prostor v půdě. Kořenový systém slouží k uchování zásobních látek a k příjmu a vedení vody a minerálních látek, část zásobních látek je uložena v kolénkách révy vinné. Vytvořené zásoby pak slouží k rychlému rašení letorostů zjara. Růst révy vinné je charakteristický jako střídání růstových pater, silně rozvětvená a odumírající patra se střídají s patry nově vznikajícími. Patro, které je silně rozvětvené a zahuštěné postupně odumírá. Z víceletého dřeva pak vyrůstají nové bujné letorosty [1, 2, 3, 4].



Obrázek 1: Réva vinná  
(letorost, list, hrozen, bobule) [3]

## 1.1 Plody révy vinné

Plody révy vinné představují hrozny. Hrozen je složen z bobulí a třapiny, přičemž třapina tvoří 3-5% hmotnosti hroznu. Třapina zastává funkci vodivého pletiva. Bobule je tvořena slupkou, dužninou a pečičkami, přičemž slupka tvoří 6-12% celkové hmotnosti, dužnina 83-90% a pečičky 2-5% [5].

Slupka je tvořena buněčnou blánou, kterou tvoří celulóza a vosk. Vosk tvoří povrch bobule, chrání ji tak před chorobami a reguluje dýchání. Ve slupce jsou obsaženy třísloviny a aromatické a barevné látky, kdy tříslovin ve slupce modrých odrůd je více než v bílých odrůdách. Bílé odrůdy ve svých slupkách obsahují flavonová barviva (žlutozelená) a modré odrůdy ve svých slupkách mají antokyanová barviva (červená) [5].

Bobule v sobě obsahuje zpravidla jednu až dvě pečičky, a ty v sobě obsahují větší množství oleje významného z hlediska zdravé výživy (výborné chemické složení), dále obsahují i třísloviny, jejichž vyluhování při výrobě vína je nežádoucí [5].

Dužnina představuje nejdůležitější část bobule, kdy její vnější část je šťavnatější a vnitřní část je spíše tuhá a obsahuje v sobě cévní svazky, s jejichž pomocí je zajištěna výživa bobule. Uprostřed dužniny je pak nejvyšší obsah cukru a kyselin, obsah tříslovin se při dozrávání z dužniny postupně vytrácí [5].

V dužnině je obsaženo nejvíce vody, a to 55-90%, dále obsahuje glukózu a fruktózu 10-30%. Pečičky obsahují třísloviny 0,5-8%, dusíkaté látky 0,8-6% a nejvíce oleje 8-20%.

Slupka obsahuje 3,5 % celulózy, 0,1-0,7% kyselin a 0,1-4% tříslovin. Třapina obsahuje 0,5-1,6% kyselin a 1,3-50% tříslovin [5].

## 1.2 Semena révy vinné

Semena révy vinné jsou velmi cenná pro obsah antioxidantů v podobě polyfenolů a pro obsah procyanidinu (OPC), což je velmi účinný chytač volných radikálů. **Semena** lze využít k výrobě celé řady produktů. Jednou z možností je získat vylisováním semen olej, který je stále více oblíbený. Olej z těchto semínek lze využít nejen na vaření ale i k aromaterapii nebo v podobě koupelových olejů. Přes pokožku je tak možné přijmout dostatečné množství antioxidantů. Olej je vynikající na smažení, jelikož se nepřepaluje ale i jako zálivka na saláty. Z vylisovaných semen pak lze získat moučku, která se přidává k mouce do směsí na pečení zdravého chleba, rohlíků, výživných tyčinek, crackrů. Mouka ze semínek révy vinné je bezpečná s vysokou koncentrací antioxidantů. Mouka samotná není vhodná k přímému použití, jelikož její chuť je hořká. Výtažky ze semen révy lze využít i ve farmacii i v kosmetice. Moučku lze využít i jako krmný doplněk pro zvířata [6, 7, 8, 9, 10, 11].



Obrázek 2: Fotografie vzorku moučky  
ze semen révy vinné

## 2 ANTIOXIDANTY

Antioxidanty jsou látky mající schopnost omezovat aktivitu kyslíkových radikálů. Ty se vyskytují v lidském organismu nejčastěji a jsou i nejreaktivnějšími radikály. Antioxidanty tedy snižují možnost vzniku těchto silně oxidativních kyslíkatých radikálů nebo mají schopnost převádění do méně reaktivní či nereaktivní formy. Kromě kyslíkových radikálů je věnována pozornost i dusíkovým radikálům. Všechny tyto radikály mají vliv na biologicky významné sloučeniny, jako jsou lipidy, bílkoviny či nukleové kyseliny. Mění jejich strukturu a tím i jejich funkci. Reakce, jež jsou vyvolány volnými radikály, vedou k poškození tkání, orgánů a funkcí v organismu [12, 13].

Antioxidanty tedy chrání lidské tělo před oxidačním stresem, který je způsoben převahou volných radikálů nad antioxidanty v organismu [14].

Antioxidanty jsou děleny podle původu na přírodní a syntetické. Přírodní antioxidanty jsou vyskytující se přirozeně v přírodě, např. ovoce, zelenina, ořechy, semena, či v potravinách a nápojích, např. červené víno, výrobky s více než 70% kaka. Syntetické antioxidanty byly vytvořeny uměle a nevyskytují se nikde v přírodě. Vyskytují se hlavně v potravinových doplňcích, které nejsou na přírodní bázi [12, 15].

Mezi přírodní antioxidanty rozpustné ve vodě je řazen vitamin C (kyselina askorbová), flavonoidy a fenoly. Mezi přírodní antioxidanty rozpustné v tucích je zařazován vitamin E (tokoferoly), některé karotenoidy, xantofyly a ubichinony (koenzymy Q). Dostatečný příjem přírodních antioxidantů je zajištěn konzumací ovoce a zeleniny. Mezi syntetické antioxidanty jsou zařazovány například galláty, BHA (butylhydroxyanisol), BHT (butylhydroxytoluen) [12].

Přírodní antioxidanty přítomné v těle člověka mají příznivý vliv na snížení pravděpodobnosti vzniku kardiovaskulárního onemocnění a některých nádorových onemocnění. Bez antioxidantů by lidé podléhali nejrůznějším infekčním onemocněním, rakovině, lidé by předčasně zestárli, buňky by se přestaly regenerovat a byla by narušena imunitní schopnost organismu, došlo by k poruše metabolismu a mnoho jiných. Lidské tělo produkuje svoje vlastní antioxidanty, ale ty nestačí k zvýšení obranyschopnosti organismu, k ochraně před nejrůznějšími chorobami, k zvýšení odolnosti při větší zátěži, je třeba přijímat antioxidanty zvenku, tedy z potravy [12, 16].

Podle odborníků je účinnost přírodních antioxidantů mnohokrát vyšší, než stejné množství podávaného potravinového doplňku, který představuje antioxidanty v čisté podobě. Vý-



zkum poukazuje dokonce na to, že při delším užívání některých antioxidantů v čistém stavu dochází k tzv. zvratu antioxidantů. Dochází tedy k opačnému, nežádoucímu účinku. Tato vlastnost některých antioxidantů nebyla doposud pochopena. U antioxidantů přijímaných přirozeně tento zvrát pozorován nebyl [12].

Vitamin C- nalezneme ho ve většině druhů ovoce a zeleniny, výjimku tvoří zelenina čeledi tykvovitě. Jedná se o nejvýznamnější ve vodě rozpustný antioxidant. V ovoci a zelenině je obsah vitamínu C závislejší především na tom o jakou plodinu se jedná, na odrůdě, klimatických podmínkách a vlastnostech půdy. Průměrná denní dávka vitamínu C je přibližně 60-70 mg [12].

Karotenoidy- sem lze zařadit  $\beta$ -karoten, jehož antioxidační účinky jsou malé a lze ho nalézt především v meruňkách, broskvích, mrkvi či mangu. Větší antioxidační účinky má lykopen obsažený v rajčatech. Další zdroje karotenoidů s antioxidačním účinkem, což jsou lutein a xantofyl, jsou květák, brokolice, listová zelenina či kukuřice [12].

BHA- monofenolový antioxidant. Jedná se o směs dvou isomerů, a to 3-*terc*-butyl-1-4-hydroxyanisol (3-BHA), jež představuje 90 % směsi a 2-*terc*-butyl-4-hydroxyanisol (2-BHA), který představuje 10 %. BHA ochraňuje zejména tuky s obsahem kratších řetězců mastných kyselin (př. kokosový olej). Používá se v obalových materiálech a odtud pak může přecházet do potravin. BHA si zachovává svůj antioxidační účinek i po tepelné úpravě potravin [17].

Přemírou oxidativních procesů v organismu nebo potravině vznikají velmi reaktivní částice, což jsou právě tzv. volné radikály. Volné radikály se vyskytují v malém množství i v lidském těle, kde slouží k inhibici mikrobiální kontaminace. Tyto radikály likvidují dané mikroby tak, že je „spálí“. Pokud se v těle vyskytuje větší množství volných radikálů, má to negativní dopad na organismus. Z důvodu změny vlivů na člověka a okolí člověka, jako je působení většího stresu, kouření, používání aut, méně pohybu, nižší konzumace ovoce a zeleniny, nestačí antioxidační kapacita v těle na regulaci volných radikálů. Proto je třeba přijímat větší množství antioxidantů v potravě. I když člověk přijímá pestrou stravu, neznamená to, že nemůže docházet k deficitu některých živin. Denně by muselo být zkonsumováno přibližně 6-12 kilogramů čerstvého ovoce a zeleniny, aby bylo získáno potřebné množství živin. Navíc některé skupiny osob jsou ještě náročnější, jako jsou třeba osoby žijící v nezdravém životním prostředí, osoby nemocné nebo ty které konzumují jen maso, cukry a škrob. Potraviny z obchodů navíc mohou obsahovat nízké množství přírodních antioxidantů a vyskytují se v nich zbytky mající povahu volných radikálů. Tento pro spo-

třebitele špatný poměr se ještě více zhoršuje s prodlužující se dobou skladování potravin. Stejně tak při kuchyňských úpravách dochází ke ztrátám antioxidantů (tepelná úprava, styk s železem nebo strouhání) [12, 16].

Antioxidanty prodlužují uchovatelnost a stálost potravin, a to tím, že zabraňují jejich oxidaci. Dále zachovávají chuť a barvu potravin, a zpomalují barevné změny ovoce a zeleniny. Díky nim nedochází k žluknutí tuků, protože zabraňují oxidaci jak samotných tuků, tak i potravin obsahujících tuk. Proto, se i záměrně antioxidanty přidávají do potravin. Již v minulosti bylo k údržnosti potravin využíváno přírodních antioxidantů z řad bylin a koření (rozmarýn, šalvěj, tymián, hřebíček) [15, 17, 18].

### 3 POLYFENOLY

Rostlinné polyfenoly představují především sekundární metabolity rostlin, jejichž úkolem je rostliny chránit před vnějšími vlivy jako je ultrafialové záření, před požíváním od zvířat či před různými patogeny. Před požíváním od zvířat je rostlina chráněná prostřednictvím taninů. Výztuhu rostlin pak tvoří lignany [19, 20, 21].

Pod tento název je řazeno velké množství sloučenin. Společným znakem těchto sloučenin je jedna či více než jedna hydroxylová skupina navázaná na jejich aromatickém jádře. V současnosti je známo více než 8000 fenolických látek. Jedná se o významné přírodní látky s antioxidačními účinky [13, 19, 22].

Při příjmu polyfenolů z potravin jsou nejvíce zastoupeny flavonoidy a to dvěma třetinami, po nich následují fenolové kyseliny v množství jedné třetiny a minimální množství tvoří lignany a stilbeny. Nacházejí se téměř ve všech rostlinách, jejich výskyt je převažující v listech, květech, semenech, plodech a samozřejmě v potravinách rostlinného původu [22].

Bohatým zdrojem polyfenolů pro člověka je především ovoce a zelenina. Dalším zdrojem jsou nápoje, jako je káva, čaj, víno, ovocné džusy nebo aromatické a léčivé rostliny. Některé polyfenoly jsou obsaženy ve většině rostlinných produktů (ovoce, zelenina, cereálie), jiné naopak jsou obsaženy jen ve specifických rostlinných produktech [13, 22].

Polyfenoly se podílejí na senzoryckých a nutričních vlastnostech rostlinné potravy. V ovoci a zelenině se polyfenoly podílejí na barvě, chuti a vůni. Zatím co vysokomolekulární látky (trísloviny) přispívají k svíravé a trpké chuti a mají schopnost reagovat s bílkovinami (čiření šťáv), nízkomolekulární mohou vyvolávat hořkou chuť [22].

Rostlinné polyfenoly jsou důležité pro člověka svou antioxidační aktivitou. Jejich antioxidační účinek spočívá ve schopnosti zhaset reaktivní kyslíkaté radikály a omezovat tvorbu dalších radikálů. Hrají roli v prevenci proti chorobám vycházející z oxidačního stresu. Polyfenoly mají protizánětlivé účinky, působí proti karcinogenním chorobám a protiskleroticky, mají důležitou roli při fagocytóze nebo chytají již vzniklé superoxidy. Zabraňují lipoperoxidaci, čímž je organismus chráněn před rozvojem aterosklerózy. Působí proti virům a koronárním chorobám [18, 19, 20, 22].

Obsah polyfenolů v rostlinách je ovlivněn řadou věcí, jako jsou druh, odrůda, podmínky pěstování, zralost při sklizení, skladování, tepelné úpravy a další. Kdy dochází k úbytku polyfenolů v potravě. V některých případech ale dochází ke zvyšování obsahu polyfenolů

při technologických operacích, jako je tomu u lisování ovocných šťáv při výrobě vína či džusů, kdy jsou uvolňovány [22, 23].

Čím více má polyfenolová sloučenina fenolických skupin, tím vyšší je její antiradikálová aktivita. Minimálně dvě fenolové skupiny jsou nutné pro antioxidační aktivitu. I když jsou polyfenoly v potravě běžně obsaženy, nemusí docházet k jejich zužitkování. Mohou být okamžitě vylučovány, mohou být metabolizovány příliš rychle či hůře vstřebávány z trávicího traktu. Jsou hůře vstřebatelné než vitaminy vlivem jejich hydrofilnosti a velkou molekulou. Polyfenoly mohou být vstřebávány již v žaludku člověka, avšak k častějšímu vstřebávání dochází v tenkém střevě a to zejména glykosidů a esterů fenolových kyselin. O nevstřebažené polyfenoly se stará mikroflóra tlustého střeva, a to hydrolýzou na aglykony. Polyfenoly po vstřebání pak procházejí třemi hlavními typy konjugace, a to methyloací, sulfatací a glukuronidací. Následné polyfenolové metabolity jsou v krvi vázány na plazmatické bílkoviny (albumin). Tato vazba ovlivňuje rychlost vylučování metabolitů a jejich vstup do buněk a tkání. Metabolity jsou vylučovány močí nebo žlučí [19].

Ke stanovení celkového množství polyfenolů v potravě lze použít chromatografii u předem definované složky nebo lze množství zjistit reakcí s Folin-Ciocalteuovým činidlem. Při užití první metody může dojít k uniknutí některých polyfenolů při aplikaci vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Při použití druhé metody je Folinovo činidlo redukováno i jinými látkami než jsou polyfenoly (př. kyselina askorbová) [21].

Rostlinné polyfenoly dělíme na [19]:

- fenolové kyseliny
- flavonoidy
- stilbeny
- lignany

## 3.1 Rozdělení

### 3.1.1 Fenolové kyseliny

Vykazují účinky primárních antioxidantů. Jedná se o hydroxylové deriváty aromatických karboxylových kyselin. Ty vznikají buď z kyseliny benzoové, nebo z kyseliny skořicové [17, 24].

Rozlišujeme tedy dva základní typy fenolových kyselin [23, 24]:

- deriváty kyseliny skořicové (zde patří kyselina p-kumarová, kávová, chlorogenová, ferulová a sinapová)
- deriváty kyseliny benzoové (zde patří kyselina ellagová, gallová a hydrolyzované taniny)

Kyseliny mohou být jak ve volné, tak v esterifikované formě [23].

Z kyselin hydroxybenzoových jsou nejpodstatnější kyselina gallová a kyselina ellagová. Kyselinu ellagovou lze nalézt v bobulích, jako jsou maliny nebo jahody, dále pak v ořeších. Významným zdrojem kyseliny gallové jsou čajové lístky a víno. Kyseliny hydroxybenzoové bývají v potravě ve velmi malém množství [23].

V potravě přijímáme především kyseliny hydroxyskořicové, jež jsou ve stravě běžnější. Nacházíme je ve zralém ovoci. Z těchto kyselin jsou přijímány ve větším množství z potravy hlavně kyselina kávová a její estery, dále kyselina p-kumarová, kyselina ferulová a kyselina sinapová. Kyselina ferulová je nejvíce obsažena v obilovinách. Ester kyseliny kávové kyselina chlorogenová je přítomna ve spoustě druhů ovoce a zeleniny a v kávě [19, 23].

Fenolické kyseliny představují silný antioxidant proti volným radikálům. Jsou zdraví prospěšné, brání chronickým lidským nemocím (rakovina, kardiovaskulární onemocnění). Antioxidační aktivita fenolických kyselin a jejich derivátů je závislejší na počtu a poloze hydroxylových skupin vázaných na aromatickém kruhu [24].

### 3.1.2 Flavonoidy

Jedná se o primární antioxidanty. Pro jejich antioxidační aktivitu je důležitý počet hydroxylových skupin a jejich uspořádání v molekule. Za aktivní jsou považovány všechny dihydroxyderiváty s hydroxyskupinami v polohách C3 a C4. Antioxidační aktivita je nadále zvyšována další přítomností hydroxyskupin v kruhu B. Naopak flavonoidy s jednou hydroxyskupinou v kruhu B vykazují nižší aktivitu [17].

Je rozeznáváno šest podtříd flavonoidů, to podle stupně oxidace kyslíkového heterocyklu [23]:

1. Flavonoly
2. Flavony
3. Isoflavony
4. Flavanony
5. Anthokyanidiny
6. Flavanoly (katechiny, proanthokyanidiny)

### 3.1.2.1 *Flavonoly*

Jejich zastoupení v čerstvé hmotě je nízké. Dominantní z této skupiny je kvercetin, je nejvíce zastoupen v rostlinné potravě. Je přítomen jak v ovoci, tak v zelenině. Dalším zástupcem této skupiny je kemferol nacházející se v ovoci, bobulích, bylinách, listové zelenině, kořenové zelenině a luštěninách. Patří sem i myricetin obsažený v kukuřici a čaji [23].

### 3.1.2.2 *Flavony*

Vyskytují se méně než flavonoly. Mezi hlavní zástupce patří apigenin a luteolin. Nalézt je můžeme v petrželi, celeru či v červených paprikách. Podílejí se na barvě rostlinných tkání, pokud jsou ve vyšším množství [23].

### 3.1.2.3 *Isoflavony*

Mají antioxidační, antikarcinogenní či antibakteriální a jiné účinky. Vykazují však také toxické účinky. Nacházejí se především v luštěninách a to hlavně v sóji a ve výrobcích z ní [23].

### 3.1.2.4 *Flavanony*

Typický je pro ně výskyt v citrusech, kde se nacházejí ve větším množství. Jejich zásluhou mají citrusy svou chuť. V menším množství můžeme najít flavanony v rajčatech, v mátě nebo lékořici [23].

### 3.1.2.5 *Anthokyanidiny*

Anthokyaniny nebo také anthokyaniny představují rostlinná barviva. Predsouvají růžovou, červenou a modrou barvu. Existují barevné i nebarevné formy podle daného pH. Jsou zodpovědné za trpkou chuť ovoce z důvodu tvorby komplexu se slinnými proteiny.

Anthokyanidiny jsou obsaženy v ovoci, v bobulích modrých odrůd révy vinné, v některých druzích listové a kořenové zeleniny, jako že červené zelí, fazole, cibule. Hlavními zástupci jsou kyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinidin, petunidin. Anthokyanová barviva jsou povolena k barvení potravin [23].

### 3.1.2.6 Flavanoly

Mohou být katechiny (monomery) nebo proanthokyanidiny (polymery). Katechiny nalezneme v révě vinné ale i v dalších druzích ovoce, ale nejvíce zastoupeny jsou v zeleném čaji a čokoládě. Proanthokyanidiny nebo také konzervované taniny způsobují svíravou chuť ovoce jako je réva vinná, jablka, hrušky a dále způsobují hořkou chuť čokolády [23].

### 3.1.3 Stilbeny

Jsou podobné svou strukturou flavonoidům. V potravě člověka jsou zastoupeny pouze v malém množství. Zde je hlavním zástupcem resveratrol. Vzniká ve slupkách bobulí révy vinné jako obranný mechanismus proti plísním, proti UV záření a je i antioxidantem. Slupky bobulí červených odrůd révy vinné obsahují větší množství resveratrolu než slupky bílých odrůd. Nachází se i v menším množství ve vínech. Vliv na obsah resveratrolu ve slupkách hroznů mají především půdní podmínky, sluneční svit, stresové podmínky či odrůda révy vinné. Resveratrol má vliv v prevenci kardiovaskulárního onemocnění, má protizánětlivé účinky a antikarcinogenní. S dozráváním hroznů se jeho obsah ve slupkách zvyšuje [23, 25].

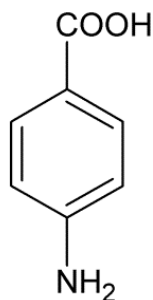
### 3.1.4 Lignany

V lidské stravě se příliš nevyskytují vlivem technologických úprav, kdy dochází k odstranění lignanů, které se nacházejí především v nejrůznějších slupkách semen. Zdrojem lignanů jsou lněná semínka, lněný olej a celozrnné žitné pečivo [23].

## 3.2 Důležité fenolické látky

### 3.2.1 4-aminobenzoová kyselina

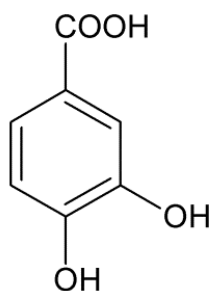
Známa také jako PABA nebo para-aminobenzoová kyselina. Patří do skupiny vitamínů B (označení vitamín B<sub>x</sub>). V lidském těle vzniká ve střevě činností bakterie *Escherichia coli*. Kyselina se přirozeně vyskytuje například v houbách, špenátu, celých zrnech, melase dále pak v játrech, pivovarských kvasnicích. Nedostatek způsobuje zácpu, bolest hlavy, podrážděnost, předčasné stárnutí kůže nebo šednutí vlasů. Používána pro ochranu před slunečním zářením [20, 26, 27, 28].



Obrázek 3: 4-aminobenzoová kyselina

### 3.2.2 3,4-dihydroxybenzoová kyselina

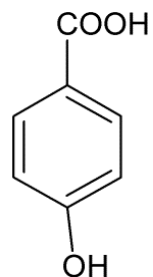
Také známá jako protokatechová nebo PCA. Vzniká oxidací adrenalinu. Přítomna v rostlinných produktech a pryskyřicích. Má schopnost uklízet volné radikály, chránit před chemickou karcinogenitou a před toxicitou vyvolávanou peroxidem vodíku. Pokusy byl prokázán silný protirakovinný účinek [20].



Obrázek 4: 3,4-dihydroxybenzoová kyselina

### 3.2.3 4-hydroxybenzoová kyselina

Také známá jako para-hydroxybenzoová. Přirozeně se vyskytuje například v Kokosovníku ořechoplodém, můžeme ji najít i ve víně nebo v zeleném čaji. Je prekurzorem koenzymu Q, ten přenáší elektrony v mitochondriích [29, 30].

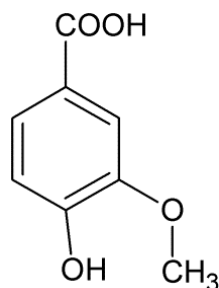


Obrázek 5: 4-hydroxybenzoová kyselina



### 3.2.4 Vanilinová kyselina

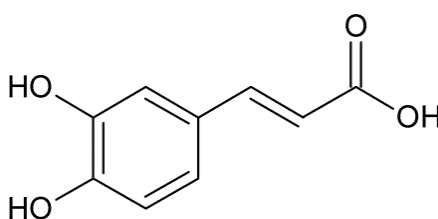
Jinak také 4-hydroxy-3-methoxybenzoová kyselina. Vzniká oxidací vanilinu. Stejně jako řada ostatních fenolových kyselin se i vanilinová kyselina vyskytuje například v ořechách, olejninách, obilovinách a bobulích, v různých druzích ovoce a zeleniny. Je součástí směsi sloučenin tvořící přírodní vanilku [29, 31].



Obrázek 6: Vanilová kyselina

### 3.2.5 Kávová kyselina

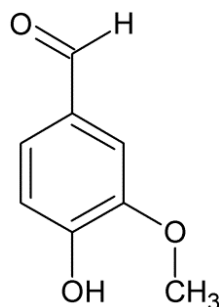
Jinak také kyselina 3-(3,4-dihydroxyfenyl)-2-propenová. Jde o hydroxyderivát kyseliny skořicové. Představuje meziprodukt při biosyntéze ligninu. Má antioxidační účinky. Chytá radikály hydroxylové, peroxidové, superoxidové a mnohé další. Přispívá k prevenci kardiovaskulárního onemocnění, chrání před rakovinou, má antibakteriální účinky a chrání DNA před poškozením. Široce se vyskytuje v rostlinných potravinách, zejména v olejninách, obilovinách a v různém ovoci a zelenině [20, 29].



Obrázek 7: Kávová kyselina

### 3.2.6 Vanilin

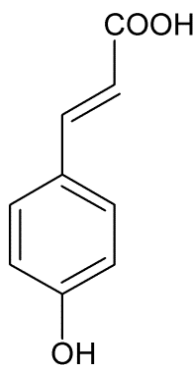
Znám také jako 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd. Představuje hlavní složku ve směsi sloučenin tvořící chuť a aroma vanilky. Hojně využití v potravinářství k ochucení jídel. Vanilin snižuje nádorové onemocnění tlustého střeva a potlačuje tvorbu bakterií [20, 31].



Obrázek 8: Vanilin

### 3.2.7 p-kumarová kyselina

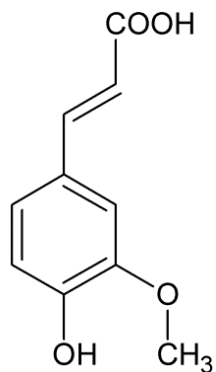
Také používáno označení 3-(4-hydroxyfenyl)-2-propenová kyselina. Představuje jeden z derivátů kyseliny skořicové, který je nejběžnější. Má antioxidační vlastnosti, snižuje riziko rakoviny žaludku snížením tvorby karcinogenních nitrosaminů. Obsažena v ovoci a zelenině [20].



Obrázek 9: p-kumarová kyselina

### 3.2.8 Ferulová kyselina

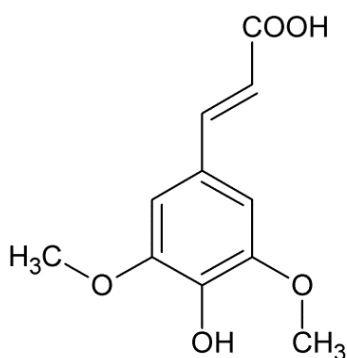
Jinak také 3-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2-propenová kyselina. Zabraňuje poškození kůže ultrafialovým zářením a tedy i rakovině kůže. Její antioxidační účinky inhibují reaktivní formy kyslíku. Používá se ke stabilizaci potravin obsahující tuky a oleje. Má antimikrobiální účinky, texturní vlastnosti, slouží k zachování křehkosti tepelně opracované zeleniny, má schopnost tvořit gely a gemy. Kyselina ferulová se přirozeně vyskytuje jako strukturální složka rostlin. Kyselina je dále obsažena ve vedlejších zemědělských produktech, jako jsou sláma, otruby, ve vyluhovaných řepných řízcích [20, 32].



Obrázek 10: Ferulová kyselina

### 3.2.9 Sinapová kyselina

Jedná se o ester kyseliny fenolové. Nachází se ve všech částech zralého ovoce, kdy její obsah stejně tak jako obsah ostatních derivátů kyseliny skořicové směrem od středu k vnějším vrstvám stoupá. Dále je možné ji nalézt v semenech řepky, kdy sloučeniny kyseliny sinapové zůstávají po extrakci oleje ve šrotu z řepky. Způsobují jeho ztmavnutí a hořkou chuť [22, 32].



Obrázek 11: Sinapová kyselina

## 4 EXTRAKČNÍ METODY

### 4.1 Extrakce

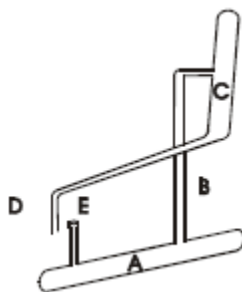
Extrakce představuje proces, jehož cílem je oddělení analytu od ostatních složek nebo oddělení nechtěných látek od analytu. Při separaci jsou v kontaktu dvě nemísitelné fáze. Analyty se pak rozdělují mezi tyto fáze na základě rozdílné rozpustnosti v jednotlivých rozpouštědlech [33].

Extrakti můžeme dělit [33]:

- 1) podle způsobu provedení
- 2) podle zúčastněných fází
- 3) podle charakteru extrahovaných látek

#### 4.1.1 Podle způsobu provedení

- Jednostupňová- Je ustanovena jedna rovnováha mezi fázemi, nejčastěji roztřepání v dělicí nálevce [34].
- Mnohostupňové- V oddělených krocích se ustavení jedné rovnováhy mnohokrát opakuje. Provádí se extrakce v zařízení podle Craiga nebo mnohonásobné roztřepání v dělicí nálevce. Při extrakci podle Craiga se extrahované látky a obě fáze dostávají otvorem E do extrakčního zařízení. Protřepávání pak probíhá v místě A, tím se fáze promíchají. Po nahnutí o 90° lehčí fáze přechází do trubice B a odtud do místa C. Vrácením potrubí do původní pozice přechází fáze do trubice D a odtud do místa E kde další člen již v prostoru A obsahuje těžší fázi [34].



Obrázek 12: Craigovo extrakční zařízení [34]

- Kontinuální- Při protiproudém pohybu jsou fáze neustále se dotýkající. Provádí se extrakce v Soxhletově extraktoru.

Papírová extrakční patrona je vkládána do střední části přístroje (3). Válcová patrona s kulatým dnem je naplněna vzorkem. Složku, která je oddělena pomocí vhodného rozpouštědla, které je nalito do baňky (2). Rozpouštědlo je přivedeno k bodu jeho varu, stoupající páry putují postraní trubičkou přes střední část extraktoru do chladiče a kondenzují. Vzorek obsažený v papírové patroně je skrápěn rozpouštědlem. Střední část extraktoru spolu s přepadovou trubičkou je postupně zaplněna zkondenzovaným rozpouštědlem. Pokud hladina překročí horní část přepadové trubičky, přeteče do destilační baňky a zde je rozpouštědlo znovu destilováno. Na konci je získán v destilační baňce roztok o jedné či více složkách a po ukončení extrakce je z ní rozpouštědlo vydestilováno. V baňce zůstává jen složka, která byla izolována [34].



Obrázek 13: Soxhletův extraktor [34].

#### 4.1.2 Podle zúčastněných fází

- plyn-kapalina (GLE, Gas-Liquid Extraction)- těkavé látky jsou extrahovány plynem z kapalného vzorku. V plynové chromatografii se používá pro nalconcentrování těkavých složek vzorku [34].
- kapalina-kapalina (LLE, Liquid-Liquid Extraction)- nejdůležitější s analytického hlediska, ale dnes vytlačována extrakcí tuhou fází [34].

- kapalina-pevná látka (LSE, Liquid-Solid Extraction)- Extrahují se za pomoci organického rozpouštědla tuhé organické materiály. Anorganické soli rozpustné se extrahují z tavenin za pomoci horké vody [34].

#### 4.1.3 Podle charakteru extrahovaných látek

- extrakce organických látek [34]
- extrakce kovových chalátů [34]
- extrakce iontových asociátů [34]

## 4.2 Extrakční metody pro izolaci fenolických látek

### 4.2.1 Extrakce kapalina-pevná látka (LSE, Liquid-Solid Extraction)

Dochází k převedení analytů z pevného vzorku do roztoku a to pomocí rozpouštědla.

Pevné vzorky jsou krájeny, drceny, mlety, homogenizovány či roztírány s pískem. Mazlavé vzorky jsou roztírány, mlety nebo homogenizovány s kapalným dusíkem za použití vymrazovacích mlýnků či homogenizovány se suchým ledem [35, 36].

Účelem úpravy vzorků je zabezpečit co největší plochu, protože čím menší částice, tím více je usnadněn průběh extrakce. Jako další úprava vzorku je prováděno stanovení vlhkosti a případné odstranění vody ze vzorku. Při realizaci této extrakce je třeba zabezpečit dobrý kontakt mezi fázemi (přenos hmoty) [35, 36].

*Vyluhování s nuceným tokem (Forced-Flow Leaching)*- Ocelová kolona je naplněna vzorkem, tou je následně pumpováno extrakční rozpouštědlo, a to za zvýšeného tlaku a při záhřevu k bodu varu rozpouštědla. Jedná se o velmi rychlou metodu [35, 36].

*Soxhletova extrakce*- Do Soxhletovy extrakční patrony je umístěn pevný vzorek upraven na co nejmenší částice. Soxhletovu extrakční patronu představuje tvrzený filtrační papír nebo sklo s fritou místo dna. Patrona je následně umístěna do Soxhletovy aparatury. Do baňky je nalito vhodné rozpouštědlo. Po záhřevu baňky na bod varu rozpouštědla, páry stoupají postraní trubičkou kolem střední části extraktoru k chladiči a dochází ke kondenzaci rozpouštědla. Rozpouštědlo kape na vzorek a vymývá z něj analyty. Zkondenzované rozpouštědlo zaplňuje střední část extraktoru společně s postraní přepadovou trubkou, pokud hladina ve střední části přesáhne horní část přepadové trubky, přeteče roztok do destilační baňky. Dochází k opětovnému odpaření. Tento děj se opakuje v několika cyklech po určitou dobu.

Výsledkem je roztok jedné či více složek obsažený v destilační baňce. Po ukončení extrakce je třeba vydestilovat rozpouštědlo, aby v baňce zůstaly jen izolované složky. Maximální teplota extrakce je omezena bodem varu rozpouštědla, z důvodu zachování stability analytů. Metoda popsaná jednou již výše je velmi pomalá, za to vysoce účinná, nenáročná a levná [35, 36].

#### **4.2.2 Extrakce podporová mikrovlnným ohřevem (MASE, Microwave Assisted Solvent Extraction)**

Při této extrakci je používáno mikrovln k ohřevu rozpouštědla nebo složek matrice. Na typu a teplotě rozpouštědla je závislá doba extrakce. Používanou frekvencí je 2450 MHz. V průběhu extrakce je vzorek zahříván a promícháván. Použití této metody je vhodné pouze pro termostabilní sloučeniny z důvodu zvýšené teploty. Je použito polárního rozpouštědla, jak bylo výše popsáno, nepolární rozpouštědla by nebyla mikrovlnami ohřívána, i když je možný i tento způsob. Použití extrakčního rozpouštědla s vysokou dielektrickou konstantou, které silně absorbuje mikrovlny a které je umístěno v extrakční nádobě neabsorbující mikrovlny. Dochází k dipólové rotaci, to je že molekuly s vysokou dielektrickou konstantou se pokoušejí o zorientování se v elektrickém poli, pole se ale mění příliš rychle a proto molekuly vibrují. Sousední molekuly do sebe narážejí, vzniká tření a tím jsou molekuly zahřívány. Další možností je použití extrakčního rozpouštědla s nízkou dielektrickou konstantou, tedy rozpouštědlo neabsorbující mikrovlny a použití otevřené nádoby neabsorbující mikrovlny. Pokud vzorek v tomto případě obsahuje složky s vysokou dielektrickou konstantou (voda atd.) tak on absorbuje mikrovlny. Místní ohřátí zapříčiní, že složky vzorku jsou extrahovány do chladného rozpouštědla v okolí. MASE představuje úspornější, rychlejší a efektivnější metodu než je Soxhletova extrakce [35, 37, 38].

#### **4.2.3 Zrychlená extrakce rozpouštědlem (ASE, Accelerated Solvent Extraction nebo také PLE, Pressurised Liquid Extraction- kapalinové extrakce podporovaná tlakem)**

Jedná se o extrakční metodu pevná látka-kapalina. Je to rychlá extrakce, přibližně 5 až 15 minut, za použití zvýšené teploty 40 až 200 °C a za zvýšeného tlaku 10 až 15 MPa. Do nerezové patrony je vložen pevný vzorek, ten je extrahován organickým rozpouštědlem nebo vodným roztokem za zvýšené teploty a tlaku. Pomocí stlačeného dusíku je extrakt vytlačen do sběrné nádoby. Významnými faktory v extrakci je teplota, tlak a výběr vhod-

ného rozpouštědla. Vyšší teplota je významná z hlediska rychlého provedení extrakce analytu z pevné matrice. Teplota zlepšuje i rozpouštění rozpouštědla a snižuje jeho viskozitu, tím je umožněn lepší průchod do částic matrice. Zvýšený tlak pak udržuje rozpouštědlo v kapalném stavu i za vyšší teploty a je zatlačováno do pórů matrice vzorku [39].

#### 4.2.4 Superkritická fluidní extrakce (SFE, Supercritical Fluid Extraction)

Používají se tzv. superkritické tekutiny, kdy je nejčastěji používáno CO<sub>2</sub> v superkritickém stavu (nízké hodnoty kritických veličin 31°C, 7,3 MPa). CO<sub>2</sub> má vlastnosti kapaliny i plynu, což umožňuje rychlou extrakci. Hustotou je blízký kapalinám, má tedy dobré rozpouštěcí vlastnosti a difúzní konstanta blízká plynům, což umožňuje rychlý přesun hmoty. Superkritických tekutin je využíváno kvůli jejich zajímavým vlastnostem, jako je vysoká hustota či vysoká rozpouštěcí schopnost. Usměrněním tlaku a teploty je možné měnit sílu a hustotu nadkritické kapaliny. Díky tomu získáváme kapalinu s vlastnostmi organického rozpouštědla, což lze velmi dobře využít k extrakci. Nadkritický CO<sub>2</sub> je schopen rozpustit širokou škálu látek za pomoci kombinace tlaku, teploty a modifikátoru (nejčastěji metanol). Metoda náročná na technické provedení, jako je použití vyššího tlaku v nadkritickém stavu. K extrakci dochází v cartridge, což je jakési pouzdro s restriktorem (omezovač průtoku). Celkově se jedná o rychlou metodu, cenově nenáročnou a šetrnou metodu [39, 40].

#### 4.2.5 Extrakce ultrazvukem

Při extrakci rostlinných složek působením ultrazvukových vln na membrány a buněčné stěny dochází k průběžnému vytváření bublinek páry uvnitř i vně buňky. Tím dojde ke zlepšení přechodu extrahované látky ven z buňky a přechodu rozpouštědla dovnitř buňky.

Při extrakci ultrazvukem je využíváno ultrazvukové lázně s frekvencí okolo 40 Hz, výkonem okolo 70 W. Vytemperovat lze danou lázeň na jakoukoli potřebnou teplotu. Vzorek smíchaný s rozpouštědlem v uzavřené baňce je vložen do vytemperované lázně na určitou potřebnou dobu. Baňka je zajištěna pomocí kovových drátů, aby se nepohybovala po lázni. Po zapnutí lázně je ponechána baňka působení ultrazvuku na potřebnou dobu (řádově desítky minut ale i déle). Ultrazvuk svými účinky způsobuje rozrušení buněk, a tím je umožněn lepší průnik rozpouštědla do pevné matrice [41, 42].



#### 4.2.6 Extrakce stlačenou kapalnou horkou vodou (PHWE- Pressurized Hot Water Extraction)

Tradičně není voda považována za vhodné extrahovadlo při pokojové teplotě. Je využívána stlačená voda za zvýšené teploty a za řízených změn tlaku. Organické rozpouštědlo je nahrazeno vodou. Termínem stlačená horká voda též subkritická voda, je míněno oblast kondenzované fáze vody v teplotním rozmezí od 100 °C, což je normální bod varu vody, do 374 °C, což je kritický bod vody. V případě, že je zvyšována teplota a tlak, mění se fyzikálně-chemické vlastnosti vody. Se zvyšující se teplotou dochází především ke změně dielektrické konstanty vody a voda se následně začne chovat jako organické rozpouštědlo. Je třeba však udržet vodu v kapalném stavu, a to pomocí tlaku, který musí být při extrakci vyšší než tlak nasycených par vody při použité teplotě [43].

#### 4.2.7 Enzymatická hydrolýza

Musí být provedena extrakce homogenizovaného vzorku pomocí 96 % etanolu, následuje odpaření pod vakuem. Dalším krokem je vyluhování acetátovým pufrům, který obsahuje beta-glukosidázu a beta-glukoronidázu/sulfatázu. Poté necháno inkubovat a následně centrifugovat. Jedná se o velmi šetrnou metodu [39].

#### 4.2.8 Extrakce tuhou fází (SPE, Solid-Phase Extraction)

Na pevné fázi umístěné v krátké koloně tzv. cartridge je zadržována skupina látek. Pevná fáze je ve formě sloupce nebo membrány. Pomocí této extrakce jsou získány žádané látky z kapalného vzorku nebo jsou odděleny žádané látky od nechtěných. Tato extrakce je složena z pěti kroků [33, 34].

Prvním krokem je předúprava kolony, a to propláchnutím rozpouštědlem (metanol), tím je aktivována pevná fáze, aby docházelo ke vzájemnému působení se vzorkem. Následně je kolona propláchnuta rozpouštědlem (voda) podobným vzorku, tím je upraveno prostředí pro vzorek. Samotný vzorek je v podobě vodného roztoku [33, 34].

Druhým krokem je promývání kolony odpovídajícím rozpouštědlem což způsobuje vymytí zbytků matrice vzorku z kolony. Na pevné fázi pak bývají zachyceny žádané látky. Následující krok je sušení, kdy je kolona sušena proudem inertního plynu konkrétně dusíkem a to v případě pokud se eluční rozpouštědlo liší výrazným způsobem od promývacího roztoku. Posledním krokem je eluce, kdy je elučním činidlem promývána kolona. Čistá látka je vy-

myta a nežádoucí látky zůstávají sorbovány na koloně. Eluát je zachytáván a podroben další analýze [33, 34].

#### 4.2.9 Třepání

Je prováděno na třepačkách. Používány jsou různé orbitální nebo překlápěcí třepačky. Díky třepání je zabezpečen dostatečný kontakt mezi vzorkem a rozpouštědlem a dochází k přechodu hmoty. Dělená látka přechází z pevné fáze do kapalné fáze. Je třeba zajistit, aby dělená látka rychle přešla z jedné fáze do druhé, což souvisí se styčnou plochou jednotlivých fází. Je proto třeba tuto plochu co nejvíce zvětšit [35, 44].

#### 4.2.10 Působení teploty

Další možností extrakce, je nechat působit různé teploty na směs vzorku a rozpouštědla. Teplota je zajišťována pomocí vodních lázní či kynáren, nižší teploty jsou zajišťovány pomocí chladicího zařízení [45].

Se zvyšující se teplotou se zvyšuje i kinetická energie a dochází i ke zvýšení rychlosti pohybu částic. Tím se zvyšuje i pravděpodobnost srážek těchto částic a tedy i rychlost chemické reakce. Z toho vyplývá, že se zvyšující se teplotou roste rychlost chemické reakce.

Bylo prokázáno pomocí experimentů, že při zvýšení teploty o 10 °C je rychlost většiny chemických reakcí zvýšena dvojnásobně a někdy až čtyřnásobně [45].

V důsledku vyšší teploty narůstá efektivita extrakce. Zvyšuje se tedy uvolňování látek z extrahovaného materiálu [45].

## 5 CHROMATOGRRAFIE

Představuje jednu z nejdůležitějších analytických metod. S její pomocí je možné stanovení, dělení a identifikace velkého množství organických i anorganických látek. Význam této metody neustále roste. Důvodem je právě schopnost této metody analyzovat řadu látek z nejrůznějších přírodních a technických směsí. Získáváme výsledky od desítek procent do stotisícin procenta a relativní molekulovou hmotnost od stovky do několika desítek i stovek tisíc. Základem chromatografie je, že dochází k postupnému několikrát se opakujícímu rovnovážnému rozdělení látek mezi dvě i více fází. Fáze *stacionární* je umístěna v koloně, druhá fáze *mobilní* unáší separované látky. Stacionární fáze má několik podob, buď jde o tuhé částičky, nebo o kapalinu umístěnou na inertním nosiči. Mobilní fáze může být kapalná nebo plynná. Pokud se setká stacionární a mobilní fáze s oddělovanými látkami dochází k interakcím. Tyto interakce jsou předpokladem úspěšné separace látek. Při nástřiku směsi složek do kolony se vytvoří eluční pás, který obsahuje obě látky dohromady. Mobilní fáze tuto směs látek unáší rozdílnou rychlostí a na koloně, která obsahuje sorbent, dochází k rozdělení látek. Rozdílná rychlost pohybu jednotlivých látek je související s jejich afinitou k fázi. V případě vysoké afinity látky k mobilní fázi putuje tato látka rychleji než látka s nižší afinitou. Naopak pokud je afinita látky vysoká ke stacionární fázi látka je ve stacionární fázi déle zdržována a pohybuje se tedy pomaleji. Detektor po výstupu první látky zaznamená její přítomnost v eluátu a je zaznačen eluční pík, tedy křivka. Po výstupu druhé látky je zaznamenán druhý eluční pík.

Při dělení se nejčastěji mluví o chromatografii kapalinové a plynové [36, 46].

### 5.1 Kapalinová chromatografie

Slouží k dělení všech organických méně těkavých kapalných i tuhých látek. Tyto látky jsou rozpustné v běžných organických rozpouštědlech, ve vodě a ve zředěných minerálních kyselinách. Mobilní fáze je zde v kapalném stavu. Výhoda kapalinové chromatografie je možnost využití všech vratných dvoufázových separačních mechanismů, to je adsorpce, chemisorpce, iontová výměna, rozdělování mezi dvě nemísitelné kapaliny. Tato široká škála mechanismů umožňuje nalézt chromatografický systém pro dosažení nutného rozlišení [36].

### 5.1.1 HPLC (High performance liquid chromatography)

Jedná se o pokročilou a instrumentálně náročnou metodu [36, 47].

Kolona je délky přibližně 0,5 m, průměru 2 cm, dole zakončena fritou a kohoutem zrnitým sorbentem. Jako sorbent je použit například oxid hlinitý, který představuje stacionární fázi. Vzorek je dávkován do této kolony na horní vrstvu náplně, následně je přidána mobilní kapalná fáze. Jak postupuje mobilní fáze kolonou, dochází k oddělování složek vzorku, které v rozdílných časech opouštějí spodní část kolony. Mobilní fáze je dodávána pomocí vysokotlakého čerpadla. Mobilní fázi představuje rozpouštědlo. Aby separace byla účinná, je třeba použít co nejmenších zrníček sorbentu, která kladou odpor protékající kapalině. K čerpání kapaliny do kolony je používáno pístových nebo membránových čerpadel. Dávkování vzorku je prováděno buď injekčně přes pryžové septum, ale pouze do tlaku 10 MPa nebo dávkování obtokovým dávkovacím kohoutem, což je výhodnější. Dávkovací kohout dokáže nadávkovat proti tlaku až 60 MPa. Kolony voleny náplňové, vyrobeny z tlustého borosilikátového skla vhodné pro nižší tlak nebo ocelové pro vysoký tlak. Délka kolony se pohybuje od 5 do 50 cm. Čím menší je částice sorbentu, tím kratší kolona je použita. Používanými detektory je fotometrický, refraktometrický, fluorimetrický, FTIR detektor, elektrochemické a hmotnostní [36, 47].

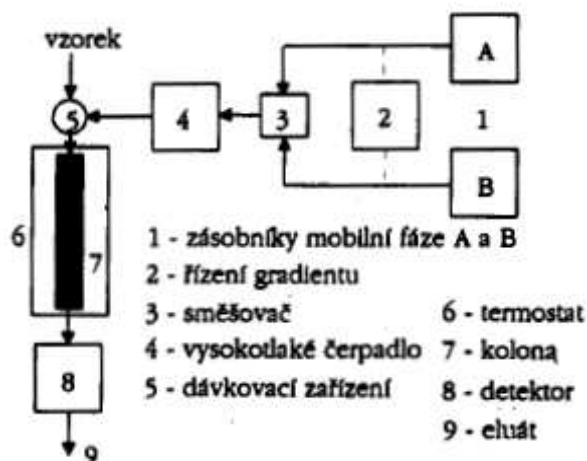
*Fotometrický detektor*- nejčastěji používané, slouží k měření absorbance mobilní fáze vycházející z kolony. Je potřebné zajistit pro optimální citlivost detektoru vhodnou absorpční dráhu průtokové kyvety, kterou prochází paprsek absorbovaného záření. Jednodušší detektory měří při jedné vlnové délce a v ultrafialové oblasti. Složitější detektory umožňují pomocí monochromátoru nastavení vlnové délky. Citlivost detektoru je pro různé látky rozdílná [47].

*Refraktometrický detektor*- měří rozdíly mezi čistou mobilní fází a indexem lomu eluátu. V případě, že eluát obsahuje po výstupu nějakou složku, ukáže se výchylka. Tento detektor je považován za univerzální, není moc citlivý a při jeho použití je nutné dodržet konstantní teplotu [47].

*Fluorimetrický detektor*- funguje na principu fluorescence, tedy o schopnost látek absorbovat ultrafialové záření a pak následně vyzařovat záření o vyšší vlnové délce. Toto záření je měřeno fotonásobičem kolmo na směr vstupujícího záření. Detektor je vysoce citlivý a selektivní. Vhodné je tento detektor kombinovat s detektorem fotometrickým [47].

*FTIR detektor*- zpracovává infračervená spektra složek v mobilní fázi. Jedná se o univerzální detektor [47].

*Elektrochemické detektory (ECD)*- patří sem vodivostní a voltametrické. Použití na roztoky obsahující ionty. Jedná se o selektivní detektory [47].



Obrázek 14: HPLC [47]

Ke stanovení fenolických látek je často používána vysokoúčinná kapalinová chromatografie s *Coulometrických detektorem*. Jedná se o velmi citlivý způsob detekce s elektrodovým polem. Využívána je série čtyř až šestnácti průtočných coulometrických cel. V těchto celách potom dochází k elektrochemické přeměně analytu. Na každou celu je vložen odlišný potenciál, který je ale konstantní. Každá látka je poté oxidována či redukována při odlišném potenciálu. Tento potenciál je následně nazýván dominantním potenciálem. Látky jsou charakterizovány na základě poměru odezvy signálu velkého počtu kanálů [18].

Dalším používaným detektorem je *UV/VIS detektor*. Principem těchto detektorů je absorpce záření v oblasti 190-800 nm vlnové délky. Kvantitativní vyhodnocení je založeno na Lambert-Beerově zákoně. Ten vyjadřuje vztah mezi tloušťkou absorbující vrstvy, koncentrací absorbující složky a vlastní velikostí absorpce. To je vyjádřeno jako absorbance, to je, kolik světla bylo pohlceno měřeným vzorkem [48].

Rozlišují se čtyři typy těchto detektorů podle konstrukčního typu [48]:

- Detektory s fixní vlnovou délkou, která je nejčastěji 253,7 nm, ty používají nejčastěji nízkotlakou rtuťovou výbojku jako zdroj záření.
- Detektory s měnitelnou vlnovou délkou, pouze s předem danými vlnovými délkami.

- Detektory s programovatelnou vlnovou délkou, kdy lze nastavit vlnovou délku v daných rozmezích, a to nejčastěji 190-700 nm. Během analýzy je vlnová délka měnitelná. Jsou nabízeny i detektory, které jsou schopny měřit při dvou až čtyřech vlnových délkách současně. Mají však nižší citlivost, což představuje jejich nevýhodu.
- Detektory diodového pole (photodiode-array, PDA, DAD) dokážou snímat celé spektrum bez přerušení chromatografické separace, a to vše v reálném čase.



Obrázek 15: Chromatograf LC -20 AD (Schimadzu) [49]



Obrázek 16: Detektor UV/VIS SPD-20 A [49]



Obrázek 17: Autosampler SIL-20AC [49]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 6 CÍL PRÁCE

V teoretické části diplomové práce bylo cílem popsat výskyt stanovovaných fenolických látek v potravinách, charakterizovat jednotlivé extrakční metody pro izolaci fenolických látek a popsat metodu, která byla použita ke stanovení jednotlivých fenolických látek.

V praktické části diplomové práce bylo cílem vybrat nejvhodnější extrakční metodu pro izolaci fenolických látek a změřit jejich obsah pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie.

## 7 MATERIÁL A METODIKA

### 7.1 Analyzovaný vzorek

K analýze byl použit vzorek moučka jaderka, což je světle hnědý prášek, který byl získán pomletím směsi semínek z révy vinné. Moučka ze semínek révy vinné je bohatá na přírodní antioxidanty.

Vzorek byl dovezen z BJ VITIS Březí u Mikulova.

### 7.2 Použité chemikálie

- Metanol pro HPLC ( $\geq 99,9\%$ , SIGMA-ALDRICH Co., Germany)
- Dusík plynný 5.0 (čistota 99,999%)
- Kyselina fosforečná ( $\geq 85\%$ , SIGMA-ALDRICH Co., Germany)
- Standardy: Výrobce SIGMA-ALDRICH
  - 4-aminobenzoová kyselina
  - 3,4-dihydroxybenzoová kyselina
  - 4-hydroxybenzoová kyselina
  - vanilinová kyselina
  - vanilin
  - kávová kyselina
  - p-kumarová kyselina
  - ferulová kyselina
  - sinapová kyselina

### 7.3 Přístroje a zařízení

- HPLC (Schimadzu, LC-20 AD):
  - SPD-20 AD (UV/VIS detektor pro 254 nm a 313 nm, Schimadzu)
  - SIL-20 AC<sub>HT</sub> (autosampler, Schimadzu)

- maximální tlak 35 MPa
- kolona: Supelcosil<sup>TM</sup> LC-18, výrobce: Sigma-Aldrich, (Belefore, USA), rozměry: 25 cm x 4,6 mm x 5 $\mu$ l
- průtok mobilní fáze při analýze 1 ml za minutu
- ultrazvuk (KRAINTEK 2, Galik design)
- vodní lázeň vyhřívána na 30 °C (Heidoph, Laborota 4010 digital)
- vodní lázeň vyhřívána na 50 °C (PolyScience)
- kynárna vyhřívána na 40 °C (INCU-Line, VWR)
- lednice 4 °C (ELEKTROLUX, Intuition SpacePlus)
- vyhodnocovací program LC Solution, Shimadzu
- mikropipeta (100-1000  $\mu$ l, TreffLab, Transferpette S)
- pipeta skleněná ( objem10 ml)
- váhy analytické (LABICOM GR-200, AND, max. 210 g, min. 10 mg)
- stříkačkové filtry (LUT Syringe filters nylon, 13 mm, 0,22  $\mu$ m)
- vialky skleněné (objem 20 ml)

## 7.4 Postup práce

Pro extrakci fenolových kyselin z rostlinného vzorku pevného charakteru bylo použito rozpouštědlo metanol (100%). Vzorek s rozpouštědlem byl vystaven působení několika teplot po různý čas. Používanými teplotami byly 4°C, 20°C, 30°C, 40°C a 50°C a používanými časy byla 1 hodina, 8 hodin a 24 hodin. Po ponechání působení vlivů na vzorek byl vždy v uvedený čas proveden odběr vzorku. Stanovení fenolických látek bylo pak provedeno metodou HPLC s UV/VIS detektorem. Měřeno bylo při vlnové délce 254 nm a 313 nm.

Po vyhodnocení chromatogramů byla zjištěna nejideálnější teplota pro extrakci fenolových látek. Následně byla zjištěná teplota použita k extrakci vzorku opět s rozpouštědlem za současného působení ultrazvuku po různě dlouhou dobu.

#### 7.4.1 Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze A byla připravena ze 745 ml vody, 245 ml metanolu (100%) a 10 ml kyseliny fosforečné (85%). Vše bylo smícháno a přefiltrováno. Přefiltrovaná mobilní fáze byla ponechána probublávat dusíkem po dobu 10 minut. Posledním krokem bylo ponechání působení ultrazvuku na mobilní fázi, a to při 20 °C 5 minut.

Mobilní fázi B tvoří 200 ml metanolu (100%), ten byl probublán dusíkem po dobu 10 minut a byl na něj nechán působit ultrazvuk po dobu 5 minut při 20 °C.

#### 7.4.2 Extrakce rozpouštědlem za působení teploty a času

Základem bylo navážení 0,75 g vzorku do skleněných vialek o objemu 20 ml na analytických vahách. K vzorku bylo přidáno 15 ml extrakčního činidla tedy metanolu (100%) pomocí pipety. Celkem bylo takto připraveno 15 vzorků. Tyto vzorky pak byly vystaveny pěti různým teplotám, a to 4 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C a 50 °C, po dobu 1 hodiny, 8 hodin a 24 hodin. Vzorky, jež měly být umístěny při teplotě 4 °C, byly uloženy do lednice. Vzorky při 20 °C byly uloženy volně v laboratoři. Vzorky při 30 a 50 °C byly umístěny ve vodních lázních vytemperovaných na dané teploty a vzorky při 40 °C byly umístěny do vyhřáté kyanárně.

Po uplynutí jednotlivých časů byly odebírány vzorky z daných teplot, které byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr o porózitě 0,22 µm. Přefiltrovaný extrakt byl pak podroben HPLC analýze. Při vlnové délce 254 nm bylo zjišťováno, zda je přítomna kyselina 4-aminobenzoová, 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, vanilinová, kávová a vanilin. Při 313 nm bylo zjišťováno, zda je přítomna kyselina p-kumarová, ferulová a sinapová. Po vyhodnocení chromatogramů byla zvolena společná neideálnější teplota pro extrakci fenolických látek.

#### 7.4.3 Extrakce rozpouštědlem za působení 50 °C, ultrazvuku a času

Nejideálnější teplota, která převažovala u většiny detekovaných fenolických látek v předchozím pokusu, byla 50 °C. Při této teplotě bylo vyextrahováno nejvíce z každé detekované fenolické látky. S touto teplotou bylo dále pracováno.

Bylo naváženo 0,75 g vzorku na analytických vahách do skleněných vialek o objemu 20 ml. K vzorku bylo vždy přidáno 15 ml metanolu (100%) jako extrakčního činidla. Takto byly připraveny 3 vzorky. Vzorky byly vystaveny působení teploty 50 °C a působení ultrazvuku po dobu 1 hodiny, 8 hodin a 24 hodin. V uvedené časy byly provedeny odběry.

Odebraný extrakt byl přefiltrován přes stříkačkový filtr o porózitě 0,22  $\mu\text{m}$  a dán k HPLC analýze. Bylo zjišťováno, zda je přítomná kyselina 4-aminobenzoová, 3,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, vanilinová, kávová a vanilin při vlnové délce 254 nm. Dále bylo zjišťováno, zda je přítomna kyselina p-kumarová, ferulová a sinapová při vlnové délce 313 nm. Následně byl hodnocen vliv ultrazvuku.

#### 7.4.4 Kalibrační křivky standardů

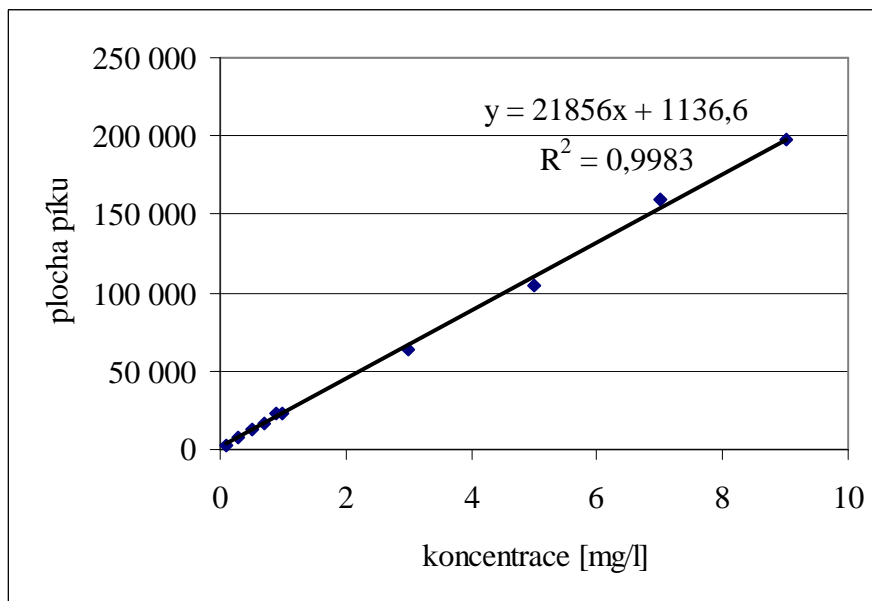
Pro vyhodnocení detekovaných látek po HPLC analýze byly použity kalibrační křivky standardů. Byl použit standard kyseliny 4-aminobenzoové, kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové, kyseliny 4-hydroxybenzoové, kyseliny vanilinové, kyseliny kávové, vanilinu, kyseliny p-kumarové, kyseliny ferulové a kyseliny sinapové. Standardní látky byly o koncentracích 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1; 3; 5; 7; a 9 mg/l, následovalo jejich změření na HPLC přístroji. Po vytvoření kalibračních křivek změřených standardů byla přidána spojnice trendů každé látky a zobrazena rovnice regrese a hodnota spolehlivosti. Plochy píků a koncentrace, ze kterých byla kalibrační křivka každé standardní látky vytvořena, se nacházejí v příloze P 1.

Rovnice regrese každé standardní látky byla použita k spočítání koncentrací detekovaných látek.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

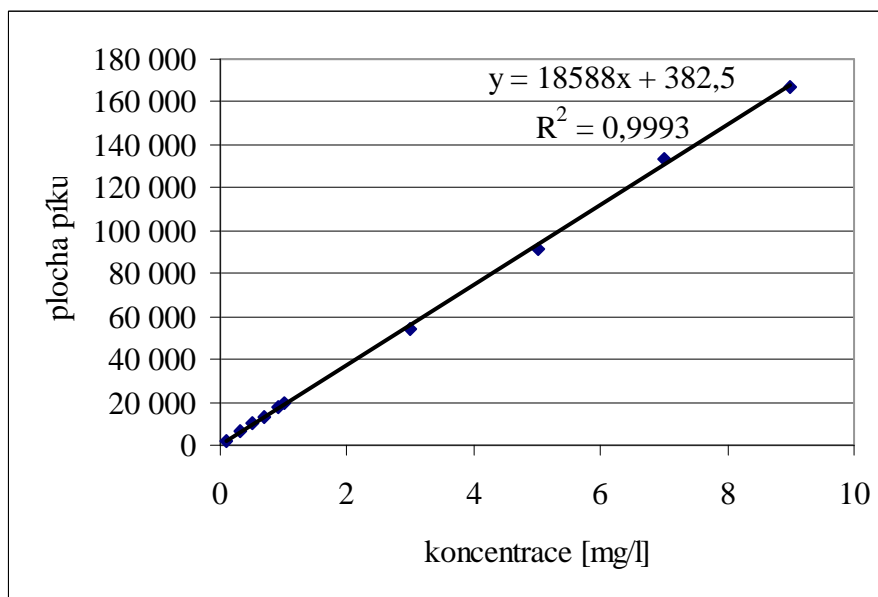
### 8.1 Kalibrační křivky standardních látek

#### 8.1.1 Kalibrační křivka kyseliny 4-aminobenzoové



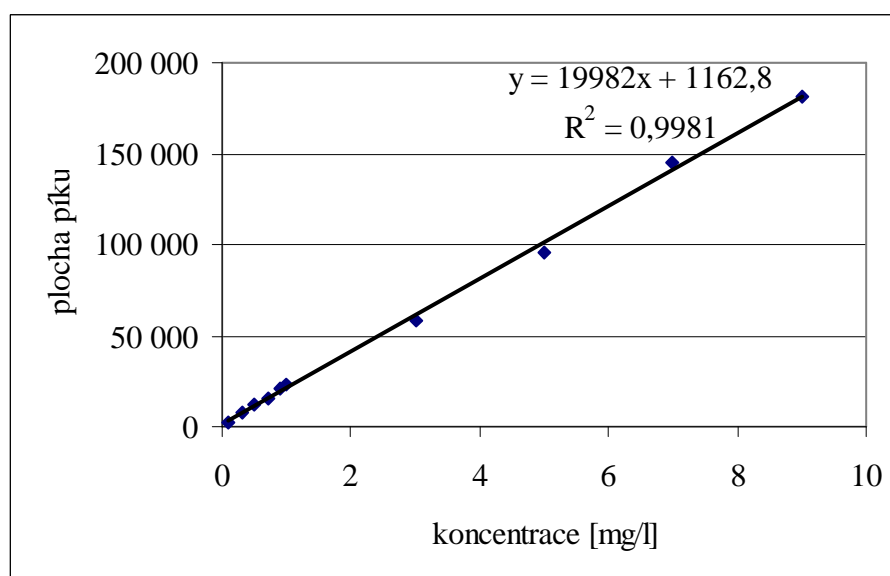
Obrázek 18: Kalibrační křivka kyseliny 4-aminobenzoové

### 8.1.2 Kalibrační křivka kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové



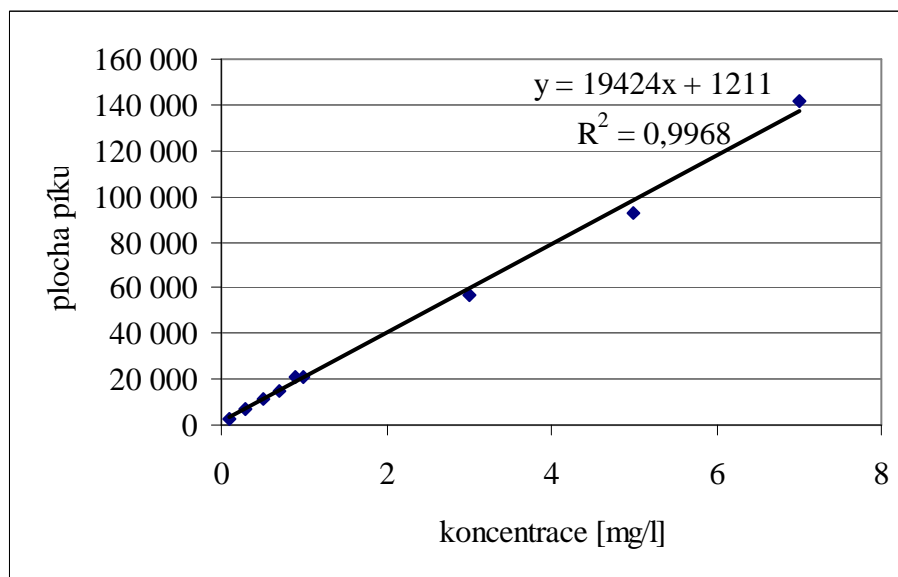
Obrázek 19: Kalibrační křivka kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové

### 8.1.3 Kalibrační křivka kyseliny 4-hydroxybenzoové



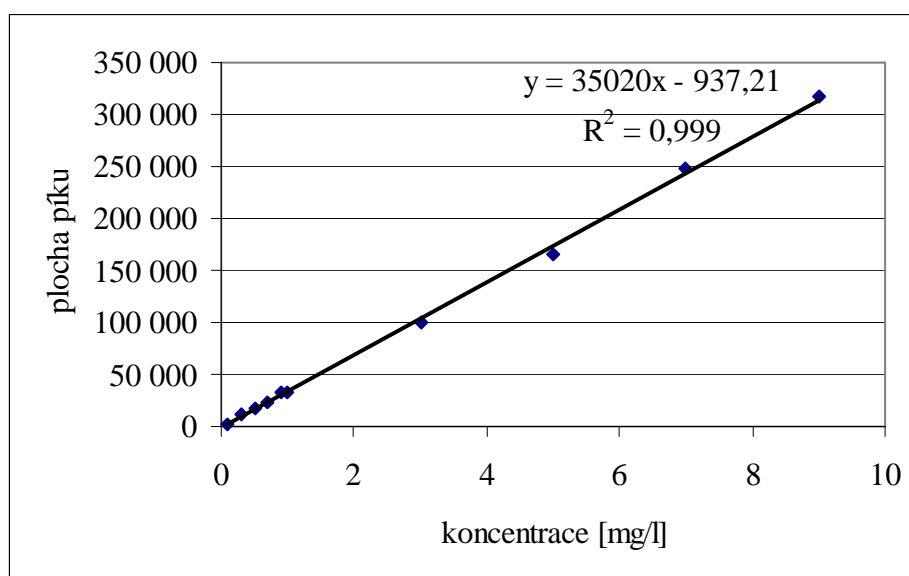
Obrázek 20: Kalibrační křivka kyseliny 4-hydroxybenzoové

#### 8.1.4 Kalibrační křivka kyseliny vanilinové



Obrázek 21: Kalibrační křivka kyseliny vanilinové

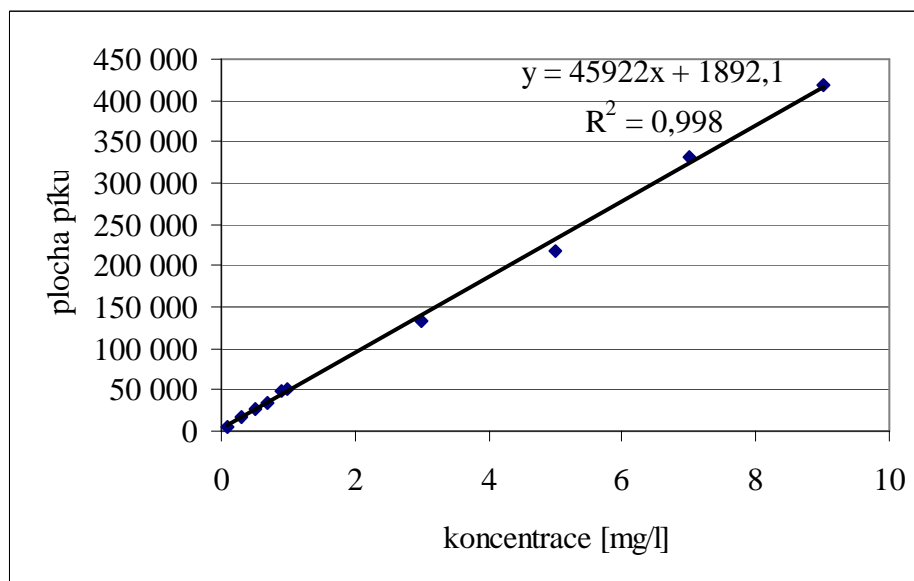
#### 8.1.5 Kalibrační křivka kyseliny kávové



Obrázek 22: Kalibrační křivka kyseliny kávové

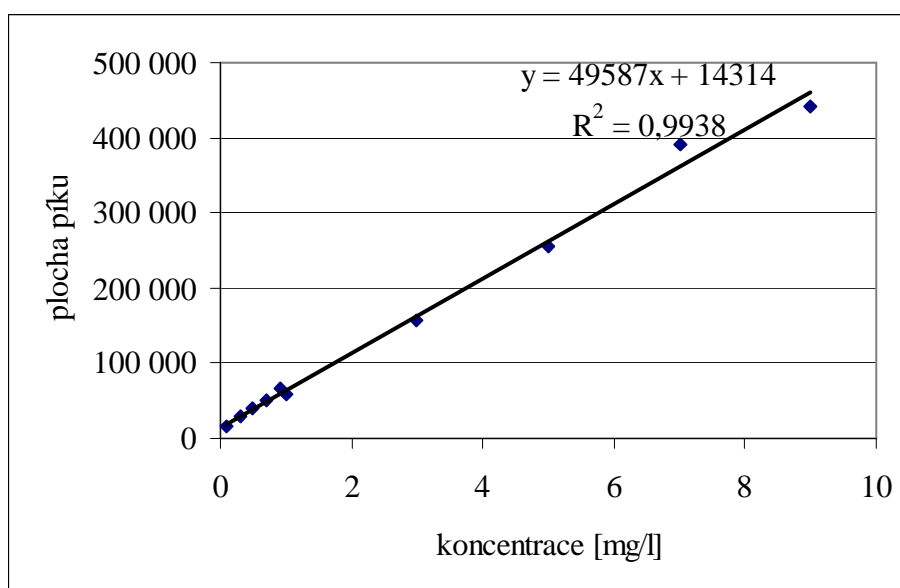


### 8.1.6 Kalibrační křivka vanilinu



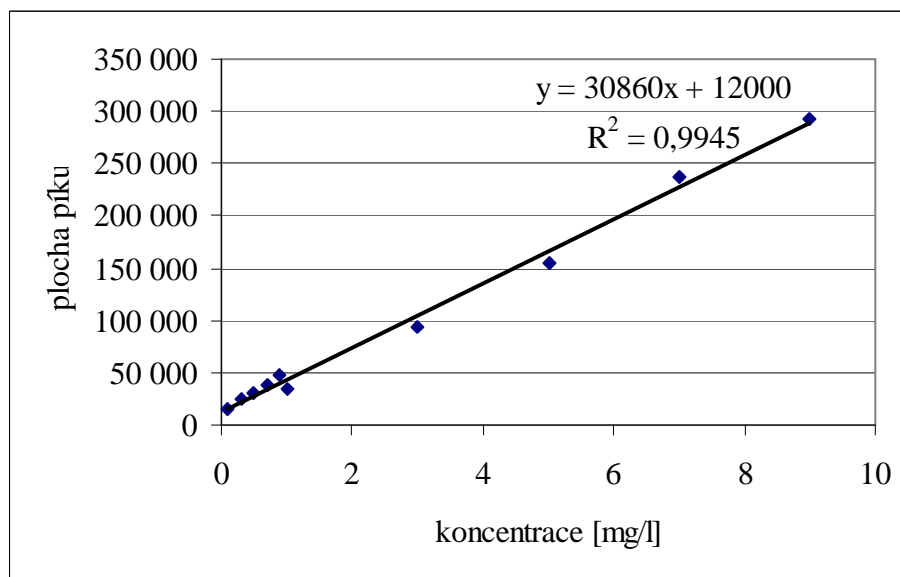
Obrázek 23: Kalibrační křivka vanilinu

### 8.1.7 Kalibrační křivka kyseliny p-kumarové



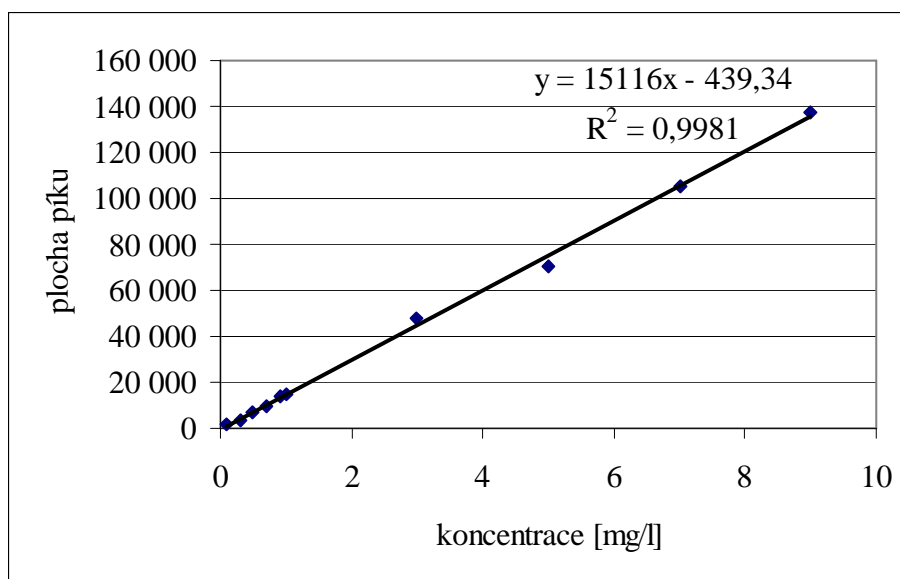
Obrázek 24: Kalibrační křivka kyseliny p-kumarové

### 8.1.8 Kalibrační křivka kyseliny ferulové



Obrázek 25: Kalibrační křivka kyseliny ferulové

### 8.1.9 Kalibrační křivka kyseliny sinapové



Obrázek 26: Kalibrační křivka kyseliny sinapové

## **8.2 Stanovení fenolových kyselin v rostlinném materiálu metodou HPLC-UV-VIS**

### **8.2.1 Stanovení fenolových kyselin po extrakci rozpouštědlem za působení teplot a časů**

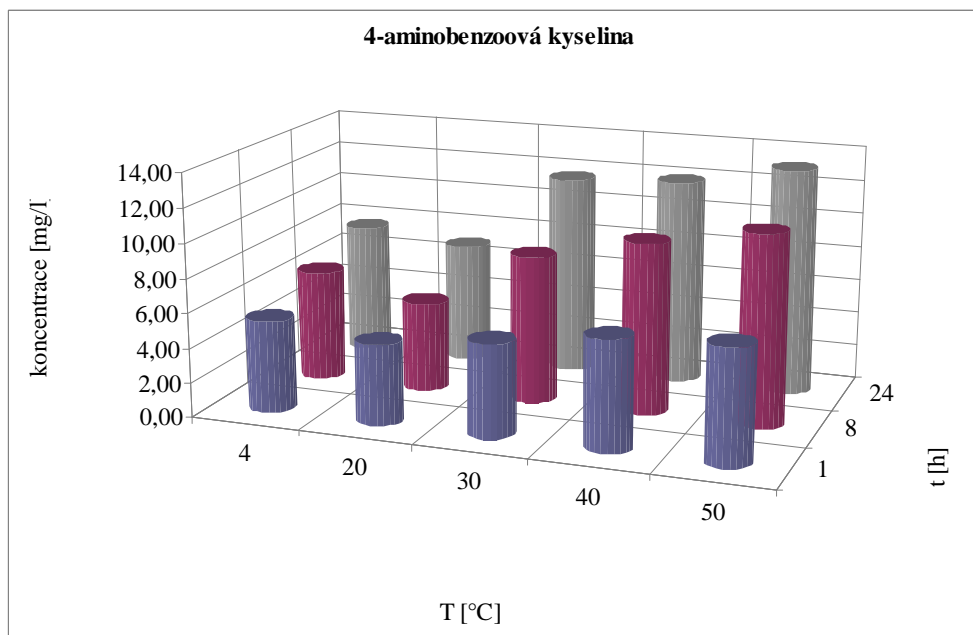
Po vystavení vzorku daným teplotám, tj. 4 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C a 50 °C po dobu 1 hodiny, 8 hodin a 24 hodin byla detekována kyselina 4-aminobenzoová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina vanilinová a vanilin.

Koncentrace v tabulkách byly získány dosazením zjištěných ploch píků (viz. příloha P 2 až P 6) každé látky do rovnice regrese každé standardní látky zmíněné výše. Výsledné koncentrace byly získány aritmetickým průměrem ze tří hodnot. Po vyhodnocení výsledků bylo třeba zvolit nejideálnější teplotu pro další pokus. Volena byla podle většiny.

	T	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[°C]	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
kyselina 4-aminobenzoová	4	1	5,313205	5,34	0,022
			5,34235		
			5,367789		
		8	6,816773	6,49	0,228
			6,313159		
			6,35452		
		24	6,810139	7,69	1,368
			9,625613		
			6,642588		
	20	1	4,668576	4,68	0,020
			4,661667		
			4,706964		
		8	5,031955	5,22	0,131
			5,288497		
			5,326977		
		24	7,219912	7,05	0,130
			6,904667		
			7,021751		
	30	1	5,443604	5,42	0,015
			5,415007		
			5,410432		
		8	8,578898	8,58	0,059
			8,503679		
			8,647072		
24		11,59624	11,70	0,104	
		11,65082			
		11,83864			
40	1	6,423563	6,38	0,056	
		6,303596			
		6,423197			
	8	10,02006	9,96	0,057	
		9,882934			
		9,971697			
	24	12,23551	12,04	0,226	
		12,1575			
		11,72211			
50	1	6,718128	6,64	0,060	
		6,571257			
		6,634489			
	8	11,09811	11,10	0,052	
		11,16231			
		11,03516			
	24	12,82839	13,23	0,391	
		13,09683			
		13,75862			

Tabulka 1: Koncentrace kyseliny 4-aminobenzoové

při různých teplotách a časech

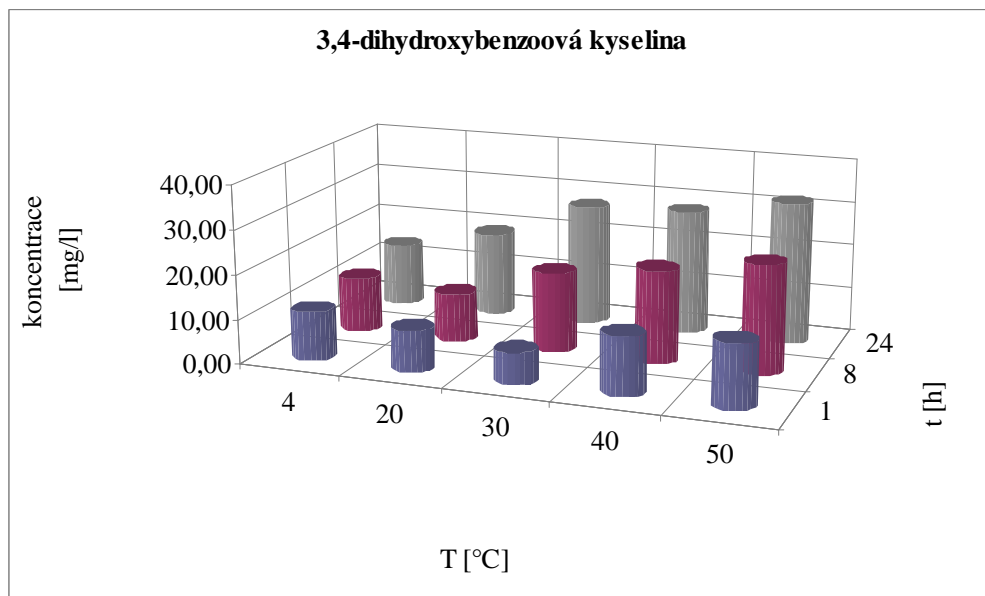


Obrázek 27: 3D graf kyseliny 4-aminobenzoové

Nejvyšší koncentrace kyseliny 4-aminobenzoové 13,23 mg/l byla zjištěna při 50 °C, což je viditelné jak z tabulky, tak z grafu. V 3D grafu je i vidět, že se zvyšující se teplotou roste i koncentrace kyseliny a stejně tak s časem. Koncentrace se zvyšuje s délkou působení každé teploty. Nejvyšší koncentrace kyseliny byly zjištěny vždy po ponechání působení teplot po dobu až 24 hodin.

	T	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[°C]	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
kyselina 3,4-dihydroxybenzoová	4	1	12,0761	11,03	0,739
			10,51106		
			10,50546		
		8	9,178045	12,17	2,135
			13,98981		
			13,35692		
		24	14,26095	14,29	0,046
			14,35891		
			14,26262		
	20	1	9,90744	9,29	0,516
			9,324968		
			8,64469		
		8	11,41433	10,77	0,458
			10,40975		
			10,48071		
		24	19,99185	19,10	0,779
			19,21839		
			18,09358		
	30	1	6,188482	6,97	0,682
			7,850307		
			6,867145		
		8	17,71361	17,92	0,152
			18,06996		
			17,98448		
24		27,4614	27,42	0,029	
		27,39878			
		27,40029			
40	1	12,94531	13,19	0,337	
		13,66196			
		12,95075			
	8	20,51622	20,80	0,329	
		20,62511			
		21,26154			
	24	28,69268	28,31	0,294	
		28,27526			
		27,97652			
50	1	14,34643	14,23	0,097	
		14,22722			
		14,10816			
	8	24,00987	24,39	0,283	
		24,6916			
		24,46377			
	24	31,87651	32,07	0,170	
		32,29011			
		32,03968			

Tabulka 2: Koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové při různých teplotách a časech



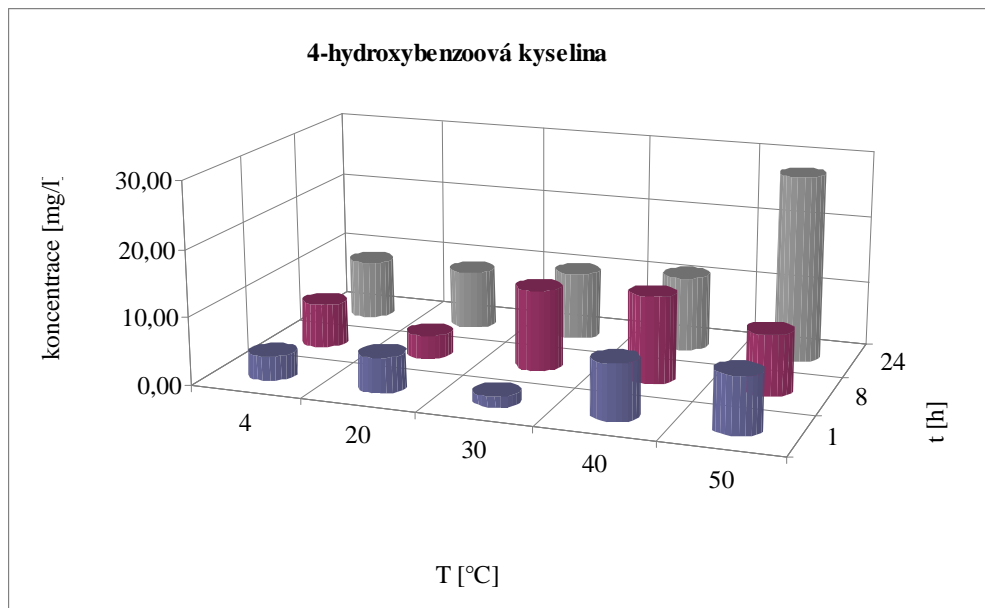
Obrázek 28: 3D graf kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové

Nejvyšší koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové 32,07 mg/l byla zjištěna při 50 °C. Což je viditelně v tabulce i v 3D grafu. V převážné většině se stoupající teplotou roste i koncentrace kyseliny, především po 24 hodinách extrakce. Dobře viditelný je i významný vliv času, kdy nejvyšších hodnot bylo dosahováno při ponechání delšího působení teplot. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány po 24 hodinách extrakce.

	T	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$	
	[°C]	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]	
kyselina 4-hydroxybenzoová	4	1	3,546602	3,68	0,170	
			3,920639			
			3,575278			
		8	8	5,895966	6,59	0,498
				6,858783		
				7,025383		
		24	24	9,662756	8,90	0,541
				8,514773		
				8,515074		
	20	1	6,159253	5,33	0,597	
			5,075378			
			4,76615			
		8	8	3,943459	3,54	0,290
				3,277159		
				3,396967		
		24	24	9,375248	8,87	0,629
				9,252537		
				7,983095		
	30	1	1,570974	1,59	0,010	
			1,590592			
			1,593844			
		8	8	15,60666	12,16	2,461
				10,02073		
				10,85093		
24		24	9,980743	10,22	0,190	
			10,44556			
			10,23387			
40	1	7,824452	8,24	0,590		
		9,074127				
		7,820048				
	8	8	12,61251	12,93	0,223	
			13,06662			
			13,10155			
	24	24	11,73647	11,21	0,572	
			11,47574			
			10,41288			
50	1	8,394465	8,50	0,149		
		8,708948				
		8,392513				
	8	8	9,197388	9,16	0,059	
			9,079231			
			9,212051			
	24	24	28,49621	28,10	0,576	
			27,28261			
			28,51212			

Tabulka 3: Koncentrace kyseliny 4-hydroxybenzoové při různých teplotách a časech



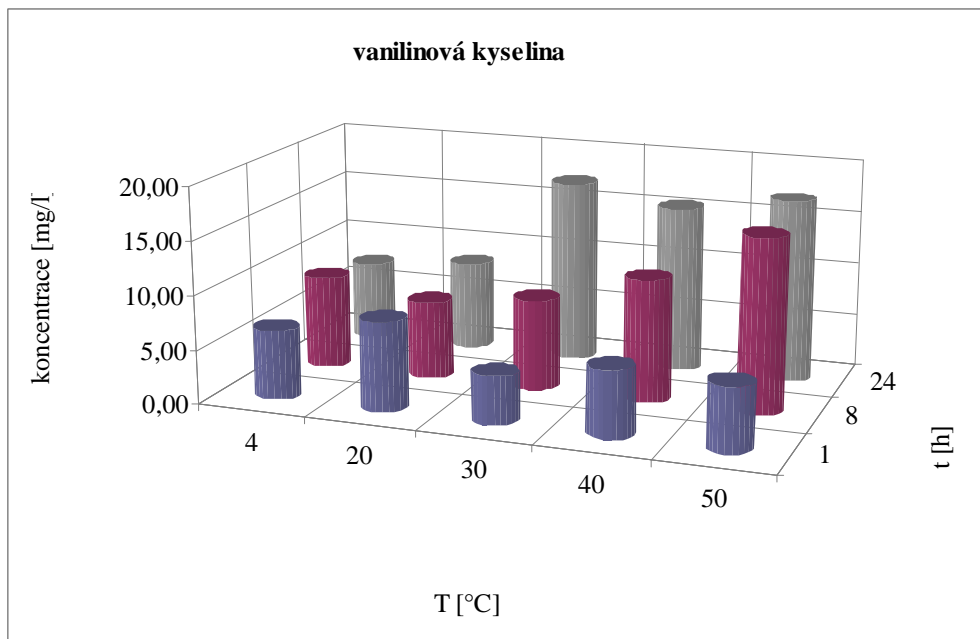


Obrázek 29: 3D graf kyseliny 4-hydroxybenzoové

Nejvyšší koncentrace kyseliny 4-hydroxybenzoové 28,10 mg/l bylo dosaženo při teplotě 50 °C v čase 24 hodin. Převážně ve vyšších teplotách bylo dosahováno vyšších koncentrací. Opět je na grafu viditelný vliv času, ale oproti předchozím kyselinám nejsou vzrůsty koncentrací tak výrazné kromě nejvyšší dosažené koncentrace při 50 °C po 24 hodinách extrakce. Vždy bylo třeba více než 1 hodina extrakce k dosažení vyšších výtěžků dané kyseliny.

	T	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[°C]	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
kyselina vanilinová	4	1	6,528418	6,48	0,037
			6,439611		
			6,467411		
		8	6,960873	8,67	1,278
			10,03259		
			9,019306		
		24	7,819965	7,38	0,309
			7,159905		
			7,16701		
	20	1	6,272549	8,35	1,472
			9,328871		
			9,458248		
		8	7,838087	7,29	0,773
			6,201297		
			7,843441		
		24	8,736512	8,42	0,584
			8,915671		
			7,597869		
	30	1	4,261429	4,53	0,385
			5,07084		
			4,24619		
		8	8,099156	8,49	0,280
			8,707424		
			8,67777		
24		16,76375	17,15	0,325	
		17,12742			
		17,55977			
40	1	7,846015	6,27	1,114	
		5,474722			
		5,492123			
	8	9,580313	11,40	1,335	
		11,88627			
		12,74063			
	24	12,98836	15,59	1,911	
		17,52137			
		16,26828			
50	1	6,062037	5,98	0,095	
		5,849104			
		6,035626			
	8	15,83237	16,21	0,269	
		16,37654			
		16,42442			
	24	18,52816	17,11	2,197	
		18,79443			
		14,00654			

Tabulka 4: Koncentrace kyseliny vanilinové  
při různých teplotách a časech

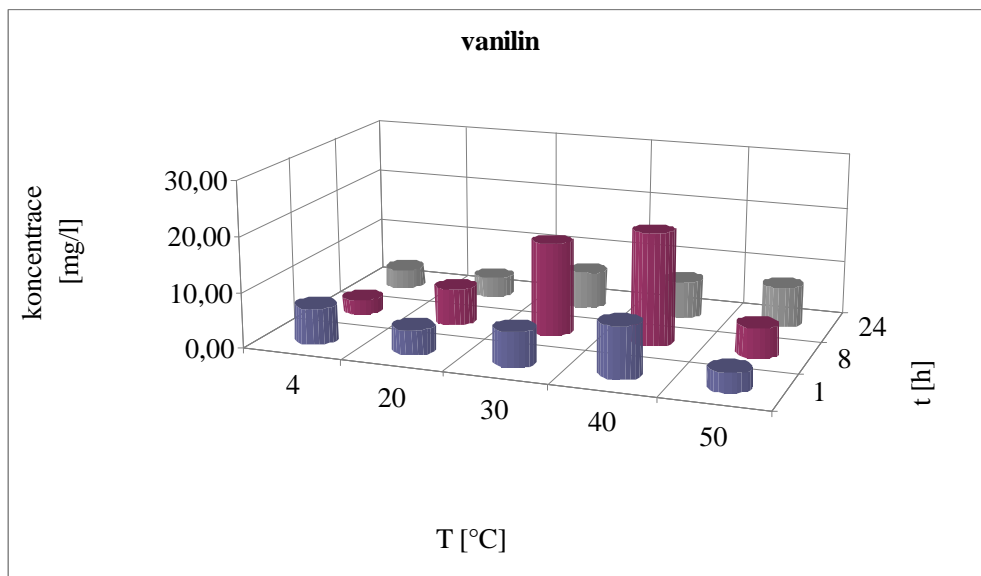


Obrázek 30: 3D graf kyseliny vanilinové

V případě kyseliny vanilinové bylo nejvyšší koncentrace 17,15 mg/l dosaženo při 30 °C, ihned za touto hodnotou se ale nachází koncentrace 17,11 mg/l, které bylo dosaženo při 50 °C. Převážně ve vyšších teplotách a při delším působení času jsou koncentrace kyseliny vanilinové stoupající, jak můžeme vidět v grafu.

	T	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[°C]	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
vanilin	4	1	6,484167	6,47	0,015
			6,448062		
			6,467835		
		8	2,843472	2,72	0,184
			2,4554		
			2,847195		
		24	3,687729	3,64	0,059
			3,560492		
			3,682459		
	20	1	5,553349	4,61	0,668
			4,085099		
			4,192084		
		8	7,938589	6,71	0,870
			6,114235		
			6,074015		
		24	4,360718	3,83	0,601
			4,136055		
			2,989458		
	30	1	6,245414	6,31	0,092
			6,438284		
			6,241843		
		8	15,32581	16,83	1,892
			15,67508		
			19,5017		
24		6,455618	6,64	0,136	
		6,782303			
		6,677124			
40	1	8,715711	9,33	0,874	
		10,56883			
		8,712467			
	8	18,27653	20,41	1,535	
		21,15644			
		21,80876			
	24	5,300812	6,61	0,928	
		7,132374			
		7,383278			
50	1	3,454137	3,43	0,027	
		3,443946			
		3,391488			
	8	5,699075	5,38	0,228	
		5,213381			
		5,217954			
	24	8,204932	7,54	0,809	
		8,006574			
		6,399066			

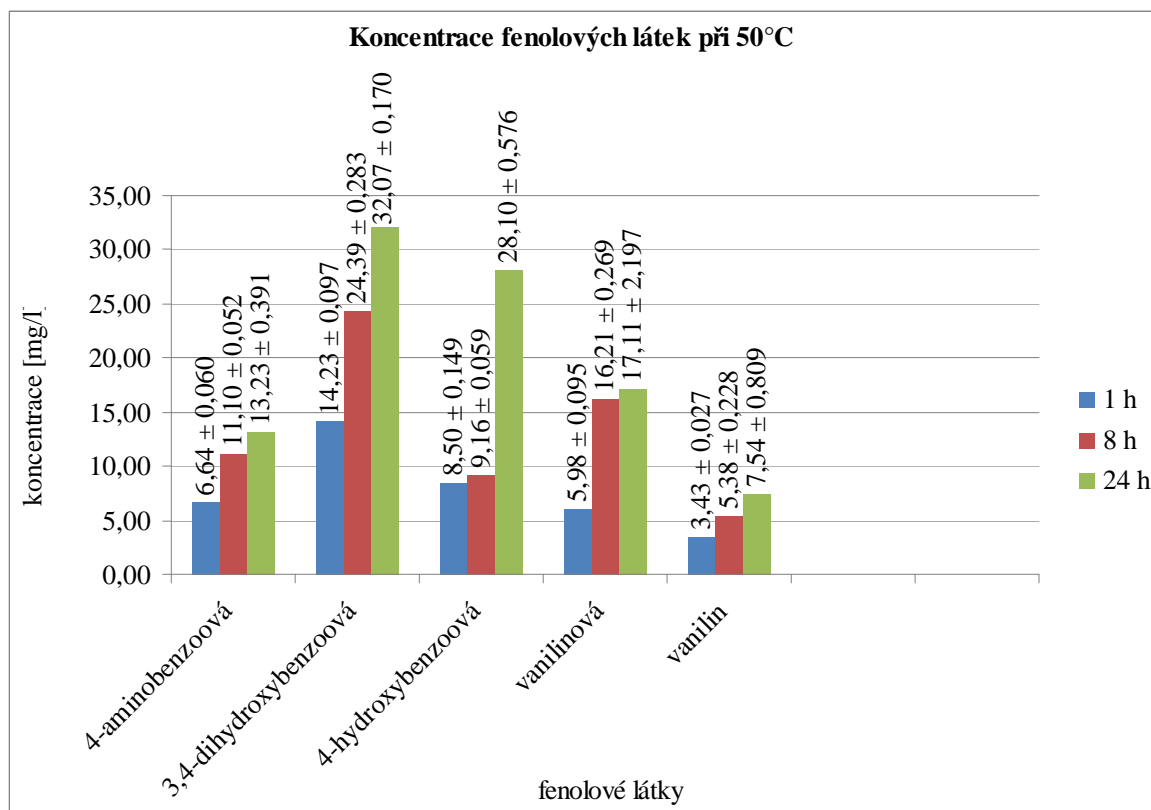
Tabulka 5: Koncentrace vanilinu  
při různých teplotách a časech



Obrázek 31: 3D graf vanilinu

Nejvyšší koncentrace vanilinu 20,41 mg/l bylo dosaženo při 40 °C. Z grafu je viditelné, že nejhodnější teploty pro vanilin jsou 40 °C a 30 °C. Viditelný je i vliv času, kdy vyšších koncentrací je dosaženo už při 1 hodině extrakce a při 8 hodinách extrakce se koncentrace převážně zvyšuje. Po 24 hodinách extrakce je koncentrace vanilinu oproti koncentraci po 1 hodině převážně nižší. Což u předchozích detekovaných látek bylo právě naopak.

Po vyhodnocení výsledků byla jako nejideálnější teplota stanovena teplota 50 °C, protože je převažující u většiny detekovaných látek.



Obrázek 32: Souhrnný graf koncentrace detekovaných fenolových látek při 50 °C

Ze souhrnného grafu je jasně viditelný vliv času na vyšší koncentrace detekovaných látek ve vybrané nejideálnější teplotě 50 °C. Nejvyšších koncentrací daných látek je dosahováno po 24 hodinách extrakce.

### 8.2.2 Stanovení fenolových kyselin po extrakci rozpouštědlem za působení 50 °C a ultrazvuku

Po vystavení vzorku teplotě 50 °C po dobu 1 hodiny, 8 hodin a 24 hodin byla detekována kyselina 4-aminobenzoová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina vanilinová, kyselina kávová, vanilin, kyselina p-kumarová, kyselina ferulová a kyselina sinapová.

Koncentrace v tabulkách byly získány dosazením zjištěných ploch píků (viz. příloha P 7 až P 15) každé látky do rovnice regrese každé standardní látky již zmíněné výše. Výsledné koncentrace byly získány aritmetickým průměrem ze tří hodnot.

	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
<b>kyselina 4-aminobenzoová</b>	1	9,154026	8,80	0,259
		8,544903		
		8,694244		
	8	43,90284	43,21	0,493
		42,7874		
		42,94667		
	24	44,08357	43,93	0,693
		44,69063		
		43,01388		

Tabulka 6: Koncentrace kyseliny 4-aminobenzoové  
při 50 °C a ultrazvuku

Z tabulky je viditelná vzrůstající koncentrace kyseliny 4-aminobenzoové s časem, kdy nejvyšší koncentrace 43,93 mg/l je dosaženo po 24 hodinové extrakci.

	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
<b>kyselina 3,4-dihydroxybenzoová</b>	1	17,80189	17,70	0,105
		17,55818		
		17,74922		
	8	41,58901	41,13	0,603
		40,27956		
		41,52407		
	24	25,31571	24,79	0,751
		23,72404		
		25,3197		

Tabulka 7: Koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové  
při 50 °C a ultrazvuku

V případě kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové je nejvyšší koncentrace 41,13 mg/l dosaženo po 8 hodinové extrakci. Oproti tomu po 24 hodinové extrakci je množství kyseliny již nižší, než tomu je u předchozí kyseliny. Ale i přes to je viditelné, že pro získání vyšší koncentrace je třeba delší doba extrakce.



	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
<b>kyselina 4-hydroxybenzoová</b>	1	11,11131	11,20	0,135
		11,39517		
		11,10751		
	8	29,5397	27,90	1,929
		25,19378		
		28,97514		
	24	30,49541	30,92	0,435
		31,51773		
		30,74558		

Tabulka 8: Koncentrace kyseliny 4-hydroxybenzoové  
při 50 °C a ultrazvuku

U kyseliny 4-hydroxybenzoové je nejvyšší koncentrace 30,92 mg/l dosaženo po 24 hodinách extrakce. V tabulce je viditelný vliv času, kdy se koncentrace kyseliny zvyšuje s délkou doby extrakce.

	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
<b>kyselina vanilinová</b>	1	7,939817	7,90	0,258
		8,192957		
		7,565589		
	8	10,19527	11,04	1,357
		9,979355		
		12,96005		
	24	96,66454	82,00	13,615
		85,46489		
		63,85986		

Tabulka 9: Koncentrace kyseliny vanilinové  
při 50 °C a ultrazvuku

Nejvyšší koncentrace 82,00 mg/l kyseliny vanilinové bylo dosaženo opět po 24 hodinách extrakce. U nejvyšší dosažené koncentrace kyseliny byla zjištěna velká směrodatná odchylka, hodnota tedy nemůže být brána v úvahu. V tabulce je viditelný význam času, kdy s dobou trvání extrakce roste i koncentrace kyseliny.

	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
<b>vanilin</b>	1	1,64544	1,18	0,745
		1,768845		
		0,129783		
	8	2,210834	2,47	0,222
		2,459821		
		2,753232		
	24	5,190952	5,18	0,640
		5,95601		
		4,387633		

Tabulka 10: Koncentrace vanilinu

při 50 °C a ultrazvuku

Nejvyšší koncentrace vanilinu 5,18 mg/l bylo dosaženo po 24 hodinách extrakce. Z tabulky je vidět, že koncentrace vanilinu je stoupající s délkou trvání extrakce.

	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
<b>kyselina kávová</b>	1	17,08222	18,82	1,274
		19,27119		
		20,10195		
	8	7,892667	6,89	0,812
		5,904775		
		6,869481		
	24	9,695266	9,32	1,791
		11,30252		
		6,964084		

Tabulka 11: Koncentrace kyseliny kávové

při 50 °C a ultrazvuku

U kyseliny kávové byla nejvyšší koncentrace 18,82 mg/l zjištěna již po 1 hodině extrakce. Koncentrace u této kyseliny jsou dále ve vztahu k času nepravidelné, kdy po 8 hodinách extrakce je koncentrace nejnižší. Po 24 hodinách extrakce je koncentrace sice vyšší než po

8 hodinách, ale za to je nižší než po 1 hodině extrakce. Stačí tedy 1 hodina extrakce k získání nejvyšší koncentrace kyseliny kávové.

	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
<b>kyselina p-kumarová</b>	1	0,688588	0,70	0,006
		0,70212		
		0,702099		
	8	0,622784	0,65	0,036
		0,703894		
		0,633291		
	24	0,688749	0,68	0,005
		0,677799		
		0,684696		

Tabulka 12: Koncentrace kyseliny p-kumarové  
při 50 °C a ultrazvuku

Výsledné koncentrace kyseliny p-kumarové ve všech časech jsou velmi nízké ve vzorku. Nejvyšší koncentrace kyseliny p-kumarové 0,70 mg/l bylo dosaženo po 1 hodině extrakce. Při pohledu na tabulku je viditelné, že výsledné koncentrace u jednotlivých časů od sebe nejsou příliš vzdáleny. Vliv času při extrakci této kyseliny tedy nehraje významnou roli.

	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
<b>kyselina ferulová</b>	8	0,271387	0,25	0,037
		0,280136		
		0,197246		
	24	0,336228	0,35	0,012
		0,364582		
		0,351717		

Tabulka 13: Koncentrace kyseliny ferulové  
při 50 °C a ultrazvuku

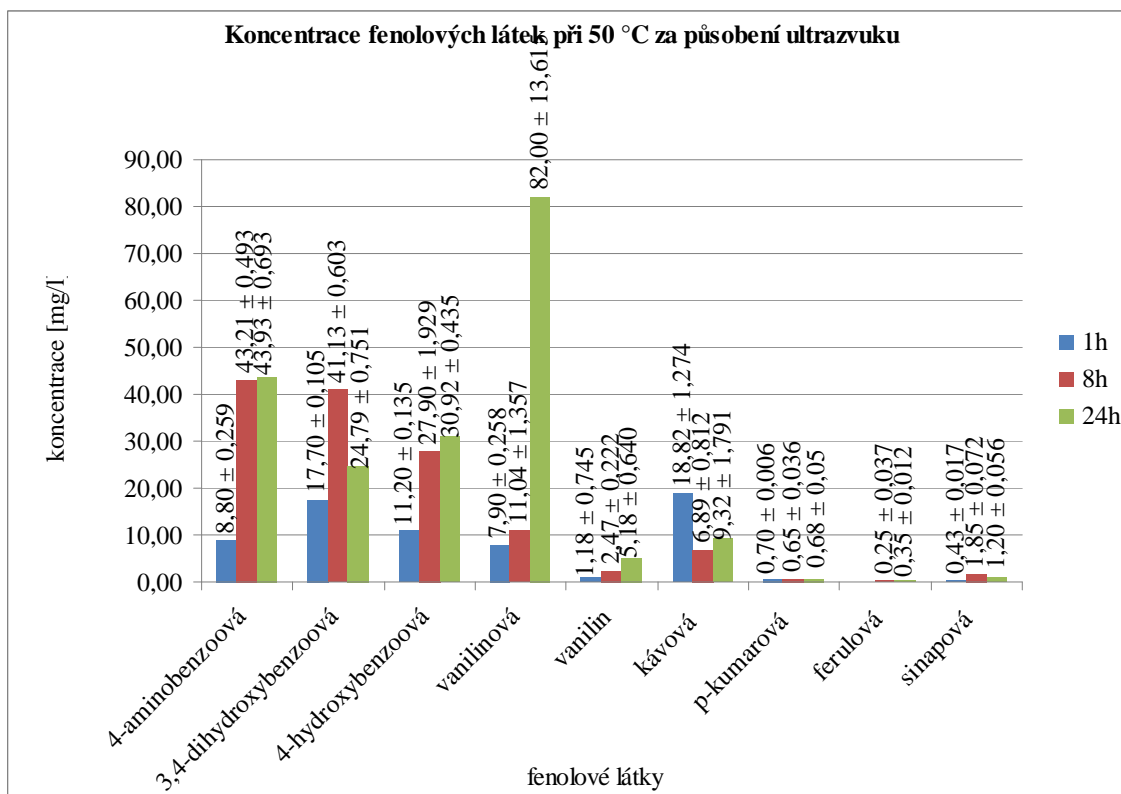
Obsah kyseliny ferulové ve vzorku je velmi nízký. Přičemž nejvyšší koncentrace 0,35 mg/l byla naměřena po 24 hodinách extrakce. Po 1 hodině extrakce nebyl zaznamenán žádný obsah.

	t	Koncentrace	Koncentrace	$\sigma$
	[h]	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
<b>kyselina sinapová</b>	1	0,409125	0,43	0,017
		0,449877		
		0,41885		
	8	1,924407	1,85	0,072
		1,863148		
		1,750287		
	24	1,269935	1,20	0,056
		1,133722		
		1,193261		

Tabulka 14: Koncentrace kyseliny sinapové  
při 50 °C a ultrazvuku

Obsah kyseliny sinapové ve vzorku je nízký. Nejvyšší koncentrace kyseliny 1,85 mg/l byla zjištěna po 8 hodinách extrakce. Nejnižší koncentrace byla zjištěna po 1 hodině extrakce. Z tabulky je viditelné, že pro získání vyšší koncentrace je třeba delší doba extrakce.

Z výsledných hodnot koncentrací byl vytvořen souhrnný graf všech detekovaných kyselin. Graf slouží k porovnání extrakčního účinku teploty 50 °C v kombinaci s ultrazvukem se souhrnným grafem extrakčního účinku samotné teploty 50 °C zmíněného již výše.



Obrázek 33: Souhrnný graf koncentrace detekovaných fenolových látek

### 8.3 Diskuze

Vzorek moučky jaderky byl nejprve podroben extrakci pomocí rozpouštědla a působení teplot 4 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C a 50 °C po dobu 1 hodiny, 8 hodin a 24 hodin. Fenolické látky byly poté měřeny pomocí HPLC s UV/VIS detektorem. Předpokladem byla přítomnost kyseliny 4-aminobenzoové, 3,4-dihydroxybenzoové, 4-hydroxybenzoové, vanilinové, kávové, vanilinu, kyseliny p-kumarové, ferulové a kyseliny sinapové. Detekováno bylo ale jen 5 látek, a to kyseliny 4-aminobenzoová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina vanilinová a vanilin. Koncentrace jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulkách výše společně s 3D grafy.

Kyselina 4-aminobenzoová byla zjištěna při nejvyšší koncentraci 13,23 mg/l při 50 °C po 24 hodinách extrakce. Koncentrace kyseliny se zvyšovala s extrakční teplotou. U této kyseliny je viditelný vliv času. Obsah kyseliny se zvyšuje i s délkou doby extrakce.

Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová byla zjištěna v nejvyšší koncentraci 32,07 mg/l při 50 °C po 24 hodinách extrakce. Koncentrace kyseliny rostla s teplotou extrakce a to především po delší době extrakce. Z grafu je viditelný růst koncentrace kyseliny s časem, kdy nejvyšší koncentrace při každé teplotě je dosaženo po 24 hodinách extrakce.

U kyseliny 4-hydroxybenzoová byla vypočítána nejvyšší koncentrace 28,10 mg/l po 24 hodinách extrakce při 50 °C. Růst koncentrace kyseliny se stoupající teplotou byl při extrakci po 1 hodina a po 8 hodinách značně nepravidelný. Vhodnější pro tuto kyseliny je spíše 24 hodinová extrakce, kdy její koncentrace stoupala se zvyšující se teplotou.

Kyselina vanilinová byla zjištěna v nejvyšší koncentraci 17,15 mg/l a to při 30 °C po 24 hodinách extrakce. Ihned za touto hodnotou se ale nachází hodnota 17,11 mg/l, která byla vypočítána při 50 °C po 24 hodinách extrakce. Z grafu je viditelné, že obsah kyseliny vanilinové je vyšší v oblasti vyšších teplot a po delší době extrakce.

Vanilin byl zjištěn v nejvyšší koncentraci 20,41 mg/l při teplotě 40 °C po 8 hodinách extrakce. Jedinému vanilinu jednoznačně vyhovovala nižší teplota, především 30 °C a 40 °C, než 50 °C a také u něj nebyla třeba delší extrakce než 8 hodin pro dosažení nejvyšší hodnoty.

Souhrnně lze říci, že pro většinu detekovaných látek je vyhovující vyšší teplota extrakce a doba působení 24 hodin.

Po zhodnocení výsledků detekovaných látek byla vybrána podle výsledných koncentrací nejideálnější teplota, se kterou bylo dále pracováno. U převážné většiny látek byla zjištěna nejvyšší koncentrace při teplotě 50 °C. Výsledné koncentrace detekovaných látek při 50 °C byly zobrazeny v souhrnném grafu uvedeném výše.

Následovalo další podrobení vzorku extrakci, a to pomocí rozpouštědla, při teplotě 50 °C a za působení ultrazvuku, vše po dobu 1 hodiny, 8 hodin a 24 hodin. Z předpokládaných 9 látek výše již zmíněných jich bylo všech 9 detekováno, tj. kyselina 4-aminobenzoová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina vanilinová, kyselina kávová, vanilin, kyselina p-kumarová, kyselina ferulová a kyselina sinapová. Oproti předchozí extrakci je tedy viditelné, že pomocí ultrazvuku je dosaženo lepších výsledků, tím že bylo detekováno všech 9 předpokládaných látek. Byl vytvořen souhrnný graf koncentrací detekovaných látek po této extrakci, který je zobrazený výše. Z grafu je vidět, že u převážné většiny látek je potřeba déle než 1 hodina extrakce pro dosažení vyšších koncentrací. Výjimkou je kyselina kávová, u které k dosažení nejvyšší hodnoty postačuje 1 hodina ex-

trakce a stejně tak kyselina p-kumarová. Kyselina 4-aminobenzoová měla nejvyšší koncentraci 43,93 mg/l po 24 hodinách extrakce, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová měla nejvyšší koncentraci 41,13 mg/l po 8 hodinách extrakce, kyselina 4-hydroxybenzoová měla nejvyšší koncentraci 30,92 mg/l po 24 hodinách extrakce, kyselina vanilinová měla nejvyšší koncentraci 82,00 mg/l po 24 hodinách extrakce, vanilin měl nejvyšší extrakci 5,18 mg/l po 24 hodinách extrakce, kyselina kávová jako jediná měla výrazně nejvyšší koncentraci 18,82 mg/l již po 1 hodině extrakce, kyselina p-kumarová měla nejvyšší koncentraci 0,70 mg/l po 1 hodině, kyselina ferulová měla nejvyšší koncentraci 0,35 mg/l po 24 hodinách a kyselina sinapová měla nejvyšší koncentraci 1,85 mg/l po 8 hodinách extrakce. Poslední tři kyseliny byly zjištěny v opravdu velmi malých množstvích.

Srovnáním koncentrací v souhrnném grafu po extrakci rozpouštědlem při 50 °C a souhrnném grafu po extrakci rozpouštědlem při 50 °C a ultrazvuku je vidět, že po použití ultrazvuku je detekováno všech 9 látek. Dalším srovnáním je viditelné, že kyselina 4-aminobenzoová má po použití ultrazvuku vyšší koncentraci ve všech třech časech než před tím. Kyselina 3,4-dihydroxybenzoová má po použití ultrazvuku vyšší koncentraci v čase 1 hodina a v čase 8 hodin. Kyselina 4-hydroxybenzoová má po použití ultrazvuku vyšší koncentraci než měla před tím. Dále kyselina vanilinová má po použití ultrazvuku koncentraci vyšší v čase 1 hodina a 24 hodin. Oproti předchozím vanilin má po použití ultrazvuku koncentraci naopak nižší než před tím.

Závěrem lze říci, že vhodnou extrakční metodou k izolaci většiny zjišťovaných fenolových látek je použití rozpouštědla 100% metanolu, teplota 50 °C v kombinaci s ultrazvukem a delší dobou extrakce. Kdy nejen že byly detekovány všechny předpokládané látky, ale u většiny z nich byla zjištěna i vyšší koncentrace než po předchozí extrakci.

Pro srovnání výsledků nebyla nalezena vhodná dostupná literatura. Při svém hledání, jsem nenalezla literaturu, ve které by byly stanovovány výše uvedené fenolové kyseliny v rozdrčených semenech révy vinné (v moučce). Převažovalo stanovování v jiném vzorku, stanovování jiných fenolových látek či zjištění celkového množství fenolových látek.

## ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo stanovit vhodnou extrakční metodu pro izolaci fenolových látek z rostlinného materiálu pevného charakteru, kterým byla moučka jaderka. Dále změřit obsah vybraných fenolických látek ve vzorku. Vzorek představuje sypký prášek z rozdrce- ných jaderků révy vinné. Vzorek byl podroben extrakci rozpouštědlem za působení teplot 4 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C a 50 °C po dobu 1 hodiny, 8 hodin a 24 hodin a následně proběhlo změření na HPLC s UV/VIS detektorem.

Předpokladem byla přítomnost kyseliny 4-aminobenzoové, kyselina 3,4-dihydroxybenzoové, kyselina 4-hydroxybenzoové, kyselina vanilinové, kyselina kávové, vanilinu, kyselina p-kumarové, kyselina ferulové a kyselina sinapové. Detekováno bylo ale jen 5 látek z výše vyjmenovaných, a to kyselina 4-aminobenzoová, kyselina 3,4-dihydroxybenzoová, kyselina 4-hydroxybenzoová, kyselina vanilinová a vanilin. Po vy- hodnocení výsledků byla zvolena jako nejideálnější teplota, při níž většina detekovaných látek měla nejvyšší koncentraci, teplota 50 °C. Z koncentrací látek při 50 °C byl vytvořen graf sloužící porovnávání s grafem druhé extrakce. Z grafu je viditelný význam doby ex- trakce, kdy nejvyšší koncentrace bylo dosahováno po 24 hodinách extrakce. S teplotou 50 °C bylo pracováno při další extrakci, kdy k teplotě 50 °C a rozpouštědлу byl přidán ultra- zvuku, opět po tři časy. Výsledkem byla detekce všech devíti látek kyseliny 4- aminobenzoové, kyselina 3,4-dihydroxybenzoové, kyselina 4-hydroxybenzoové, kyselina vanilinové, kyselina kávové, vanilinu, kyselina p-kumarové, kyselina ferulové a kyselina sinapové. Z toho látky, které byly po první extrakci detekovány, byly po této druhé extrakci zjištěny v převážné většině ve větším množství. Vyšších koncentrací detekované látky do- sahovaly po delší době extrakce. Výjimku tvořil vanilin, kterému naopak působení ultra- zvuku nevyhovovalo, a jeho koncentrace byla po této extrakci nižší. Už samotná detekce všech devíti látek ukazuje, že ultrazvuk představuje vhodný způsob extrakce. Všechny údaje jsou zaznamenány v souhrnném grafu sloužícího k porovnání.

Ze zjištěných údajů je patrné, že nejvhodnější extrakční metodou pro izolaci většiny feno- lových látek ze vzorku je extrakce 100% metanolem při teplotě 50 °C a za působení ultra- zvuku po dobu delší než 1 hodina.

Pro vinaře představují semena z hroznů révy vinné odpad. Dají se ale využít, obsahují vy- sokou koncentraci antioxidantů. Semena révy vinné mohou být využívána k výrobě oleje lisovaného především za studena. Olej z těchto semen se stává čím dál více populárním pro



jeho pozitivní vliv na zdraví člověka. Dále lze z vylisovaných semínek jejich rozdrčením získat bezlepkovou mouku, používající se například při výrobě zdravého chleba, rohlíků či výživných tyčinek. Dalším využitím může být jako krmný doplněk pro zvířata nebo výroba tablet jako doplněk stravy.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] KRAUS, V., Z. FOFFOVÁ, B. VURM a D. KRAUSOVÁ. *Nová encyklopedie českého a moravského vína: 1.díl*. Praha 1: Praga Mystica, 2005. ISBN 80-86767-00-0.
- [2] ML. KRAUS, V. a V. KRAUS. *Pěstujeme révu vinnou*. Praha 1: Grada, 2003. ISBN 80-247-0562-1.
- [3] Réva vinná. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-04-14]. Dostupné z: [http://cs.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9va\\_vinn%C3%A1](http://cs.wikipedia.org/wiki/R%C3%A9va_vinn%C3%A1)
- [4] Vinná réva/Vitis vinifera: Pěstování. *Českéstavby.cz: portál o stavbě, zahradě a bydlení* [online]. © 2001-2012 [cit. 2013-04-14]. Dostupné z: <http://www.ceskestavby.cz/rostliny/vinna-reva/>
- [5] MALÍK, F. *Ze života vína*. Pardubice: Filip Trend Publishing, 2003. ISBN 80-86282-27-9.
- [6] Vinoterapie aneb mládí na dosah. *Aromaterapie: časopis pro zdraví* [online]. 2009, č. 04 [cit. 2013-04-14]. Dostupné z: <http://www.originalatok.cz/download/casopis/Aromaterapie-04-09.pdf>
- [7] Vinná réva. *Celostnimedicina.cz: informační server o zdraví z pohledu celostní, přírodní, alternativní medicíny* [online]. 6.10. 2008 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.celostnimedicina.cz/vinna-reva.htm>
- [8] VITIS. *Galerie Modrý hrozen* [online]. © 2009 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.modryhrozen.com/vitis.htm>
- [9] Léčivá vína: galenika- formy léčivé. *Darius.cz: Archeus* [online]. 2.10. 2003 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://www.darius.cz/archeus/GF\\_vino.html](http://www.darius.cz/archeus/GF_vino.html)
- [10] Jihomoravští vinaři z révy čarují želé, omáčku, bonbony i hořčici. *IDNES.cz: Brno a jižní Morava* [online]. 17.2. 2012 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://brno.idnes.cz/chleba-most-krem-proti-vraskam-i-to-jde-z-hroznu-f5m-/brno-zpravy.aspx?c=A120215\\_1733194\\_brno-zpravy\\_dmk](http://brno.idnes.cz/chleba-most-krem-proti-vraskam-i-to-jde-z-hroznu-f5m-/brno-zpravy.aspx?c=A120215_1733194_brno-zpravy_dmk)

- [11] Fond mikroprojektů Sekundární produkty révy vinné - nové turistické lákadlo vinařských regionů. *Vína z Moravy vína z Čech: O víně* [online]. © 2005-2009 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.wineofczechrepublic.cz/ovine/files/Oppenauer.pdf>
- [12] CHRPOVÁ, D. *S výživou zdravě po celý rok*. Praha 7: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-2512-3.
- [13] Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. *Chemické listy* [online]. 2004, č. 4 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_04\\_03.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf)
- [14] Volné radikály a antioxidanty. *Celostnimedica.cz: Informační server o zdraví z pohledu celostní, přírodní, alternativní medicíny* [online]. 31.1. 2005 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.celostnimedica.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.htm>
- [15] Antioxidanty. *Naše výživa* [online]. © 2010-2013 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.nasevyziva.cz/sekce-antioxidanty/clanek-antioxidanty-191.html>
- [16] Antioxidanty, flavonoidy. *Darius.cz: Archeus* [online]. 2008 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://www.darius.cz/archeus/LU\\_antiox.html](http://www.darius.cz/archeus/LU_antiox.html)
- [17] VELÍŠEK, J. a J. HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin II*. Havlíčkův Brod: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-16-9.
- [18] Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek. *Chemické listy* [online]. 2010, s1 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_13\\_s27-s30.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_13_s27-s30.pdf)
- [19] CHVÁTALOVÁ, K. *Studium antiradikálové aktivity fenolových kyselin a jejich vlivu na redoxní stav železa a mědi* [online]. Brno, 2006 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/14202/lf\\_d/DSP\\_chvatalova.pdf](http://is.muni.cz/th/14202/lf_d/DSP_chvatalova.pdf). Disertační práce. Masarykova univerzita.
- [20] Comparison of Various Easy-to-Use Procedures for Extraction of Phenols from Apricot Fruits. *Molecules* [online]. 2011, č. 4 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/journal/molecules>

- [21] ZENDULKA, O. *Polyfenoly ve výživě jako možná prevence nádorových onemocnění* [online]. Brno, 2008 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/167123/lf\\_d/Disertace.pdf](http://is.muni.cz/th/167123/lf_d/Disertace.pdf). Disertační práce. Masarykova univerzita.
- [22] *Biológia, ekológia, chemia: časopis pre školy*. Trnava: Trnavská univerzita v Trnave, 2010, č. 1. ISSN 1338-1024.
- [23] MANDELOVÁ, L. *Antimutagenní aktivita obsahových látek v zelenině a v ovoci* [online]. Brno, 2006 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/20828/lf\\_d/Antimutagenni\\_aktivita\\_obsahovych\\_latek\\_v\\_zelenine\\_a\\_v\\_ovoci.pdf](http://is.muni.cz/th/20828/lf_d/Antimutagenni_aktivita_obsahovych_latek_v_zelenine_a_v_ovoci.pdf). Disertační práce. Masarykova univerzita.
- [24] Distribution of Phenolic Acids in Different Tissues of Jujube and Their Antioxidant Activity. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2011, č. 4 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/>
- [25] Červené a bílé víno. *Víno pro zdraví: Bona Dea životní styl* [online]. © 2011 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.vinoprozdravi.cz/cervene-a-bile-vino/>
- [26] Para-aminobenzoic acid. *MedlinePlus: Trusted Health Information for you* [online]. 2013 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002518.htm>
- [27] 4-Aminobenzoic Acid: Compound Summary. *PubChem Compound* [online]. 2004 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=978>
- [28] Para-Amino-Benzoic Acid. *Health supplements nutritional guide: nutritional health resource* [online]. © 2008-2010 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.healthsupplementsnutritionalguide.com/vitamin-deficiency-symptoms.html#PABA+> [http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina\\_4-aminobenzoov%C3%A1](http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_4-aminobenzoov%C3%A1)
- [29] DVOŘÁKOVÁ, B. *Využití polárních stacionárních fází pro fytochemickou analýzu* [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <https://library.upol.cz/aRLreports/kp/93445-110652778.pdf>. Diplomová práce. Palackého univerzita.

- [30] 4-Hydroxybenzoic acid. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/4-Hydroxybenzoic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/4-Hydroxybenzoic_acid)
- [31] Aroma Production by Tissue Cultures. *Journal of agricultural and food chemistry* [online]. 2006, č. 4 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/>
- [32] Vlastnosti a použití ferulové kyseliny. *Agronavigátor* [online]. 2001 [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=579&ids=153>
- [33] Separační metody KATA. *Univerzita Karlova v Praze: Přírodovědecká fakulta* [online]. [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~suchan/extrakce.pdf>
- [34] Extrakce. *Univerzita Karlova v Praze: Přírodovědecká fakulta* [online]. [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
- [35] Extrakce. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Fakulta potravinářské a biochemické technologie* [online]. [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: [http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM\\_LE\\_ASE\\_MASE\\_0907.pdf](http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM_LE_ASE_MASE_0907.pdf)
- [36] HOLZBECHER, Z. a J. CHURÁČEK. *Analytická chemie*. Praha 1: SNTL, 1987. ISBN 04-612-87.
- [37] Úvod do metabolomiky. *Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research: Department of Molecular Biology* [online]. [cit. 2013-04-15]. Dostupné z: <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/BAM/2.%20Metabolomika.pdf>
- [38] BAČÁK, M. *Extrakce chlorovaných a nitrovaných aromatických sloučenin z vody magnetickou tuhou fází* [online]. Pardubice, 2009 [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: [http://dspace.upce.cz/bitstream/10195/33718/1/Ba%C4%8D%C3%A1kM\\_extrakce%20chlorovan%C3%BDch\\_KK\\_1cast\\_2009.pdf](http://dspace.upce.cz/bitstream/10195/33718/1/Ba%C4%8D%C3%A1kM_extrakce%20chlorovan%C3%BDch_KK_1cast_2009.pdf). Diplomová práce. Pardubická univerzita.
- [39] KLEJDUS, B. *Separace a identifikace isoflavonů v rostlinném materiálu* [online]. Olomouc, 2004 [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: [http://www.prf.upol.cz/fileadmin/user\\_upload/PrF-](http://www.prf.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-)

dokumen-  
ty/Vedecka\_rada/Habilitace\_a\_profesury/ukon\_hab\_prof/Klej Dus\_Borivoj\_hab/ha  
b.prace-Klej Dus.pdf. Habilitační práce. Palackého univerzita.

- [40] Příprava vzorku k analýze. *Ivan Mikšík: Přednášky předmětu Analýza biologických materiálů* [online]. [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: <http://analyt.wz.cz/Priprava/1.%20Priprava%20vzorku.pdf>
- [41] Ultrazvuk v potravinářském průmyslu. *Agro navigátor* [online]. 2012 [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/service.asp?act=email&val=123609>
- [42] Laboratorní přístroje a postupy: Metodika analytického stanovení stabilizátoru UVINUL 4050H v polypropylenové matrici makrostab UV 2026. *Chemické listy* [online]. 2006, č. 2 [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006\\_02\\_114-117.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_02_114-117.pdf)
- [43] Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A* [online]. 2010 [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: [http://www.ntu.edu.sg/ias/researchArticles/Documents/JCA\\_PHWE\\_Review\\_1217\\_p2484to2494.pdf](http://www.ntu.edu.sg/ias/researchArticles/Documents/JCA_PHWE_Review_1217_p2484to2494.pdf)
- [44] Techniky laboratorní extrakce a jejich porovnání. *České vysoké učení technické v Praze: Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská* [online]. © 2001-2004 [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: [http://www.fjfi.cvut.cz/kjch/materialy/RCHP/RATEC\\_4.PDF](http://www.fjfi.cvut.cz/kjch/materialy/RCHP/RATEC_4.PDF)
- [45] Základy středoškolské chemie. In: *Google* [online]. [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: <https://www.google.cz/search?q=z%C3%A1klady+st%C5%99edo%C5%A1kolsk%C3%A9+chemie&aq=f&oq=z%C3%A1klady+st%C5%99edo%C5%A1kolsk%C3%A9+chemie&aqs=chrome.0.57j0l2.8105j0&sourceid=chrome&ie=UTF-8&qscrl=1>
- [46] Analytické metody. In: *3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy* [online]. [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: [http://www.lf3.cuni.cz/opencms/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/chemie/vyuka/studijni-materialy/CCBGCH21/prokruhy/vk\\_analyticke\\_metody\\_web.pdf](http://www.lf3.cuni.cz/opencms/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/chemie/vyuka/studijni-materialy/CCBGCH21/prokruhy/vk_analyticke_metody_web.pdf)

- [47] Kapalinová chromatografie. In: *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. © 2009-2013 [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/lab/texty/hplc/HPLC.pdf](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC.pdf)
- [48] UV/VIS HPLC detektory. In: *Chromatografické fórum: HPLC* [online]. © 1999-2013 [cit. 2013-04-16]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/UV\\_VIS\\_detector.html](http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html)
- [49] High-Performance Liquid Chromatograph Prominence. *Schimadzu: North America, Analytical and Measuring Instruments* [online]. 2012 [cit. 2013-04-19]. Dostupné z: <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/HPLC/C196-E061P.pdf>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

nm	Nanometr.
Hz	Hertz.
UV/VIS	Ultrafialová a viditelná oblast.
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
mg	Miligram
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
MHz	Megahertz
MPa	Megapascal
W	Watt
h	Hodina
m	Metr
cm	Centimetr
l	Litr
t	Čas v hodinách
T	Teplota ve °C
tj.	To je
°C	Stupen celsia
μl	Mikrolitr
max.	Maximální
min.	Minimální
σ	Směrodatná odchylka
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ml	Mililitr
mg/l	Miligram na 1 litr



g Gram

mm Milimetr

$\mu\text{m}$  Mikrometr

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Réva vinná.....	14
Obrázek 2: Fotografie vzorku moučky .....	15
Obrázek 3: 4-aminobenzoová kyselina .....	24
Obrázek 4: 3,4-dihydroxybenzoová kyselina.....	24
Obrázek 5: 4-hydroxybenzoová kyselina.....	24
Obrázek 6: Vanilová kyselina .....	25
Obrázek 7: Kávová kyselina .....	25
Obrázek 8: Vanilin.....	26
Obrázek 9: p-kumarová kyselina .....	26
Obrázek 10: Ferulová kyselina .....	27
Obrázek 11: Sinapová kyselina.....	27
Obrázek 12: Craigovo .....	28
Obrázek 13: Soxhletův.....	29
Obrázek 14: HPLC [47].....	37
Obrázek 15: Chromatograf LC -20 AD (Schimadzu) [49] .....	38
Obrázek 16: Detektor UV/VIS SPD-20 A [49] .....	38
Obrázek 17: Autosampler SIL-20AC [49].....	39
Obrázek 18: Kalibrační křivka kyseliny 4-aminobenzoové.....	46
Obrázek 19: Kalibrační křivka kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové.....	47
Obrázek 20: Kalibrační křivka kyseliny 4-hydroxybenzoové.....	47
Obrázek 21: Kalibrační křivka kyseliny vanilinové.....	48
Obrázek 22: Kalibrační křivka kyseliny kávové .....	48
Obrázek 23: Kalibrační křivka vanilinu.....	49
Obrázek 24: Kalibrační křivka kyseliny p-kumarové .....	49
Obrázek 25: Kalibrační křivka kyseliny ferulové .....	50
Obrázek 26: Kalibrační křivka kyseliny sinapové .....	50
Obrázek 27: 3D graf kyseliny 4-aminobenzoové.....	53
Obrázek 28: 3D graf kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové .....	55
Obrázek 29: 3D graf kyseliny 4-hydroxybenzoové .....	57
Obrázek 30: 3D graf kyseliny vanilinové .....	59
Obrázek 31: 3D graf vanilinu .....	61

---

Obrázek 32: Souhrnný graf koncentrace detekovaných fenolových látek při 50 °C .....	62
Obrázek 33: Souhrnný graf koncentrace detekovaných fenolových látek .....	69

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1: Koncentrace kyseliny 4-aminobenzoové .....	52
Tabulka 2: Koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové při různých.....	54
Tabulka 3: Koncentrace kyseliny 4-hydroxybenzoové při.....	56
Tabulka 4: Koncentrace kyseliny vanilinové.....	58
Tabulka 5: Koncentrace vanilinu .....	60
Tabulka 6: Koncentrace kyseliny 4-aminobenzoové .....	64
Tabulka 7: Koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové .....	64
Tabulka 8: Koncentrace kyseliny 4-hydroxybenzoové .....	65
Tabulka 9: Koncentrace kyseliny vanilinové.....	65
Tabulka 10: Koncentrace vanilinu .....	66
Tabulka 11: Koncentrace kyseliny kávové .....	66
Tabulka 12: Koncentrace kyseliny p-kumarové.....	67
Tabulka 13: Koncentrace kyseliny ferulové.....	67
Tabulka 14: Koncentrace kyseliny sinapové.....	68

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P 1: Data pro sestavení kalibračních křivek standardních látek

Příloha P 2: Zjištěné plochy píků kyseliny 4-aminobenzoové použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 3: Zjištěné plochy píků kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 4: Zjištěné plochy píků kyseliny 4-hydroxybenzoové použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 5: Zjištěné plochy píků kyseliny vanilinové použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 6: Zjištěné plochy píků vanilinu použité pro výpočet jeho koncentrace ve vzorku

Příloha P 7: Zjištěné plochy píků kyseliny 4-aminobenzoové po působení 50 °C a ultrazvuku použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 8: Zjištěné plochy píků kyseliny 3,4-dihydroxybenzoové po působení 50 °C a ultrazvuku použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 9: Zjištěné plochy píků kyseliny 4-hydroxybenzoové po působení 50 °C a ultrazvuku použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 10: Zjištěné plochy píků kyseliny vanilinové po působení 50 °C a ultrazvuku použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 11: Zjištěné plochy píků vanilinu po působení 50 °C a ultrazvuku použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 12: Zjištěné plochy píků kyseliny kávové po působení 50 °C a ultrazvuku použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 13: Zjištěné plochy píků kyseliny p-kumarové po působení 50 °C a ultrazvuku použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 14: Zjištěné plochy píků kyseliny ferulové po působení 50 °C a ultrazvuku použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

Příloha P 15: Zjištěné plochy píků kyseliny sinapové po působení 50 °C a ultrazvuku použité pro výpočet její koncentrace ve vzorku

**PŘÍLOHA P 1: DATA PRO SESTROJENÍ KALIBRAČNÍCH KŘIVEK  
STANDARDNÍCH LÁTEK**

	Plochy píků								
Koncentrace [mg/l]	4-aminobenzoová kyselina	3,4- dihydroxybenzoová kyselina	4-hydroxybenzoová kyselina	Vanilinová kyselina	Kávová kyselina	Vanilin	p-kumarová kyselina	Ferulová kyselina	Sinapová kyselina
0,1	2796	1478	2606	2603	2238	5585	15615	15525	1622
0,3	8172	6119	7433	7374	11382	16091	29581	23920	3894
0,5	12729	10683	11648	11216	18153	26397	40111	31182	6977
0,7	16747	13244	15103	15229	23950	34756	49752	37755	9691
0,9	23074	18149	21241	20847	33155	49318	65739	47461	13612
1	23512	19726	23018	21215	33648	49710	59073	34996	14528
3	64171	53746	58194	57250	100261	133235	156581	93929	48123
5	104276	91312	95182	92970	166193	216806	256530	154901	70055
7	158909	133529	144940	141531	248364	332345	391403	236371	105589
9	198026	167001	181760	417524	316347	417524	442388	292602	137205

**PŘÍLOHA P 2: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY 4-AMINOBENZOOVÉ POUŽITÉ PRO VÝPOČET JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	T	t	Plochy píkŮ
	[°C]	[h]	[-]
kyselina 4-aminobenzoová	4	1	72 031
			79 505
			72 604
		8	118 976
			138 215
			141 544
		24	194 244
			171 305
			171 311
	20	1	124 237
			102 579
			96 400
		8	79 961
			66 647
			69 041
		24	188 499
			186 047
			160 681
	30	1	32 554
			32 946
			33 011
		8	313 015
			201 397
			217 986
24		200 598	
		209 886	
		205 656	
40	1	157 511	
		182 482	
		157 423	
	8	253 186	
		262 260	
		262 958	
	24	235 681	
		230 471	
		209 233	
50	1	168 901	
		175 185	
		168 862	
	8	184 945	
		182 584	
		185 238	
	24	570 574	
		546 324	
		570 892	



**PŘÍLOHA P 3: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY 3,4-DIHYDROXYBENZOOVÉ POUŽITÉ PRO VÝPOČET JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	T	t	Plochy píkŮ	
	[°C]	[h]	[-]	
kyselina 3,4-dihydroxybenzoová	4	1	224 853	
			195 762	
			195 658	
		8	170 984	260 425
				248 661
				265 465
			24	267 286
				265 496
	20	1	184 542	
			173 715	
			161 070	
		8	212 552	
			193 879	
			195 198	
		24	371 991	
			357 614	
			336 706	
	30	1	115 414	
			146 304	
			128 029	
		8	329 643	
			336 267	
			334 678	
24		510 835		
		509 671		
		509 699		
40	1	241 010		
		254 331		
		241 111		
	8	381 738		
		383 762		
		395 592		
	24	533 722		
		525 963		
		520 410		
50	1	267 054		
		264 838		
		262 625		
	8	446 678		
		459 350		
		455 115		
	24	592 903		
		600 591		
		595 936		

**PŘÍLOHA P 4: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY 4-HYDROXYBENZOOVÉ POUŽITÉ PRO VÝPOČET JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	T	t	Plochy píků
	[°C]	[h]	[-]
kyselina 4-hydroxybenzoová	4	1	72 031
			79 505
			72 604
		8	118 976
			138 215
			141 544
			194 244
			171 305
			171 311
	20	1	124 237
			102 579
			96 400
		8	79 961
			66 647
			69 041
		24	188 499
			186 047
			160 681
	30	1	32 554
			32 946
			33 011
		8	313 015
			201 397
			217 986
24		200 598	
		209 886	
		205 656	
40	1	157 511	
		182 482	
		157 423	
	8	253 186	
		262 260	
		262 958	
	24	235 681	
		230 471	
		209 233	
50	1	168 901	
		175 185	
		168 862	
	8	184 945	
		182 584	
		185 238	
	24	570 574	
		546 324	
		570 892	

**PŘÍLOHA P 5: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY VANILINOVÉ  
POUŽITÉ PRO VÝPOČET JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	T	t	Plochy píkŮ
	[°C]	[h]	[-]
kyselina vanilinová	4	1	128 019
			126 294
			126 834
		8	136 419
			196 084
			176 402
		24	153 106
			140 285
			140 423
	20	1	123 049
			182 415
			184 928
		8	153 458
			121 665
			153 562
		24	170 909
			174 389
			148 792
	30	1	83 985
			99 707
			83 689
		8	158 529
			170 344
			169 768
24		326 830	
		333 894	
		342 292	
40	1	153 612	
		107 552	
		107 890	
	8	187 299	
		232 090	
		248 685	
	24	253 497	
		341 546	
		317 206	
50	1	118 960	
		114 824	
		118 447	
	8	308 739	
		319 309	
		320 239	
	24	361 102	
		366 274	
		273 274	

**PŘÍLOHA P 6: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ VANILINU POUŽITÉ PRO  
VÝPOČET JEHO KONCENTRACE VE VZORKU**

	T	t	Plochy píkŮ	
	[°C]	[h]	[-]	
<b>vanilin</b>	4	1	299 658	
			298 000	
			298 908	
		8	132 470	114 649
				132 641
				171 240
			24	165 397
				170 998
	20	1	256 913	
			189 488	
			194 401	
		8	366 448	
			282 670	
			280 823	
		24	202 145	
			191 828	
			139 174	
	30	1	288 694	
			297 551	
			288 530	
		8	705 684	
			721 723	
			897 449	
24		298 347		
		313 349		
		308 519		
40	1	402 135		
		487 234		
		401 986		
	8	841 187		
		973 438		
		1 003 394		
	24	245 316		
		329 425		
		340 947		
50	1	160 513		
		160 045		
		157 636		
	8	263 605		
		241 301		
		241 511		
	24	378 679		
		369 570		
		295 750		

**PŘÍLOHA P 7: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY 4-AMINOBENZOOVÉ PO PŮSOBENÍ 50 °C A ULTRAZVUKU POUŽITÉ PRO VÝPOČET JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	t	Plocha píku
	[h ]	[-]
kyselina 4-aminobenzoová	1	201207
		187894
		191158
	8	960677
		936298
		939779
	24	964627
		977895
		941248

**PŘÍLOHA P 8: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY 3,4-DIHYDROXYBENZOOVÉ PO PŮSOBENÍ 50 °C A ULTRAZVUKU  
POUŽITÉ PRO VÝPOČET JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	t	Plocha píku
	[h ]	[-]
kyselina 3,4-dihydroxybenzoová	1	331284
		326754
		330305
	8	773439
		749099
		772232
	24	470951
		441365
		471025

**PŘÍLOHA P 9: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY 4-HYDROXYBENZOOVÉ PO PŮSOBENÍ 50 °C A ULTRAZVUKU POUŽITÉ PRO VÝPOČET JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	t	Plocha píku
	[h ]	[-]
kyselina 4-hydroxybenzoová	1	223189
		228861
		223113
	8	591425
		504585
		580144
	24	610522
		630950
		615521

**PŘÍLOHA P 10: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY  
VANILINOVÉ PO PŮSOBENÍ 50 °C A ULTRAZVUKU POUŽITÉ PRO  
VÝPOČET JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	t	Plocha píku
	[h ]	[-]
kyselina vanilinová	1	155434
		160351
		148165
	8	199244
		195050
		252947
	24	1878823
		1661281
		1241625



**PŘÍLOHA P 11: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ VANILINU PO  
PŮSOBENÍ 50 °C A ULTRAZVUKU POUŽITÉ PRO VÝPOČET JEHO  
KONCENTRACE VE VZORKU**

	t	Plocha píku
	[h ]	[-]
vanilin	1	77454
		83121
		7852
	8	103418
		114852
		128326
	24	240271
		275404
		203381

**PŘÍLOHA P 12: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY KÁVOVÉ PO PŮSOBENÍ 50 °C A ULTRAZVUKU POUŽITÉ PRO VÝPOČET JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	t	Plocha píku
	[h ]	[-]
kyselina kávová	1	597282
		673940
		703033
	8	275464
		205848
		239632
	24	338591
		394877
		242945

**PŘÍLOHA P 13: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY P-KUMAROVÉ PO PŮSOBENÍ 50 °C A ULTRAZVUKU POUŽITÉ PRO VÝPOČET JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	t	Plocha píku
	[h ]	[-]
kyselina p-kumarová	1	48459
		49130
		49129
	8	45196
		49218
		45717
	24	48467
		47924
		48266

**PŘÍLOHA P 14: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY FERULOVÉ  
PO PŮSOBENÍ 50 °C A ULTRAZVUKU POUŽITÉ PRO VÝPOČET  
JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	t	Plocha píku
	[h ]	[-]
kyselina ferulová	8	20375
		20645
		18087
	24	22376
		23251
		22854

**PŘÍLOHA P 15: ZJIŠTĚNÉ PLOCHY PÍKŮ KYSELINY SINAPOVÉ  
PO PŮSOBENÍ 50 °C A ULTRAZVUKU POUŽITÉ PRO VÝPOČET  
JEJÍ KONCENTRACE VE VZORKU**

	t	Plocha píku
	[h ]	[-]
kyselina sinapové	1	5745
		6361
		5892
	8	28650
		27724
		26018
	24	18757
		16698
		17598